

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ SPÉCIALISÉE (BIOLOGIE APPLIQUÉE ET ENTREPRISE)

Analyse de l'implication du récepteur de type II aux interleukines 4 et 13 en condition inflammatoire dans un modèle d'épiderme reconstruit humain

Drouet, Rémi

Award date:
2022

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

Analyse de l'implication du récepteur de type II aux interleukines 4 et 13 en condition inflammatoire dans un modèle d'épiderme reconstruit humain

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Rémi DROUET

Janvier 2022

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Analyse de l'implication du récepteur de type II aux interleukines 4 et 13 en condition inflammatoire dans un modèle d'épiderme reconstruit humain

DROUET Rémi

Résumé

La peau est un organe complexe, composé de trois grandes structures tégumentaires : le tissu sous-cutané, le derme et l'épiderme. Elle peut être touchée par différentes pathologies. Notamment la dermatite atopique (DA) qui est une maladie inflammatoire chronique de la peau touchant 20% des jeunes enfants et 2 à 10% d'adultes. La physiopathologie de la DA est caractérisée par un déséquilibre du système immunitaire et une perte de l'intégrité de la barrière épidermique. Ces altérations de la barrière seraient initiées par une condition inflammatoire épidermique et sont maintenues par le biais d'un cercle vicieux. Les interleukines (IL)-4 et IL-13 sont libérées en grande quantité dans la peau de patients atteints de DA. La modification du phénotype des kératinocytes et l'altération ont été démontrées dans un modèle d'épiderme humain reconstruit (RHE) après exposition aux IL-4 et IL-13. Ces ILs activent le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1, qui jouerait très probablement un rôle dans la condition inflammatoire épidermique. Dans cette étude, nous avons investigué cette hypothèse dans deux modèles, où la fonction du récepteur IL-4R α /IL-13R α est bloquée. Nous avons analysé des épidermes reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT mâles immortalisés dont le gène IL13RA1, localisé sur le chromosome X, a été édité par la technique Crispr-Cas9. Nous avons également analysé des RHE constitués de kératinocytes primaires provenant d'abdominoplastie, prétraités aux inhibiteurs de JAK. L'étude consiste en une série d'investigations de l'expression génique, de l'activation des voies de signalisation (JAK-STAT), de la morphologie et de l'intégrité de la barrière cutanée. Les résultats ont révélé que le récepteur de type II pourrait jouer un rôle dans les altérations phénotypiques des épidermes, probablement en activant les voies de signalisation de STAT6 par l'intermédiaire d'IL-4 et d'IL-13. En effet, il semble impliqué dans l'altération de la barrière cutanée et dans la modification de l'expression génique de certains marqueurs de DA (CA2, NELL2 et HAS3). De plus, ce récepteur permettrait l'induction de la sous-unité IL-2R γ du récepteur IL-2R γ /IL-4R α et d'IL-13R α 2, deux autres récepteurs activés également par l'IL-4 et l'IL-13. Cependant, des études supplémentaires doivent être entreprises pour confirmer nos résultats et étendre notre connaissance sur le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2022

Promoteur: Y. Poumay

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement mon promoteur, Mr Y.Poumay pour m'avoir accueilli à bras ouverts au sein de son laboratoire. Pour le partage de ses conseils et de son expérience afin d'aiguiller ma réflexion. Pour sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce projet. Pour le temps qu'il m'a accordé pour ce travail, pour les meetings et les présentations.

Je tiens à remercier également mon encadrante, Audrey Progneaux, sans qui ce travail n'aurait pas été aussi abouti. Merci de m'avoir mis dans le bain, avec toutes ces explications et pour le partage de son expertise, pour l'apprentissage des techniques expérimentales, lors de mes débuts. Enfin, merci pour sa disponibilité, pour toute la patience et le temps accordés pour répondre à mes nombreuses questions, ainsi que pour les corrections de ce travail.

Mes remerciements vont également à Catherine Lambert pour les partages et les conseils lors des présentations.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du Labceti et LNR, pour leur accueil et pour cette très agréable atmosphère de convivialité, d'entraide et de partage. Chacun d'entre eux a contribué un peu à sa manière. Merci aux techniciens de laboratoire Valérie De Glas, Kathleen De Swert et Valérie Bielarz pour leurs astuces, leur disponibilité et leur gentillesse. Merci à Emilie, Céline, Lindsay, Caroline, Mr Nicaise, Nicolas, Bastien pour leur bienveillance, ainsi que les moments agréables passés en leur compagnie.

Je remercie les membres du jury, Caroline Servais, Xavier De Bolle, Nicolas Burton et Laurent Duvivier pour l'attention accordée à la lecture de mon mémoire.

Pour terminer, je remercie mes collègues, Chloé, Margaux, Léandra et Guillaume pour la bonne ambiance ainsi que les moments de rigolade, d'entraide et de soutien. Merci également à mes amis et ma famille pour leur soutien. Merci à mes parents d'avoir suivi mon parcours, d'y avoir cru et de m'avoir aidé à le finir.

Table des matières

1. Introduction	P1
1.1 L'anatomie et la physiologie de la peau humaine.....	P1
1.2 Les couches épidermiques et leurs caractéristiques	P2
1.3 La couche cornée et la barrière épidermique.....	P3
1.4 La dermatite atopique et sa physiopathologie.....	P5
1.5 Les récepteurs aux interleukines 4 et 13.....	P8
1.6 Le modèle utilisé pour notre projet.....	P10
1.7 Objectif du projet.....	P12
2. Matériel et méthodes	P14
2.1 Cultures cellulaires, construction d'épidermes reconstruits et exposition aux IL-4 et IL-13.....	P14
2.2 Construction de lignées cellulaires knock-out (KO) pour le gène <i>IL13RA1</i> par la technique Crispr-Cas9	P14
2.3 Traitement aux IL-4 et IL-13 des épidermes reconstruits.....	P15
2.4 Mesures de la résistance électrique transépithéliale (TEER).....	P15
2.5 Enrobage en paraffine et création de coupes histologiques.....	P16
2.6 Test de perméabilité à la biotine.....	P16
2.7 Observation morphologique de coupes histologiques.....	P17
2.8 Extraction d'ARN total et RTqPCR.....	P18
2.9 Extraction protéique des RHE et Western Blot.....	P18

3. Résultats.....P22

3.1 Utilisation de deux modèles complémentaires de RHE pour étudier l'implication du récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 en condition inflammatoire induite par les IL-4 et IL-13. L'inactivation du gène *IL13RA1* dans des kératinocytes N/TERTP22

3.2 Reconstruction *in vitro* d'un épiderme avec les kératinocytes N/TERT et primaires. Aucun changement morphologique n'a été identifié au sein de ces RHE après exposition aux IL-4 et IL-13.....P24

3.3 Le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 induit l'expression génique de la sous-unité IL-2R γ et du récepteur IL-13R α 2 après exposition aux IL-4 et IL-13 dans les RHE *IL13RA1*^{+/-0} et RHE de kératinocytes primaires. L'induction de l'expression génique de la sous-unité IL2R γ et du récepteur IL-13R α 2 n'est pas présente dans les kératinocytes des RHE *IL13RA1*⁻⁰ et des RHE prétraités avec les inhibiteurs de JAK.....P26

3.4 Le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 induit l'expression des marqueurs géniques de la DA CA2, NELL2 et HAS3 par les IL-4 et IL-13 dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0} et les RHE primaires. L'expression de CA2, NELL2 et HAS3 n'est plus induite dans les kératinocytes des RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ et des RHE primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK.....P27

3.5 Le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 intervient dans la phosphorylation de la protéine STAT6 suite à l'ajout des IL-4 et IL-13. Les IL-4 et IL-13 n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de la protéine ERK.....P29

3.6 Les IL-4 et IL-13 altèrent l'intégrité de la barrière épidermique dans les épidermes reconstruits N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}. Cette altération de la barrière cutanée n'est pas apparente dans les RHE N/TERT *IL-13RA1*⁻⁰ et les RHE primaires avec et sans les inhibiteurs de JAK.....P31

4. Discussion et Perspectives.....P35

5. Bibliographie.....P41

1. Introduction

1.1 L'anatomie et la physiologie de la peau humaine

La peau est considérée comme le plus grand organe du corps humain et sa structure est relativement complexe. Son épaisseur varie selon la zone anatomique et l'origine ethnique d'un individu. Prise à elle seule, elle correspond à environ 15 % du poids total d'un corps adulte. La peau joue un rôle très important de protection contre tout ce qui est facteur exogène tels que les agents physiques, chimiques et biologiques. Elle permet également le maintien de l'homéostasie, d'éviter la perte excessive d'eau et la thermorégulation du corps humain. La peau est un système tégumentaire composé d'un complexe de différentes structures superposées. Ce système est donc partagé en trois grandes structures tégumentaires : l'épiderme, le derme et le tissu adipeux sous-cutané encore appelé hypoderme (**Fig. 1**) (Boer et al., 2016; Kolarsick et al., 2011; Venus et al., 2010).

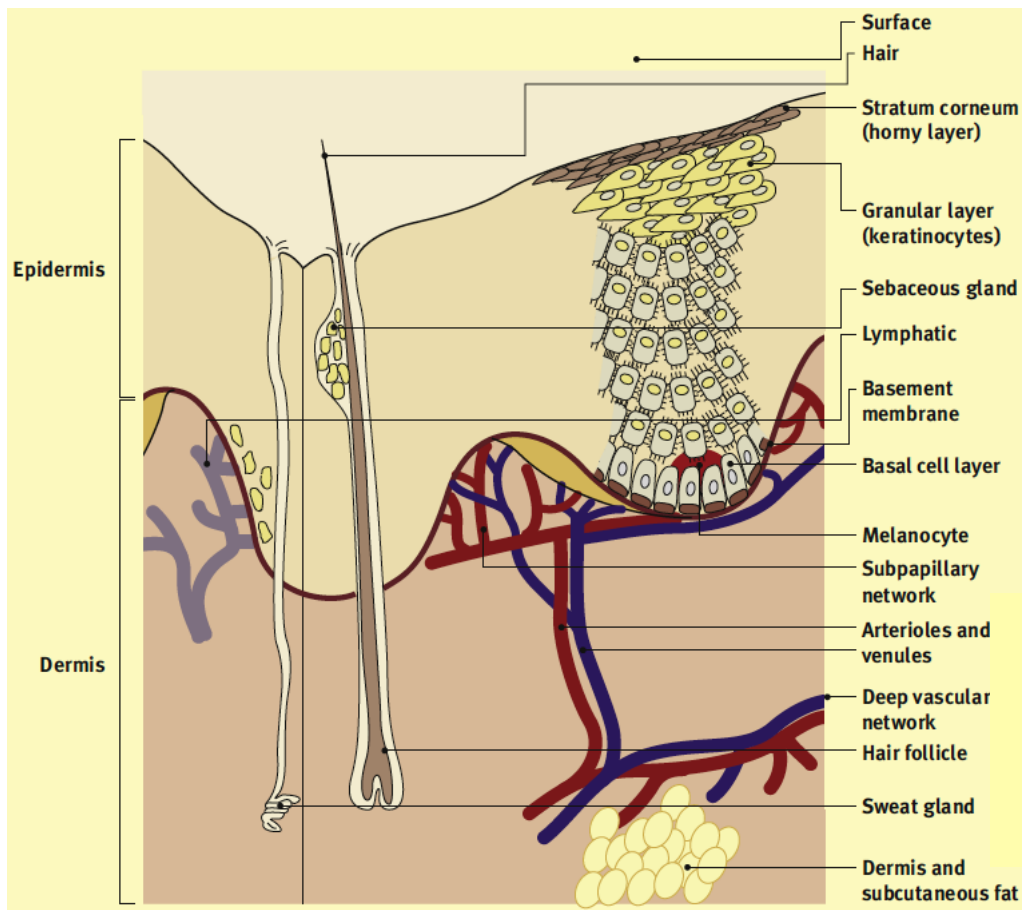


Figure 1. Coupe transversale de la peau. Représentation des différentes structures de la peau : l'épiderme, le derme et le tissu sous-cutané. L'épiderme se subdivise en 4 couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Venus et al., 2010)

Le derme est la couche localisée entre la couche la plus externe, l'épiderme, et la couche la plus interne, l'hypoderme. Son épaisseur est différente en fonction de partie anatomique du corps, variant de 1mm à 5mm. Ce tissu conjonctif contient différents types cellulaires : les fibroblastes et des cellules immunitaires tels que des lymphocytes, des mastocytes et des macrophages. Ce sont les fibroblastes qui synthétisent les protéines fibrillaires comme les collagènes (75% de collagène de type I et 15% de collagène de type II) et l'élastine, donnant cette résistance et cette élasticité à la peau.

L'épiderme, quand à lui, est une couche de la peau constituée principalement de kératinocytes (80%), en contact permanent avec l'extérieur. Dans l'épiderme, les kératinocytes subissent un processus de différenciation, les cellules basales migrent vers la couche cornée, suivant un processus de « kératinisation ». Au cours de ce phénomène, ces kératinocytes synthétisent au niveau cytoplasmique des cytokératines, protéines filiformes en motif hélicoïdal, formant les filaments intermédiaires constitués des plusieurs polypeptidiques enroulés pouvant former des liaisons disulfures. A la fin du processus de kératinisation, les kératinocytes perdent leurs organites cellulaires et le contenu cellulaire est « fortifié ». En effet, dès la couche basale, des filaments de kératines se rassemblent pour donner forme au cytosquelette, où peuvent s'ancrer des desmosomes permettant les jonctions intercellulaires. Ce processus de différenciation induit la mort cellulaire et les kératinocytes deviennent des cornéocytes. L'épiderme est un tissu dynamique de différentes populations cellulaires, qui se renouvelle constamment. On y retrouve diverses structures comme les appareils pilo-sébacés, les ongles et les glandes sudoripares. L'épiderme se subdivise en quatre couches morphologiques plus ou moins distinctes : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (**Fig. 1**) (Kolarsick et al., 2011; Venus et al., 2010).

1.2 Les couches épidermiques et leurs caractéristiques

La couche la plus profonde de l'épiderme est la couche basale. Cette couche est constituée d'une couche de kératinocytes agencés en colonne sur une lame basale. Au sein de cette couche, des cellules basales amplificatrices (cellules souches épidermiques) sont présentes avec une capacité mitotique et une durée de vie importante permettant à l'épiderme d'avoir une capacité de régénération. On y retrouve également des mélanocytes transférant un pigment, la mélanine, dans les cellules voisines. Les cellules basales vont donc proliférer et se différencier pour migrer vers la couche la plus superficielle en 14 jours. Les cellules adhèrent entre elles et à la couche épineuse par le biais de desmosomes (Honari et al., 2017; Kolarsick et al., 2011; Venus et al., 2010).

La seconde couche épidermique, au-dessus de la couche basale, est la couche épineuse. Elle est constituée de plusieurs couches de cellules (de 5 à 10 couches selon la région anatomique). Au point de vue morphologique, ces kératinocytes ont une forme polyédrique avec un noyau rond et s'aplatissent au fur et à mesure qu'ils migrent vers la couche cornée. Les kératinocytes de la couche épineuse produisent des corps lamellaires, organites cellulaires contenant des glycolipides, phospholipides, glycoprotéines, stérols ainsi que différentes enzymes telles que des phosphatases, protéases, lipases, hydrolases et glycolipases. Ce qui donne l'aspect « épineux » de la couche, c'est l'abondance de filaments intermédiaires qui s'attachent aux desmosomes permettant les jonctions intercellulaires, offrant ainsi une résistance à l'épiderme contre les stress physiques. Ces cellules épidermiques présentent également un autre type de connexion, les jonctions communicantes, ce sont des pores intercellulaires jouant un rôle important pour la communication (Honari et al., 2017; Kolarsick et al., 2011; Venus et al., 2010).

Adjacente à cette couche se trouve la couche granuleuse. C'est la dernière couche encore composée de cellules vivantes. L'épaisseur de cette couche varie également selon la localisation anatomique. Par exemple, sous des zones où la couche cornée est mince, la couche granuleuse n'a que quelques couches cellulaires d'épaisseur (2-3) tandis que sous la couche cornée des paumes des mains ou plantes des pieds, elle peut atteindre une épaisseur 10 fois plus grande. Les cellules sont de forme plate avec un cytoplasme rempli de granules de kératohyaline. Ces granules sont de taille variable et sont nécessaires à la fois pour la production de la matrice maintenant les filaments de kératine et de l'enveloppe des cornéocytes. Les granules de kératohyalines ont une action enzymatique permettant la production de kératine « douce » par lésion périodique des filaments de kératine. Contrairement aux cheveux ou aux ongles, où ces granules de kératohyaline sont absents, les filaments vont donc durcir, donnant ce qu'on appelle la kératine « dure » (Honari et al., 2017; Kolarsick et al., 2011; Venus et al., 2010).

La dernière couche épidermique est celle en contact à l'air libre, la couche cornée, constituée de cornéocytes offrant une barrière/protection physique empêchant l'invasion de substances étrangères et la perte d'eau. Les cornéocytes sont des cellules plates ayant perdu leur noyau suite au processus de cornification et sont considérés comme des cellules mortes. La propriété bio-physico-chimique du cornéocyte varie selon sa position dans la couche. Par exemple, les cellules du milieu ont une capacité plus importante pour lier l'eau que les cellules profondes. Elles sont plus compactes avec plus de connexions intercellulaires, car les desmosomes subissent progressivement une dégradation protéolytique, à mesure que les cellules migrent vers la couche cornée. Finalement, les cornéocytes se détachent de l'épiderme, c'est la desquamation. Pour finir à la surface de cette couche cornée, un film lipidique est présent jouant un rôle dans le bon fonctionnement de la barrière épidermique. Ce manteau lipidique tient son origine de deux sources : le sébum produit et sécrété par les glandes sébacées et les lipides épidermiques constituant la couche cornée de l'épiderme (Boer et al., 2016; Honari et al., 2017; Kolarsick et al., 2011; Venus et al., 2010).

1.3 La couche cornée et la barrière épidermique

La couche cornée donnera donc naissance à une barrière cutanée protectrice. Cependant l'état de la barrière épidermique est influencé par ses diverses propriétés bio-physiques : l'hydratation de l'épiderme, la quantité de sébum sécrété, la perte de fluide transépithélial ainsi que le gradient de pH (la couche cornée est acide avec un pH de 4 à 6) entre la surface de la peau et l'intérieur du corps. Il existe une multitude de facteurs pouvant impacter la barrière épidermique tel que l'ethnie, l'âge, le sexe, la région anatomique du corps, les saisons, l'humidité de l'air ambiant, les hormones, etc. De plus, certaines protéines ont une fonction cruciale dans l'efficacité de la barrière cutanée comme la loricrine et la filaggrine. La loricrine est un composant majeur de l'enveloppe cornée (CE). Cette enveloppe commence à se former dans la zone superficielle de la couche granuleuse et termine son assemblage de filaments de kératines et de protéines de la CE (involucrine, filaggrine, loricrine et protéines desmosomales) donnant une cellule cornée. La loricrine est exprimée dans tous les épithéliums stratifiés des mammifères qui sont kératinisés. Elle est produite par les cellules granuleuses. Elle va être fixée de manière covalente sur une autre protéine, l'involucrine, lors de la formation de la CE. L'involucrine, jouant un rôle d'échafaudage de la CE, est exprimée par les cellules granuleuses, qui forment les granules de kératohyaline et la profilaggrine (un

précurseur de la filaggrine). La loricrine joue un rôle essentiel dans le renforcement et la flexibilité de CE et donc au sein la barrière cutanée. Il existe des mutations de la loricrine qui néanmoins n'affectent pas directement la CE. En effet, les mutations de la loricrine altèrent les fonctions du nucléole, ce qui perturbe la voie de différenciation et la mort cellulaire des kératinocytes, pouvant provoquer une hyperkératose, un épaissement anormal de la couche cornée (**Fig. 2**) (Boer et al., 2016; Ishitsuka & Roop, 2020; Kalinin et al., 2001; Nithya et al., 2015).

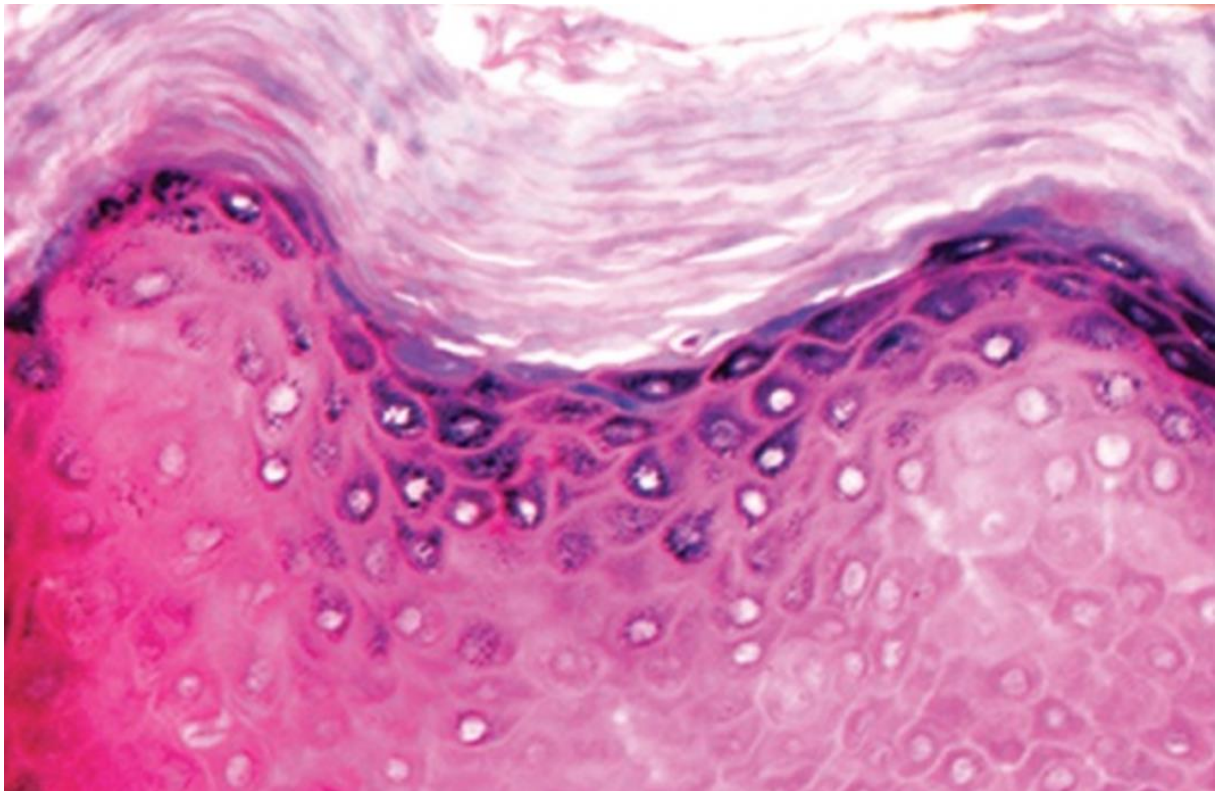


Figure 2. Image représentant une coupe histologique montrant une hyperkératose d'un prépuce humain. L'image montre un tissu épidermique avec une coloration H&E, au grossissement 40x (Nithya et al., 2015).

Une autre protéine tout aussi importante pour la barrière épidermique est la filaggrine. La filaggrine est une protéine épidermique qui s'associe aux filaments de kératine et permet leur agrégation, donnant ainsi la matrice cornéocytaire. Elle est produite à partir de profilaggrine stockée dans les granules de kératohyalines et constituée de répétition de 10 à 12 filaggrines dans sa région centrale. La profilaggrine est clivée en monomères de filaggrine au cours de la différenciation (kératinisation) des kératinocytes de la couche granuleuse à la couche cornée. La filaggrine permet d'agréger les filaments de kératine mais également de maintenir l'homéostasie épidermique par le biais de ses produits de dégradation, comme la photoprotection de la peau, l'hydratation de la peau et l'acidification de la couche cornée (permettant d'empêcher la colonisation de pathogènes exogènes). Il a été montré qu'une déficience en cette filaggrine impacte la fonction de la barrière cutanée, pouvant induire des pathologies atopiques, ainsi que favoriser les infections microbiennes. Cette carence en filaggrine peut être d'origine génétique mais peut aussi être causée pour plusieurs facteurs tels que des facteurs environnementaux, le microenvironnement cutané, une faible humidité ou

des dommages mécaniques. Cette carence en filaggrine a diverses conséquences, à la fois sur l'organisation et sur la fonction de l'épiderme. Les tissus déficients révèlent une réduction du nombre de granules de kératohyaline et de l'épaisseur de l'épiderme. De plus, une perturbation de la matrice intracellulaire des cornéocytes a été remarquée, entraînant une baisse d'imperméabilité de la barrière. Suite à cela, on retrouve un mécanisme compensatoire afin de réagir face aux défauts de barrière épidermique, avec une régulation positive de l'expression de protéines de jonction cellulaire. Cette déficience en filaggrine a montré une part d'implication dans des maladies inflammatoires de la peau. En effet, des études ont démontré que les modifications génétiques avec des mutations touchant le gène de la filaggrine humaine (FLG) ont un lien de causalité avec les maladies atopiques où il y a un problème de barrière épidermique, notamment la dermatite atopique (Cabanillas & Novak, 2016; Cau et al., 2017; Kezic & Jakasa, 2016; Kezic et al., 2014; Leung, 2013; Tsakok et al., 2019).

1.4 La dermatite atopique et sa physiopathologie

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire chronique de la peau touchant environ 230 millions d'individus dans le monde, affectant 20% d'enfants en bas âge (environ 70% de cas de DA débute chez les enfants de moins de 5 ans) et 2 à 10% des adultes. Ces enfants atteints de DA montrent une prédisposition à d'autres maladies, 30% des cas développent de l'asthme et 35% développe de la rhinite allergique. On observe également une prédisposition de ces enfants aux infections comme le *Staphylococcus aureus* et certains virus tel que l'*Herpes simplex virus* (HSV). Extérieurement, la DA est caractérisée par la présence d'érythème avec la présence d'un œdème, de vésicules et d'un épaissement de la peau (**fig. 3**).



Figure 3. Photographies de peau de patients atteints de dermatite atopique. (a) L'image d'une peau de patient atteint de dermatite atopique avec la présence d'un érythème et des vésicules. (b) L'image montre une peau de patient atteint de dermatite atopique avec un épaissement cutané et la présence de desquamation sur l'avant de la cheville (Williams, 2005).

La physiopathologie de la DA s'explique par une altération de la barrière épidermique, un dysfonctionnement de la réponse immunitaire et l'implication de facteurs environnementaux. Par ailleurs, une étude GWAS prouve que la génétique est impliquée dans l'altération de la barrière, avec un risque d'hérédité de la DA avec la transmission de mutations affectant les gènes responsables de la barrière (comme le gène de la filaggrine ou d'autres protéines barrières). Ce défaut de la barrière épidermique, ainsi qu'une réponse immunitaire anormale conduisent à un cercle vicieux qui est à l'origine des lésions ; mais malgré de nombreuses études sur l'origine de la maladie, la cause exacte de ce cycle reste inconnue à ce jour. Toutefois, il existe deux hypothèses qui sont proposées pour expliquer l'origine de ce cercle vicieux. Pour ces deux hypothèses, la résultante est une déficience de la barrière épidermique offrant une perméabilité pour les pathogènes et les allergènes dans l'épiderme. Cette pénétration de corps étrangers induit la libération de TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) activant les cellules dendritiques (cellules de Langerhans), qui vont lier l'antigène. Ces cellules vont par la suite interagir et présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs. Ces lymphocytes T se différencieront par la suite en cellules Th2 et migreront dans le derme afin de sécréter des cytokines de type Th2 comme les interleukines (IL) 4 et 13 (**Fig. 4**). Ces IL-4 et IL-13 sont en partie responsables de l'altération du phénotype des kératinocytes et de la barrière cutanée causant le cercle vicieux de la maladie. La première hypothèse, l'hypothèse « inside-outside », explique qu'un dysfonctionnement du système immunitaire conduit à une inflammation cutanée. Cet environnement pro-inflammatoire est dû aux cytokines Th2 produites par les cellules immunitaires. Ces cytokines vont interagir avec les kératinocytes de l'épiderme et induire la libération de TSLP. In fine, l'inflammation conduit à des troubles du phénotype des kératinocytes, une altération de la barrière épidermique et une possible colonisation de l'épiderme par des pathogènes, ce qui entretiendrait cette inflammation. A l'inverse, la seconde hypothèse, « outside-inside », consiste à dire que l'origine du cycle viendrait d'une déficience de l'épiderme et de la barrière, causée notamment par des défauts de lorricrine, de filaggrine, d'involucrine, de kératine 10, de composition lipidique, etc. De plus, il a été montré que la peau des patients atteints de DA révèle une augmentation du taux d'interleukine(IL)-4 et d'IL-13. Une étude récente (Almong Bitton et al., 2020) révèle l'implication du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 dans la DA, montrant le rôle important de l'IL-4 et de l'IL-13 dans la physiopathologie de la DA caractérisée histologiquement par une spongiose, une hypogranulose et une hyperplasie de l'épiderme (**fig. 5**)(Andrews et al., 2009; Bitton et al., 2020; Huet et al., 2018; Kezic et al., 2014; Leung, 2013; Tsakok et al., 2019; Williams, 2005).

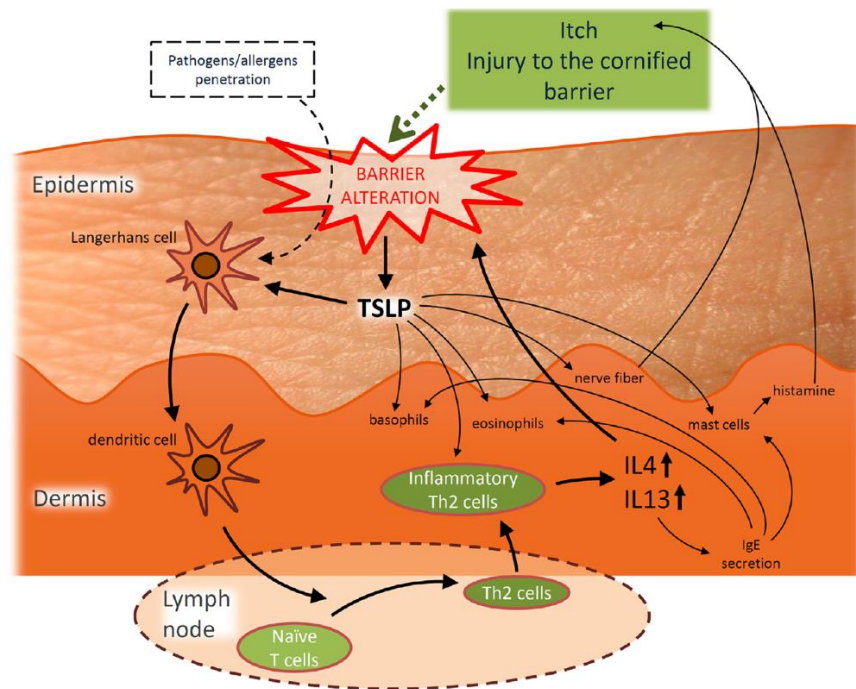


Figure 4. Schéma représentant l'hypothèse « inside-outside » et « outside-inside » à l'origine du cercle vicieux impliqué dans la physiopathologie de la DA (De Vuyst et al., 2017).

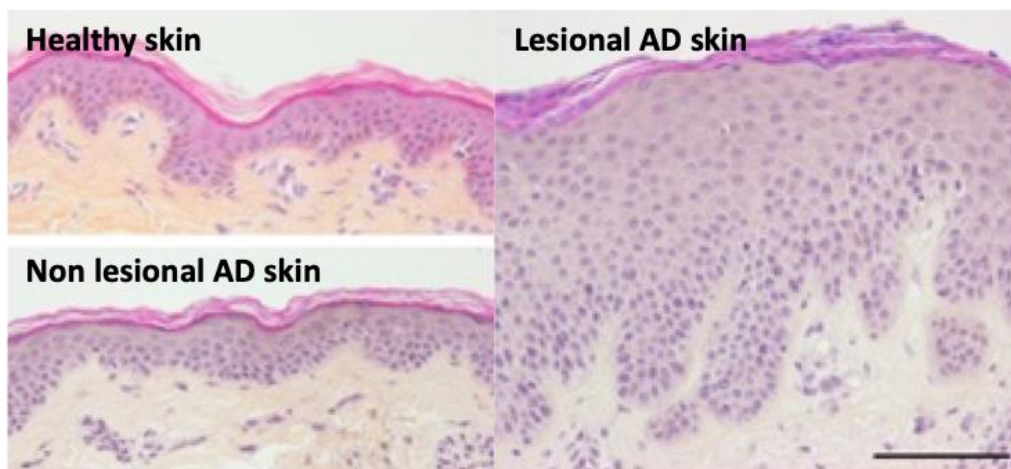


Figure 5. Représentation de la morphologie des peaux saines, des peaux non-lésionnelles de la DA et des peaux lésionnelles de la DA. Une coloration hématoxyline/éosine/safran (HES) a été réalisée sur des coupes de peaux saines, de peaux non-lésionnelles et de peaux lésionnelles de patients atteints de la DA (Malaisse et al., 2014).

Par conséquent, dans les peaux de patients atteints de DA, nous retrouvons une libération importante d'IL-4 et d'IL-13 induisant un environnement inflammatoire et par conséquent la maladie. Habituellement, les traitements thérapeutiques utilisés pour traiter les patients atteints de DA sont les corticostéroïdes, les émoullients, les inhibiteurs de la calcineurine, les

antibiotiques, la luminothérapie UV ou les agents immunosuppresseurs. On peut aussi utiliser le Dupilumab (Dupixent, un anticorps contre l'IL-4R α) pour traiter les cas graves de DA. De plus, il a été démontré que la voie JAK-STAT, associée aux récepteurs aux IL-4 et IL-13, joue un rôle essentiel dans le déséquilibre immunitaire de cette pathologie, l'inhibition de cette voie semble être une stratégie thérapeutique intéressante. De récentes études dévoilent des molécules pouvant jouer ce rôle, les inhibiteurs de JAK, qui sont toujours en phase clinique. Il en existe de différentes sortes avec des spécificités qui diffèrent selon les JAK (**Tableau 1**). Parmi les plus couramment rencontrés, nous retrouvons des inhibiteurs comme l'Abrocitinib, le Tofacitinib, le Ruxolitinib, le Baricitinib, l'Upadacitinib et le PF-04965842 (Bakker et al., 2021; Bieber et al., 2021; Bissonnette et al., 2016; Bitton et al., 2020; Ferreira et al., 2020; Gadina et al., 2018; Kim et al., 2020; Tsakok et al., 2019; Williams, 2005)(Kim, 2020).

Tableau 1. Les différents inhibiteurs de JAK et les JAK cibles (Gadina et al., 2018).

Inhibitors	JAK3	JAK1	JAK2	TYK2
Tofacitinib	×	×	×	
Ruxolitinib		×	×	
Baricitinib		×	×	
Peficitinib	×	×	×	
Momelotinib			×	
Fedratinib			×	
Filgotinib		×		
Upacitinib		×		
Itacitinib		×		
PF-06651600	×			
BMS-986165				×
PF-06700841		×		×

1.5 Les récepteurs aux interleukines 4 et 13

L'IL-4 et l'IL-13 sont produites par des cellules lymphoïdes de type II qui sont stimulées telles que les cellules T CD4, les éosinophiles, les basophiles ou les mastocytes. Ils jouent un rôle important en cas de réponse immunitaire suite à l'entrée d'un agent pathogène ou d'un allergène. Ces IL-4 et IL-13 sont les cytokines Th2 caractéristiques d'une réponse inflammatoire de type II. Cette réponse inflammatoire est déclenchée lors de la pénétration de facteurs exogènes (comme les pathogènes ou les allergènes). Les modifications épigénétiques se montrent essentielles à la production d'IL-4 et IL-13. En effet, le locus cytokine Th2, étroitement régulé par une région de contrôle de locus (LCR), est crucial pour la production d'IL-4 et IL-13 in vivo chez les cellules T CD4. Suite à une stimulation cellulaire appropriée, la région LCR est modifiée épigénétiquement, donnant aux facteurs de transcription accès à l'ADN, permettant ainsi la transcription des deux cytokines Th2 (Junttila, 2018; Koh et al., 2010; Zhu, 2015).

L'IL-4 et l'IL-13, libérées par les cellules T, jouent un rôle de ligand pour des récepteurs spécifiques. L'IL-4 se lie avec une haute affinité à la sous-unité (SU) IL-4R α formant un complexe IL-4/IL-4R α . Ce complexe est capable de se dimériser avec une faible affinité à une autre SU. En effet, IL-4/IL-4R α va pouvoir se dimériser avec IL-2R γ formant le récepteur de type I de l'IL-4 (IL-4R α /IL-2R γ) ou le récepteur de type II de l'IL-4 et de l'IL-13 (IL-4R α /IL-13R α 1) par dimérisation avec le SU IL-13R α 1 (Bitton et al., 2020; Junttila, 2018; Zhang et al., 2002). Une fois le récepteur complètement dimérisé, il y a un changement conformationnel du récepteur induisant l'activation des Janus Kinases (JAK1 pour IL-4R α , JAK3 pour IL-2R γ et JAK2/TYK2 pour IL-13R α 1), qui sont autophosphorylées. Les protéines JAK phosphorylent les récepteurs permettant le recrutement et l'activation de facteurs de transcription, les molécules STAT (STAT1, STAT3 et STAT6), qui s'homodimérisent pour transloquer dans le noyau (Fig. 6). De plus, la molécule IRS (insulin receptor substrat) est recrutée sur le récepteur phosphorylé pour activer les voies PI3K/AKT et MAPK (Gadani et al., 2012; Junttila, 2018; Yuan, 2019). Comme pour l'IL-4, l'IL-13 peut également interagir avec le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1. Puisque l'IL-13 a une plus grande affinité pour l'IL-13R α 2 que pour l'IL-13R α 1, l'IL-13R α 2 est considéré comme un récepteur antagoniste en bloquant la signalisation de l'IL-13 par compétition (Yuan, SM, 2019 ; Almong Bitton, A. et al. , 2020). Il est important de signaler que certaines études révèlent l'induction de l'expression d'IL-13R α 2 et IL-2R γ après un traitement des kératinocytes avec IL-4 et IL-13 (David et al., 2001; De Vuyst et al., 2018).

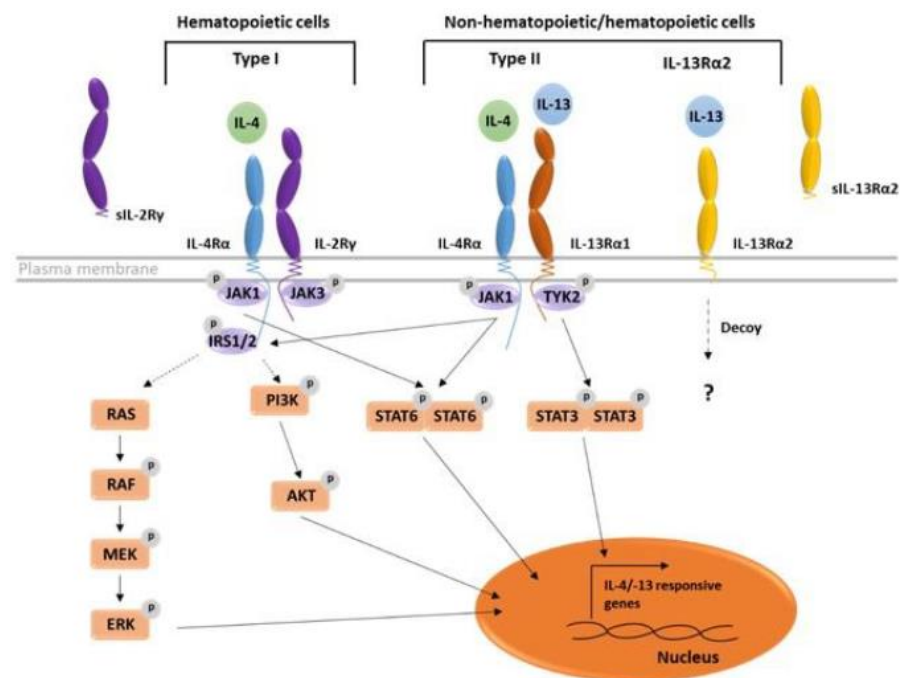


Figure 6. Représentation des voies de signalisation des différents récepteurs aux IL-4 et IL-13 (Progneaux A., recherche doctorale, URPhyM-NARILIS, Université de Namur, Belgique).

1.6 Le modèle utilisé pour notre projet

A l'heure actuelle, il existe toute une panoplie de modèles *in vitro* possibles afin d'étudier une maladie. On retrouve deux grands groupes, les modèles en deux dimensions (2D) et les modèles en trois dimensions (3D). Ces modèles s'avèrent très utiles pour étudier des maladies affectant un seul type cellulaire (comme les kératinocytes ou les fibroblastes, par exemple). Tout d'abord, les modèles 2D correspondent à la culture d'un seul type cellulaire. Ces derniers sont les modèles *in vitro* disponibles les plus simples afin d'étudier un phénomène cellulaire impliqué dans la mise en place de maladies inflammatoires de la peau. Ces modèles permettent d'évaluer ce qui se passe dans un type cellulaire bien précis à un moment précis. Cependant, ces modèles 2D ont une limite majeure, c'est qu'ils ne prennent pas en compte toute la complexité et les interactions que l'on retrouve au sein d'un tissu. De plus, les modèles 2D ne sont pas capables de reproduire les caractéristiques d'une maladie. Ils ne fournissent également aucune information à propos des protéines intervenant dans la structure 3D d'un épiderme. Dans le cas de la DA, il existe différents modèles 2D, les principaux utilisés sont ceux construits à partir de cultures en monocouches de kératinocytes ou à partir de cultures de cellules immunitaires (tels que les lymphocytes, les mastocytes, les éosinophiles ou d'autres cellules impliquées dans la réaction immunitaire au niveau de la peau chez un patient atteint de DA). Il y a également d'autres modèles *in vitro* plus complexes, les modèles 3D, dans le but de réaliser une étude, de l'étiologie d'une maladie par exemple, dans un tissu reconstruit. Afin de reproduire un épiderme avec les différentes stratifications et une barrière cutanée fonctionnelle, les kératinocytes primaires peuvent être récupérés suite à la biopsie d'un patient malade et doivent être cultivés dans un environnement bien précis. D'un côté, les kératinocytes doivent être en contact avec l'air, c'est ce qu'on appelle l'interface air/liquide, et de l'autre côté les cellules doivent être en contact avec un milieu de culture adéquat (milieu Epilife®). Ainsi, ils seront capables de se différencier et de reconstruire un tissu. Actuellement, les deux modèles 3D les plus couramment utilisés sont l'épiderme reconstruit humain (RHE) et la peau reconstruite humaine (HSE). Le RHE est un modèle 3D composé uniquement de kératinocytes, développé sur un filtre en polycarbonate inerte contenant des pores de 0,4 μm (**Fig. 7**). C'est grâce à ce filtre poreux que les kératinocytes peuvent être cultivées en interface air/liquide, les cellules étant en contact avec l'air (en reposant sur le filtre) et avec le milieu (dû à la porosité du filtre). Les HSE, eux, sont des modèles plus complexes encore. Ils sont habituellement constitués de kératinocytes reproduisant l'épiderme et de fibroblastes composant le derme. Pour ce faire les kératinocytes serontensemencés sur une matrice de type dermique initialement générée à partir d'une matrice de collagène contenant des fibroblastes ou d'un derme désépidermisé (**Fig. 8**). Par ailleurs, des modèles knock down peuvent être élaborés à partir de modèles 3D en utilisant les ARN interférents comme les siARN ou les shARN. Une autre approche pour la manipulation génique, qui est de plus en plus utilisée, afin de générer des lignées knock out, est la technique CRISPR-Cas9. Toutefois, ces modèles 3D arborent également des limites. Les kératinocytes primaires, utilisés pour les modèles 3D, ne peuvent exécuter que quelques passages. Ces modèles 3D ne sont pas représentatifs de toute la complexité mécanique de la peau humaine, avec tous les différents niveaux d'interaction cellulaire (De Vuyst et al., 2016; De Vuyst, 2018; De Vuyst et al., 2017; Hennies & Poumay, 2021; Huet et al., 2018; Mathes et al., 2014; Sriram et al., 2019).

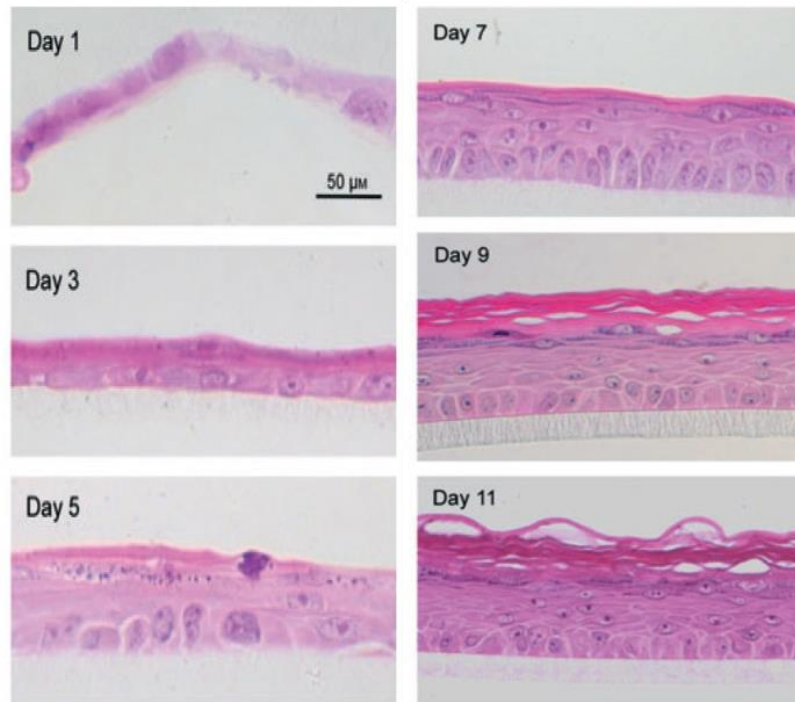


Figure 7. Représentation de coupes histologiques d'épiderme reconstruit humain (RHE). Les coupes ont été effectuées RHE de 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours suite à l'ensemencement de kératinocytes sur des filtres en polycarbonate. Les épidermes ont été fixés dans du formaldéhyde et inclus dans de la paraffine. Une coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) ont été réalisées. Les coupes ont été observées par microscope Olympus AX70 (échelle 50 µm) (Frankart et al., 2012).

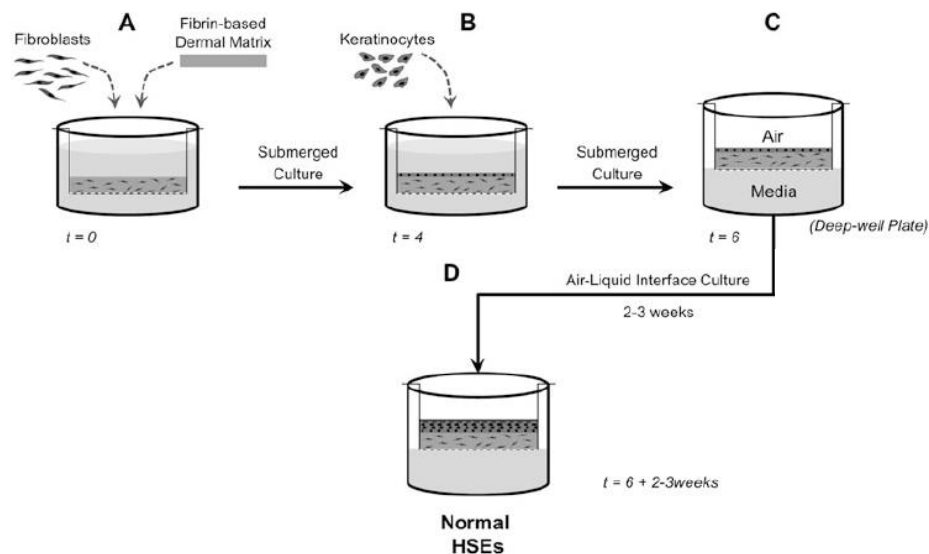


Figure 8. Représentation schématique du processus de reconstruction de peau humaine (HSE) (a) La matrice dermique est fabriquée à base de fibrine et de fibroblastes humains primaires dans une matrice tridimensionnelle à base de fibrine. (b) Après 4 jours, les kératinocytes sont ensemencés au-dessus de la matrice dermique et sont maintenus immergés. (c) Pour démarrer la différenciation et la stratification des kératinocytes, les tissus sont déposés dans une plaque à puits profond et cultivés en interface air-liquide pendant 2-3 semaines (Sriram et al., 2019).

Parmi tous ces modèles *in vitro*, le modèle 3D RHE paraît adéquat pour étudier le lien de causalité ente les interleukines 4 et 13 et l'altération de l'intégrité de la barrière épidermique, ainsi que la modification phénotypique des kératinocytes observée durant l'étude de la physiopathologie de la DA. Les avantages du modèle RHE sont de permettre la simplification d'une étude de situation *in vivo*, car il n'est composé que de kératinocytes en culture. Il permet de tester l'effet local d'un traitement, en réduisant l'utilisation de modèles animaux. De plus, les RHE ont pu reproduire les caractéristiques de la DA après un traitement avec l'IL-4 et l'IL-13 comme la spongiose, l'hypogranulose (**Fig. 9**) et l'altération de la barrière cutanée. Concernant le niveau d'expression génique, le RHE traité aux IL-4, IL-13 et IL-25 révèle une expression diminuée de la filaggrine (FLG), de la loricrine (LOR) et de la kératine 10, ainsi qu'une expression augmentée de l'anhydrase carbonique (CA2), de nel-like type 2 (NELL2) et de l'acide hyaluronique synthase (HAS3), conformément au profil typique des lésions de la DA. Cependant, il y a aussi quelques limites à l'utilisation du modèle RHE. Tout d'abord, ce modèle ne reproduit qu'une partie essentiellement épidermique des caractéristiques de la pathologie. De ce fait, il est impossible de reconstruire une véritable réponse immunitaire car les cellules immunitaires sont absentes du modèle. De plus, le modèle ne reproduit pas une barrière épidermique à l'identique de *l'in vivo* où se trouve le sébum produit par les glandes sébacées de la peau. Enfin, le modèle ne prend pas en compte les facteurs environnementaux (savon, pollution, etc.) ou le stress psychologique (De Vuyst et al., 2015; De Vuyst et al., 2016; De Vuyst, 2018; De Vuyst et al., 2017; Huet et al., 2018; Rouaud-Tinguely et al., 2015).

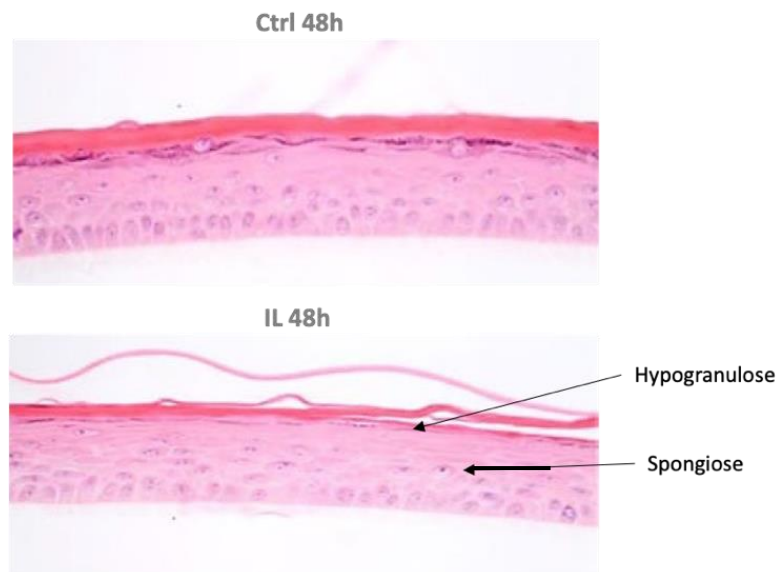


Figure 9. Etudes de la morphologie dans les RHE traités aux ILs. Comparaison de RHE non traité (Ctrl 48h) par rapport au RHE incubé 48h avec les IL-4, IL-13 et IL-25 (IL 48h). Les micrographies sont représentatives de 3 cultures indépendantes. L'échelle = 50µm. (De Vuyst et al., 2018).

1.7 Objectifs du projet

En résumé d'après la littérature, il existe trois récepteurs pour les cytokines de type Th2 IL-4 et IL-13 : le récepteur IL-4R α / IL-2R γ de type I, le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 de type II et le récepteur l'IL-13R α 2 qui semble plutôt antagoniste. Des études ont démontré plusieurs liens entre les IL-4/IL-13 et la physiopathologie de la DA. Tout d'abord, un haut

taux en IL-4 et IL-13 a été relevé dans la peau de patients atteints de la DA, montrant l'implication de ces ILs dans la condition inflammatoire. Ensuite, il a été possible de mimer le phénotype de la DA dans un modèle de RHE exposé aux IL-4 et IL-13, car on y observe une altération du phénotype des kératinocytes et du tissu épidermique menant à une altération de la barrière épidermique (De Vuyst, E. et al., 2018). Enfin, il a été démontré que les IL-4 et les IL-13 induisent l'expression génique du récepteur de type I et du récepteur IL-13R α 2 dans un modèle RHE, reconstruit au sein de notre laboratoire (Progneaux A., recherche doctorale, URPhyM-NARILIS, Université de Namur, Belgique).

Toutes ces données considérées ensemble nous ont amenés à proposer l'hypothèse selon laquelle le récepteur de type II, IL-4R α /IL-13R α 1, pourrait être impliqué dans la modification phénotypique des kératinocytes et donc participer à la physiopathologie de la DA. Etant donné que le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 est un récepteur interagissant avec ces IL-4 et IL-13. L'objectif de notre projet avait pour but de tester cette hypothèse en investiguant l'intervention du récepteur de type II dans les altérations morphologiques et phénotypiques des kératinocytes, reproduites à l'aide d'un modèle 3D RHE. Dans ce but, nous avons d'abord étudié une lignée cellulaire de kératinocytes immortalisés N/TERT knock-out, dont le gène *IL13RA1* a été édité (excision d'une région codante) en utilisant la technique CRISPR-Cas9 développée par Audrey Progneaux et Céline Evrard dans notre laboratoire. Il a déjà été montré dans la littérature que les kératinocytes N/TERT sont capables de se différencier et de reconstruire des épidermes avec une barrière fonctionnelle, qui réagissent aux IL-4 et IL-13, comme les RHE reconstruits à partir de cellules primaires (Smits, J. P. et al., 2017). Ainsi pour ce projet, deux clones identifiés comme KO ont été amplifiés, vérifiés par séquençage, et enfin sélectionnés pour analyser les conséquences d'une délétion du gène *IL13RA1*. Après 11 jours de reconstruction, les RHE KO ont été exposés aux IL-4 et IL-13. Dans un second temps, des RHE reconstruits à partir de kératinocytes primaires normaux ont été exposés également aux IL-4 et IL-13. Dans ce cas, les RHE ont été prétraitées avec trois inhibiteurs de JAK séparément (le tofacitinib, l'upadacitinib et le ruxolitinib) dans le but d'inhiber l'activation de la signalisation dépendant du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1, dont on suppose l'activation en présence des IL-4 et IL-13. Ceci nous a permis d'investiguer l'implication du récepteur de type II en bloquant son activation par un autre mécanisme que l'édition du gène *IL13RA1*, tout en nous rapprochant toujours un peu plus d'une condition in vivo grâce à l'emploi de cellules primaires.

Afin de mettre en évidence l'implication du récepteur de type II dans l'inflammation et la modification du phénotype des kératinocytes, diverses investigations ont été réalisées en utilisant les cellules KO pour *IL13RA1* et les inhibiteurs de JAK. Tout d'abord, nous avons vérifié, par des observations morphologiques en microscopie, que nous obtenions effectivement un épiderme normal avec une barrière cutanée intègre et fonctionnelle. Puis, nous avons étudié l'intervention du récepteur de type II dans l'altération de l'expression relative en ARNm du récepteur de type I, du récepteur IL-13R α 2 et des gènes caractéristiques de la DA (*CA2*, *NELL2* et *HAS3*), ainsi que les gènes ayant un rôle dans la mise en place de la barrière cutanée (filaggrine et loricrine). Nous avons exploré également l'activation de différentes voies de signalisation tel que STAT6, STAT3, ERK et AKT, afin de nous informer sur la fonctionnalité du récepteur de type II. Pour finir, nous avons analysé l'intégrité de la barrière épidermique par des mesures de la résistance électrique transépithéliale des épidermes reconstruits à l'aide d'un volt-ohmmètre. Les altérations de la barrière ont été aussi investiguées par microscopie à fluorescence avec un marquage fluorescent biotine-streptavidine des RHE.

2. Matériel et méthodes

2.1 Cultures cellulaires, construction d'épidermes reconstruits et exposition aux IL-4 et IL-13

Lors de ce projet, deux types cellulaires différents ont été utilisés pour reconstruire des épidermes. Tout d'abord, des kératinocytes primaires ont été isolés d'abdominoplastie d'un patient sain, les cellules NAK220 (Normal Abdominoplastie Keratinocytes) du patient n°220. Ces prélèvements humains ont été obtenus suite au consentement éclairé du dit patient et ont été réalisés à la Clinique St-Luc de Namur en Belgique par les Drs B. Bienfait et J.S. Blairvacq. Cependant, étant donné le potentiel limité de prolifération des kératinocytes primaires, une lignée immortalisée a été également utilisée afin de générer des kératinocytes knock-out par édition de leur génome via une approche CRISPR-Cas9. Les kératinocytes immortalisés N/TERT ont été employés pour leur capacité à pouvoir reproduire un épiderme *in vitro* comme les kératinocytes primaires (Smits et al., 2017).

Pour commencer, les kératinocytes primaires et immortalisés ont été cultivés jusqu'à 80% de confluence dans un milieu Epilife® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) complété avec du HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement ; contenant tous les facteurs de croissance et extraits tissulaires nécessaires à la culture de kératinocytes humains) (Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA) et de la pénicilline 50 U/ml et de la streptomycine 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) dans des flasks T175. Ces cultures ont été incubées à 37°C et le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Une fois la confluence assez haute, les cellules ont été récupérées afin de commencer la reconstruction d'épidermes. Les kératinocytes ont été trypsinisés à 37°C pendant 5 minutes avec 5 ml de trypsine, inactivée par la suite par une solution bloquante (10 ml Solution A et 2% de FBS, Fetal Bovine Serum). Pour la mise en place des cultures RHE (reconstructed human epidermis), 500 µl de cellules diluées dans du milieu Epilife® complété avec des ions calcium (50 µg/ml) ont étéensemencées dans un insert, sur un filtre en polycarbonate dont le diamètre des pores est de 0,4 µm. Pour les cultures primaires, 150 000 kératinocytes ont étéensemencés et pour les cultures immortalisées N/TERT, 250 000 cellules. Dans chaque puits, 2,5 ml de milieu Epilife® complété avec du calcium (50 µg/ml) a été ajouté. Après incubation pendant 24h à 37°C, la mise en place de l'interface air/liquide des RHE a été établie en retirant le milieu au-dessus du filtre. Cette interface permet de mettre les kératinocytes dans les mêmes conditions que celles *in vivo*, mettant les kératinocytes en contact avec l'air et permettant ainsi de déclencher la reconstruction de l'épiderme. Ensuite, les 1,5 ml de milieu Epilife® complété avec du calcium (50 µg/ml), de la vitamine C (50 µg/ml) et du KGF (50 µg/ml) ont été changés tous les deux jours jusqu'à reconstruction d'un épiderme après 11 jours d'incubation à 37°C.

2.2 Construction de lignées cellulaires knock-out (KO) pour le gène *IL13RA1* par la technique CRISPR-Cas9

Le génome des kératinocytes immortalisés N/TERT a été édité par la technique CRISPR-Cas9 afin de générer des cellules knock-out (KO) pour le gène *IL13RA1* (*IL13RA1*-0). Le protocole est une version modifiée de Integrated DNA Technologies, Corvalville, IA (IDT), qui a été utilisée et mise au point par Céline Evrard dans notre laboratoire URPhyM-NARILIS, LabCeTi, Namur (Evrard et al., 2021).

Techniquement, des complexes crRNA-tracrRNA ont été formés avec un mélange de tracrRNA (IDT, Iowa, USA ; 200 μ M) et crRNA (IDT, Iowa, USA ; 200 μ M) à 95°C pendant 5 minutes puis laissés à refroidir à température ambiante 10 minutes. Les crRNA sont des ARN CRISPR produits à partir du gène *CRISPR* jouant le rôle d'ARN guide pour la protéine Cas9. Les tracrRNA, eux, sont des ARN CRISPR transactivants permettant la maturation du pré-crRNA en crRNA. Les crRNA sont construits par le biais de <http://crispor.tefor.net/> , <https://zlab.bio/guide-design-resources> et de eu.idtdna.com et cible l'exon 1 et l'exon 11 du gène *IL13A1* (**Tableau. 2 ; Fig. 10a**). Une fois le complexe formé, une endonucléase, la Cas9, a été ajoutée (IDT, Iowa, USA) pour former, par hybridation du complexe et de la Cas9, des ribonucléoprotéines (RNP). Cela dure 10 à 20 minutes à température ambiante. Après 70 % de confluence, les cellules N/TERT ont été trypsinisées et 175 000 cellules ont été transfectées par des RNP par électroporation "Amaxa Human Keratinocyte Nucleofector Kit" (Lonza, Bâle, Suisse) en utilisant le programme T-24. Après 24h d'incubation à 37°C, une population de cellules monoclonales KO a été générée par dilution limite dans une plaque 96 puits (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Suite à la dilution, une population monoclonale de cellules N/TERT a été obtenue. Une partie de ces cellules a été lysée par un tampon de lyse (Tris HCl pH8 0,1 M, EDTA 5 mM, SDS 0,2% et NaCl 0,2M) et un protéinase K (100 μ g/ml) et l'autre partie congelée pour de futures cultures. Par après, l'ADN a été extrait du lysat en vortexant vigoureusement et centrifugeant à Vmax 5 minutes à température ambiante avec du phénol-chloroforme et chloroforme 100%. De l'acétate de sodium 3M et de l'éthanol 100% ont été ensuite ajoutés au lysat. Pour récupérer l'ADN, le lysat a été vortexé et gardé 30 minutes à -80°C pour précipiter l'ADN et a été centrifugé 15 minutes à Vmax à température ambiante. Le culot d'ADN a été rincé par 70% d'éthanol avant d'être suspendu à nouveau dans 10 μ l d'H₂O. Un dosage de l'ADN a été réalisé par un spectrophotomètre microvolume NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). La délétion pour le gène *IL13A1* a été amplifiée par PCR à l'aide de 20 μ l de mix PCR contenant 10 μ l de GoTaq ou DreamTaq, 1 μ l de primer Forward et Reverse (**Tableau. 3**), 1 μ l d'ADN 50ng et 7 μ l d'eau. Les produits PCR ont été séquencés par séquençage de Sanger afin d'identifier les populations monoclonales avec une grande délétion entre l'exon 1 et l'exon 11. De ce fait, les clones 4 et 10 ont été sélectionnés (**Fig. 10b**)

2.3 Traitement aux IL-4 et IL-13 des épidermes reconstruits

Afin de mimer une condition inflammatoire caractéristique de la DA, les RHE ont été incubés aux IL-4 et IL-13. Les RHE reconstruits par les kératinocytes immortalisés ont été traités dans une plaque 24 puits avec 500 μ l de milieu Epilife®, complétés avec du calcium (1,5 mM), de la vitamine C (50 μ g/ml) et KGF (50 μ g/ml), auxquels on ajoute les IL-4 et IL-13 (50 ng/ml) (PreproTech, New Jersey, USA). Les RHE ont été incubés à 37°C avec différents temps d'incubation (15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 24 heures ou 48 heures). En ce qui concerne les RHE reconstruits par les kératinocytes primaires, un traitement supplémentaire s'ajoute à celui des interleukines de type 2. Les cellules primaires ont été prétraitées avec 3 différents inhibiteurs de JAK : le Tofacitinib (1 μ M), l'Upadacitinib (0,2 μ M) et le Ruxolitinib (1 μ M) avant l'exposition aux IL-4 et IL-13 (50 ng/ml).

2.4 Mesures de la résistance électrique transépithéliale (TEER)

La mesure de la résistance électrique transépithéliale s'opère grâce à l'utilisation d'électrodes afin de mesurer l'impédance électrique entre les deux compartiments de part et d'autre de l'épiderme. Une fois le tissu reconstruit sur le filtre en polycarbonate, nous obtenons un

épiderme composé de cellules accolées, avec des jonctions cellulaires serrées, donnant naissance à la barrière. Cette résistance électrique mesurée représente la perméabilité de la barrière de notre modèle d'épiderme humain *in vitro*.

Des électrodes STX (STX01 et STX04) (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA) ont été utilisées pour prendre les mesures électriques. Afin de calibrer l'appareil, un test du système a été exécuté. Pour ce faire, une électrode test STX04 a été connectée afin d'étalonner la mesure à 1000 ohms, dans le cas contraire, l'appareil a été ajusté. Ensuite, les électrodes STX01 ont été connectées à l'appareil et ont été stérilisées avec de l'éthanol 70 %. Les RHE ont été placés dans une boîte de pétri contenant 5 ml de milieu de culture Epilife® préalablement chauffé à 37°C. Afin de prendre les mesures de résistance électrique, 500 µl de milieu Epilife® ont été prélevés des 5 ml et ajoutés au-dessus de l'épiderme. Les électrodes STX01 sont disposées de part et d'autre de l'épiderme. L'écran indique la valeur finale de la résistance électrique transépithéliale de l'épiderme reconstruit. Les résistances électriques ont été mesurées à l'aide d'un volt-ohmmètre Millicell® ERS-2 (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA).

2.5 Enrobage en paraffine et préparation de coupes histologiques

Afin de permettre l'observation en microscopie de fines coupes histologiques de tissus biologiques, les échantillons ont été inclus puis enrobés dans la paraffine. Par la suite, ces blocs de paraffine ainsi formés, emprisonnant un échantillon d'intérêt, sont coupés à l'aide d'un microtome pour générer de fines coupes histologiques de l'ordre de 6 µm.

Concrètement, une fois l'épiderme reconstruit, il a été fixé dans une solution de formol acétique pendant minimum 24 heures à température ambiante. Après la fixation, les échantillons ont été déshydratés avec 3 bains successifs de méthanol de 10 minutes. Suite à cela, les filtres polycarbonates avec les épidermes ont été détachés de l'insert à l'aide de toluol. Par après, ces échantillons ont été placés entre deux mousses dans une cassette en plastique et ont été mis à incuber dans 3 bains successifs de toluol pendant 10 minutes. Les épidermes ont été retirés des cassettes et ils ont été inclus pendant 1 heure dans un moule rempli de paraffine. Les échantillons ont ensuite été placés dans de nouveaux moules remplis de paraffine. Ces nouveaux moules ont été placés sur une petite plaque froide afin d'y faire adhérer le filtre et l'épiderme, positionnés en biais, au fond de ces derniers. Les blocs de paraffine devenus durs ont été démoulés et ont été tranchés à l'aide d'une lame de microtome en coupes histologiques de 6 µm d'épaisseur. Les coupes ont été ensuite déposées dans un bain d'eau chaude à environ 45°C afin de les placer délicatement par la suite sur des lames de verre qui seront mises à sécher à température ambiante, puis au four (à environ 45°C) toute la nuit.

2.6 Test de perméabilité à la biotine

L'objectif pour cette technique est d'observer par fluorescence la perméabilité de la barrière cutanée du modèle *in vitro*. Les épidermes reconstruits ont donc été incubés avec de la biotine. En cas d'altération de la barrière, les molécules de biotine peuvent remonter les différentes couches épidermiques jusqu'à se retrouver et s'accumuler dans la couche cornée. La biotine est ensuite révélée à l'aide d'une streptavidine fluorescente. Cela nous permet de confirmer, par observation de la fluorescence, la présence éventuelle de biotine dans la couche cornée.

En pratique, les RHE ont été placés dans une plaque 48 puits et rincés avec 500 µl du milieu de culture Epilife® et ensuite trois fois, de manière successive avec 500 µl de PBS-CaCl₂ (KH₂PO₄ 0,2g / Na₂HPO₄.7H₂O 2,18g / KCl 0,2g / NaCl 8g / CaCl₂ 2H₂O 0,15g). Les

RHE ont été incubés avec 500 µl de biotine (EZ-link sulfo-NHS-LC Thermo Fisher) à 2 mg/ml pendant 30 minutes à 37°C et ont été rincés trois fois avec 500 µl de PBS-CaCl₂, contenant 100 mM de glycine. Les épidermes ont été fixés dans du formol acétique pendant au moins 24 heures et enrobés en paraffine (voir protocole ci-dessus).

Les lames portant les échantillons ont été ensuite plongées dans 7 bains différents de 3 minutes afin de pouvoir incuber les épidermes avec la streptavidine. Tout d'abord, les coupes en paraffine ont été déparaffinées par 2 bains successifs de toluol. Après cela, les échantillons ont été immergés dans trois bains de méthanol : deux bains de méthanol à 100 %, un bain de méthanol à 70 % afin de passer en phase aqueuse. Enfin, les épidermes ont été réhydratés en étant plongés dans deux bains d'eau de ville renouvelée pour éclaircir le tissu (pour améliorer la résolution finale).

Une fois les échantillons déparaffinés et réhydratés, les tissus ont été bloqués avec du PBS-CaCl₂-BSA 0,2% pendant 15 minutes. Les RHE ont été incubés durant 1 heure avec 50 µl de streptavidine (1/500) Alexa fluor 488 (Thermo Fisher), marquant la biotine. Après trois lavages de 3 minutes au PBS-CaCl₂-BSA 0,2%, un deuxième marquage fluorescent des noyaux a été exécuté en incubant de nouveau les épidermes au Hoechst (1/100) pendant 15 min. Suite à cela, les échantillons ont été rincés trois fois au PBS-CaCl₂-BSA et une fois au PBS-CaCl₂, afin d'éviter l'auto-fluorescence du BSA. Les lames ont été montées au mowiol (Sigma-Aldrich) chauffées à 56°C et gardées dans un réfrigérateur à 4°C avant d'être observées en microscopie à fluorescence (Microscope à épifluorescence Olympus BX63 équipé d'une caméra XM10 pour la fluorescence).

2.7 Observation morphologique de coupes histologiques

L'observation de la morphologie des RHE, à l'aide d'une coloration H&E (Hémalum/Eosine) permet tout d'abord de vérifier visuellement si un épiderme a été reconstruit correctement, mais aussi d'investiguer un éventuel problème morphologique dans l'épiderme reconstruit.

En pratique, les échantillons sont plongés dans 21 bains successifs par un bras mécanique automatique à raison de 3 minutes par bain. Tout d'abord, les coupes histologiques ont été immergées dans deux bains successifs de toluol afin de déparaffiner les échantillons. Par la suite, les tissus ont été plongés dans deux bains de méthanol à 100 % et un bain de méthanol à 70 % pour réhydrater les échantillons. Puis les épidermes ont été rincés dans trois bains d'affilée, avec de l'eau de ville perpétuellement renouvelée, pour être immergés ensuite dans trois bains d'hémalum. L'hémalum est un colorant nucléaire basophile ayant une affinité pour les acides nucléiques colorant le noyau en bleu violet. Après le lavage des échantillons avec un bain d'eau de ville pour enlever l'excès d'hémalum, les RHE ont été différenciés avec un bain d'éthanol/HCl (4/1000) afin d'éliminer l'excès de colorant au niveau du cytoplasme. Suite à cela, les tissus ont été rincés dans 2 bains d'eau de ville (l'eau réagit avec l'hémalum, lui donnant une couleur bleue) et les échantillons ont été incubés dans deux bains d'érythrosine (pour colorer les protéines en rouge) avant une deuxième différenciation avec un bain d'éthanol à 70 % pour éliminer l'érythrosine en excès. Les RHE ont été déshydratés dans deux bains d'isopropanol. Les tissus ont été plongés dans du toluol, pour passer en phase organique afin de monter les lames à l'aide d'une colle organique DPX (VWR International, Louvain, Belgique). Les lames ont été mises à sécher à l'aide de poids par-dessus, afin que l'échantillon soit bien collé et plat, sur une plaque en marbre parfaitement horizontale, avant d'être observées en microscopie (Microscope à épifluorescence Olympus BX63 équipé d'une caméra SC50 pour l'observation bright-field).

2.8 Extraction d'ARN total et RT-qPCR

La RT-qPCR est une technique moléculaire permettant l'amplification et la quantification d'ARNm cibles présents dans une cellule, un tissu ou un organe. Plus spécifiquement, la RTqPCR nous permet de caractériser et d'explorer la présence ou non d'une modification de certaines expressions de gènes par les kératinocytes.

Pour l'extraction en ARN, un kit a été employé : le kit Promega ReliaPrep « ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System » (Promega, Wisconsin, États-Unis) pour extraire l'ARN des RHE. La quantité en ARN total a été quantifiée par un spectrophotomètre microvolume NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), en déposant 1,5 µl d'échantillon sur le capteur, mesurant l'absorbance à 260 nm. La pureté des échantillons a été vérifiée en mesurant le rapport entre l'absorbance en ARN et l'absorbance en sels (230nm) ou en protéines (280nm). Un échantillon est estimé non contaminé si le rapport des absorbances 260/230 est supérieur à 1,5 et 260/280 supérieur à 1,8. Par après, les échantillons ont été dilués dans l'eau RNase-free afin d'avoir 1 µg d'ARN dans 11 µl. Une reverse transcription a été réalisée avec ces 11 µl afin de générer des ADNc, en ajoutant 2 µl de mix 1 (1 µl dNTP et 1 µl oligo-dT dilué 1/10 dans l'eau RNase free) pour chaque échantillon et en incubant 5 minutes à 65°C. Puis, chaque tube a été incubé 50 minutes à 50°C, 15 minutes à 70°C et gardé à 4°C avec 7µl de mix 2 (4 µl First Strand Buffer 5x, 2 µl DTT 0,1M 10x et 1 µl reverse transcriptase). Par conséquent, 20 µl ADNc de chaque échantillon a donc été obtenu à l'aide du kit « SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase Kit » (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). L'amplification en ADNc par RTqPCR a été réalisée en ajoutant 5 µl d'ADNc (50ng) aux 15 µl de mix PCR dont 10 µl SYBRGreen (Eurogentec, Liège, Belgique) et 2,5 µl d'amorces spécifiques Forward/Reverse pour les gènes d'intérêt (IL-2R γ , IL-13R α 1, IL-13R α 2, CA2, NELL2, HAS3, FLG1, FLG2 ou LOR) (300nM ; **Tableau 4**). RPLP0 a été utilisé comme gène de référence pour son expression homogène dans les kératinocytes. L'amplification a été réalisée par le LightCycler Roche 96 (Roche Diagnosis, Vilvorde, Belgique). La fluorescence SYBRGreen a été mesurée et l'expression relative de l'ARNm a été obtenue en utilisant le calcul de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.9 Extraction protéique des RHE et Western Blot

Le western blot est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter la présence ou non d'une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine. Ceci permet notamment d'investiguer des voies de signalisation moléculaire qui sont impliquées dans les kératinocytes.

Afin d'extraire les protéines des RHE, les filtres de polycarbonate ont été découpés et ont été déposés dans 200 µl de tampon de lyse 2x (tampon Laemmli: 62,5 mM Tris-HCL, 2 % SDS, 8,7 % de glycérol, 0,05 % de bleu de bromophénol et 0,2 % de dithiothréitol). Les échantillons ont été ensuite vortexés 30 secondes, avant d'avoir été chauffés à 100°C pendant 5 minutes au bain-marie. Suite à cela, les filtres ont été frottés avec un tips sur la paroi du tube, afin d'assurer la séparation de l'épiderme et du filtre en polycarbonate et les échantillons ont été vortexés de nouveau 10 secondes. Pour terminer, les échantillons protéiques ont été réchauffés à 100°C au bain-marie pendant 2 minutes et stocker à -20°C. Après cela, les lysats protéiques ont été dilués (25 µg de protéine diluée dans l'eau distillée) auxquels a été ajouté 0,2 % de bleu de bromophénol, un colorant bleu utilisé comme marqueur visuel afin de vérifier le bon déroulement de la migration. Ensuite, 9 µl de chaque échantillon a été déposé dans un puits d'un gel de polyacrylamide, composé d'un running gel 10 % (acrylamide 10%, Tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,1% et H2O) et d'un stacking gel 4% (acrylamide 4%, Tris-HCl 0,5M pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,5%, TEMED 0,1% et H2O).

Les protéines ont migré pendant 1h30 à 120 volts dans un tampon d'électrophorèse (Tris-Base 250mM / Glycine 1,92M /1% SDS). Par après, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène ; Cho et al., 2012; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) avec du tampon de transfert (Tris 25 mM pH8,3/ 192 mM glycine / 20% méthanol) pendant 1h30 à 120 volts ou overnight à 60 volts à 4°C. Une fois le transfert terminé, la membrane est rincée au TBS Tween 0,1% puis elle a été bloquée avec du TBS-tween BSA 5% (120 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, H₂O, Tween 0,1% et BSA 5%) pendant 1 heure à température ambiante ou toute la journée à 4°C.

Après le blocage, la membrane a été incubée durant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (dilué 1/1000 dans du TBS-tween BSA 5% ; **Tableau 5**). Après trois lavages avec du TBS-Tween (Tween 20 0,1%) de 3 minutes, la membrane a été incubée, pendant 1 heure à température ambiante, avec un anticorps secondaire (dilué 1/1000 dans TBS-tween BSA 5%), anti-lapin ou anti-souris en fonction de l'anticorps primaire utilisé (**Tableau 5**) puis elle a été rincée trois fois au TBS-Tween 0,1% pendant 3 minutes. Suite à l'incubation d'une minute dans une solution chimioluminescente BM (2-methyl-2H-isothiazol-2-one hydrochloride ; Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgique), utilisée pour détecter les anticorps secondaires marqués à la peroxydase, la membrane a été révélée par le système ImageQuant Las4000 mini (GE Healthcare, Little Chalfont, Angleterre). RPL13a a été utilisé comme contrôle de charge afin de contrôler la quantité de protéines ayant migré pour chaque condition.

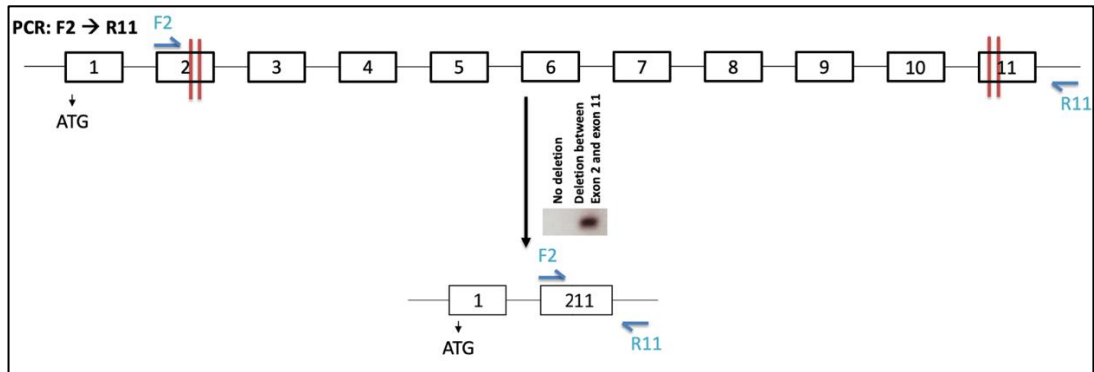
Tableau 2. Les crARN guide permettant de réaliser l'édition de IL13RA1 par la méthode CRISPR-Cas9

IDT	crRNA (5'→3')	PAM	Longueur de coupe
Exon 2 forward	ATGGACATGGAATCCACCCG	AGG	15
Exon 2 reverse	CCATAGACTACAATTTGAGC	TGG	15
Exon 11 forward	CATCTATGAGAAGCAAACCA	AGG	15
Exon 11 reverse	TTCTATCAGCACTACAGAGT	CGG	15

Tableau 3. Les amorces Forward et reverse pour réaliser la PCR du gène IL13RA1

Eurogentec	Amorces PCR (5'→3')
Exon 2 forward	TATGCCCACTGACTCCCTCA
Exon 2 reverse	TCATCTCCCCTCAACCGACT
Exon 11 forward	ACTCCTTTGGCACAGAGCTC
Exon 11 reverse	GAGTATGAGACGCAGGTGGG

a



b



Figure 10. Représentation de l'édition du gène *IL13RA1* sur le chromosome X par la technique CRISPR-Cas9. (a) Schéma de l'édition du gène *IL13RA1* par la méthode CRISPR/Cas9. A l'aide des crRNA pour diriger la protéine Cas9, le gène *IL13RA1* a été clivé au niveau de l'exon 2 et de l'exon 11, générant une cellule avec une grande délétion entre ces deux exons. Par la suite, cette délétion a été amplifiée par PCR avec des amorces forward et reverse. Les cellules d'intérêt, avec la grande délétion, ont été identifiées par séquençage des produits PCR. (b) Les clones d'intérêt 4 et 10 obtenus par dilution limite ont été séquençés et sélectionnés (A. Prognaux, thèse de doctorat, URPhyM, Université de Namur). Une grande partie du gène *IL13RA1* a été excisée entre l'exon 2 et 11, les séquences rouges représentent la partie délétée de l'exon.

Table 4. Amorces utilisées pour la technique RT-qPCR.

Gènes étudiés	Amorces Forward (5'→3')	Amorces Reverse (3'←5')	Compagnies
RPLP0	ATCAACGGGTACAAAC GAGTC	CCTTCTTGGCTGATCC ATCTG	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
IL-13Rα1	ACCCGAGGGAGCCAG CTCA	GTGGGGTCCCAGTGT AGCACC	Eurogentec, Liège, Belgique
IL-13Rα2	ATACCTTTGGGACCTA TTCC	ACTTGTAACCGGTAC TGAC	Eurogentec, Liège, Belgique
IL-2Rγ	GCAGAAACGCTACACG TTTCG	GTGGATTGGGTGGCT CCAT	Eurogentec, Liège, Belgique
Filaggrine 1 (FLG1)	GGGCACTGAAAGGCA AAAAG	CACCATAATCATAATCT GCACTACCA	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
Filaggrine 2 (FLG2)	ACCAGGTTCACTTAAA CTTGCA	ATGACATCCACTGTGT CTGGATC	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
Loricrine (LOR)	TCATGATGCTACCCGA GGTTTG	GTCTTGATCTACGTCG GCCTCT	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
carbonic anhydrase 2 (CA2)	AACAATGGTCATGCTT TCAACG	ACAGGTAGTTCACTTG GGGTC	Eurogentec, Liège, Belgique
Nel-like, type2 (NELL2)	TAAGGGTATAATGCAA GATGTCCAATT	TCTAGACCCGTGACTC GTTATTT	Eurogentec, Liège, Belgique
hyaluronic acid synthase 3 (HAS3)	GCCCTCGGCGATTTCG	TGGATCCAGCACAGTG TCAGA	Eurogentec, Liège, Belgique

Table 5. Anticorps utilisés pour le Western Blot.

Anticorps primaires	Compagnies	Référence
pSTAT6	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9361
STAT6	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9362
ERK	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9102
pERK	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9106
pSTAT3	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9131
STAT3	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9139
pJNK	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9255
JNK	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9252
pAKT	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#2965
RPL13a	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#2765
Anticorps Secondaires	Compagnies	Référence
Rabbit-HRP	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#7074
Mouse-HRP	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#7076

3. Résultats

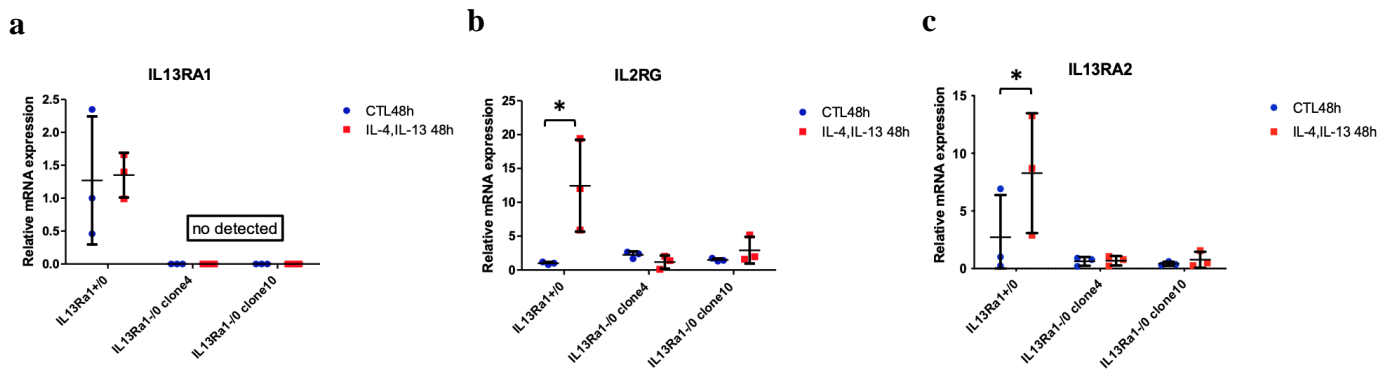
3.1 Utilisation de deux modèles complémentaires de RHE pour étudier l'implication du récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 en condition inflammatoire induite par les IL-4 et IL-13. L'inactivation du gène *IL13RA1* dans des kératinocytes N/TERT.

Etant donné qu'il a été démontré que l'IL-4 et IL-13 se retrouvent sécrétés de façon importante dans la peau de patients atteints de DA, nous avons investigué l'implication du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 aux IL-4 et IL-13 de type II dans la condition inflammatoire dans un modèle d'épiderme reconstruit.

Le premier modèle utilisé est un modèle RHE reconstruit à partir de kératinocytes N/TERT où le gène *IL13RA1* a été inactivé par la technique CRISPR-Cas9. Pratiquement, des cellules N/TERT ont été utilisées pour éditer leur ADN à l'aide de l'endonucléase Cas9 et d'ARN guides. Ces guides ont été choisis pour cibler l'exon 1 et l'exon 11 du gène *IL-13RA1*. Afin d'obtenir une population monoclonale cellulaire éventuellement knock-out (KO), les cellules ont été clonées en exécutant une dilution limite. Après cela, PCR et séquençage ont été employés afin de sélectionner les clones où la délétion d'intérêt de l'exon 1 à l'exon 11 a été produite. Compte tenu de l'emplacement du gène *IL13RA1* sur le chromosome X et du fait que les kératinocytes N/TERT sont des cellules obtenues à partir d'un homme, les mutations obtenues sont identifiées sur un seul chromosome cellulaire. Les kératinocytes N/TERT inactivés pour *IL13RA1* via CRISPR-Cas9 ont été utilisés pour reconstruire des épidermes KO pour ce récepteur (RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰). Pour cette étude, nous avons sélectionné deux clones KO pour *IL13RA1* (*IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et *IL13RA1*⁻⁰ clone 10) et nous avons comparé ces RHE N/TERT édités *IL13RA1*⁻⁰ par rapport aux RHE N/TERT non-édités *IL13RA1*⁺⁰. Le second modèle utilisé est un modèle RHE reconstruit à partir de kératinocytes primaires normaux (RHE primaires) mais qui ont été préalablement traités durant 24 heures avec un inhibiteur de JAK (le Tofacitinib (1 μ M), ou l'Upadacitinib (0,2 μ M), ou le Ruxolitinib (1 μ M)) dans le but de bloquer la signalisation en aval du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1. Après le prétraitement, les RHE primaires ont été exposés ou non aux IL-4 et IL-13 pendant 48 heures. Nous avons comparé les RHE primaires prétraités aux inhibiteurs des JAK avec leurs RHE primaires contrôles (non-prétraités).

Pour le premier modèle, il est primordial de confirmer l'inactivation du gène *IL13RA1* afin de valider ces cellules pour de futures investigations. Pour ce faire, une analyse par RT-qPCR a été réalisée pour vérifier que les RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et clone 10 sont bien KO (**Fig. 11a**). L'analyse de l'expression relative en ARNm ne révèle aucune détection pour *IL13RA1* dans les deux RHE *IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et clone 10, que ce soit d'ailleurs après une incubation avec le mix d'Ils, ou pas. Au niveau des RHE *IL13RA1*⁺⁰, on observe une expression basale d'*IL-13RA1*. Le niveau de cette expression ne change pas après incubation avec les IL-4 et IL-13 et reste relativement bas (Cq~30).

En ce qui concerne les RHE primaires, l'expression en ARNm de *IL13RA1* n'est pas modifiée par incubation avec le mix d'Ils (**Fig. 12a**). L'ajout des inhibiteurs de JAK ne semble pas non plus réguler cette expression, que ce soit avec ou sans la présence des IL-4 et IL-13. Néanmoins, il reste nécessaire de répéter cette expérience.



dans les RHE inactivés *IL13Ra1*^{-/-} après exposition aux IL-4 et IL-13 contrairement aux RHE *IL13Ra1*^{+/-}. (a) L'expression du gène *IL-13RA1* dans les RHE *IL13RA1*^{+/-} et *IL13RA1*^{-/-} a été analysé au travers d'un RT-qPCR dans les RHE de 11 jours de reconstruction. (b-c) L'expression génique de *IL-2R γ* et *IL-13Ra2* ont été réalisés par RT-qPCR, avec des RHE de 11 jours de reconstruction. Les RHE ont été exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Le gène de référence utilisé lors de l'investigation est RPLP0. Les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD (n = 3, ANOVA 2 mesures répétées, * P < 0,05).

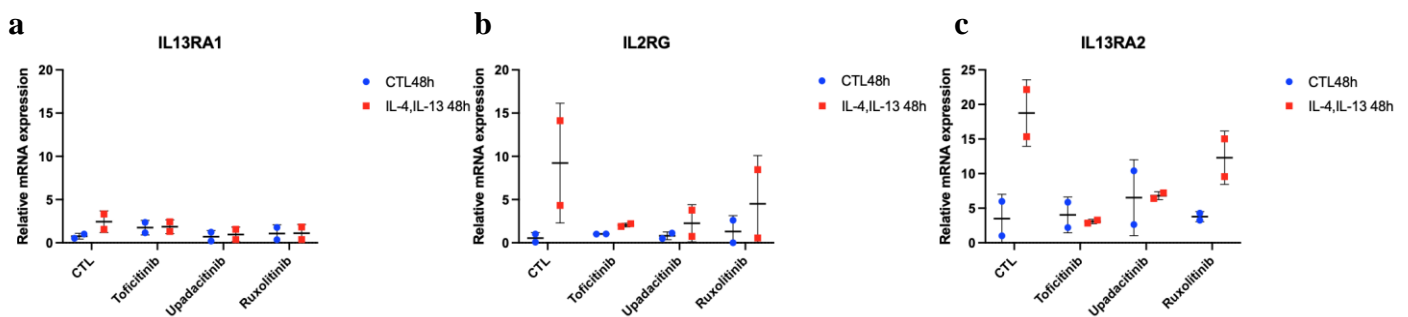


Figure 12. L'induction de l'expression génique des récepteurs *IL2R γ* et *IL-13Ra2* est inhibée dans les RHE primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK, après exposition aux IL-4 et IL-13. (a) L'expression du gène *IL-13RA1* a été analysée au travers d'une RT-qPCR dans les RHE primaires après le 11e jour de reconstruction (b-c). L'expression génique de *IL-2R γ* et *IL-13Ra2* a été réalisée par RT-qPCR, avec des RHE de 11 jours de reconstruction. Les RHE ont été prétraités par les inhibiteurs de JAK (Tofacitinib 1 μ M, Upadacitinib 0,2 μ M et Ruxolitinib 1 μ M), durant 24 heures, puis exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Le gène de référence utilisé lors de l'investigation est RPLP0. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

3.2 Reconstruction *in vitro* d'un épiderme avec les kératinocytes N/TERT et primaires. Aucun changement morphologique n'a été identifié au sein de ces RHE après exposition aux IL-4 et IL-13.

Afin d'investiguer la potentielle implication du récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 dans la condition inflammatoire épidermique par l'intermédiaire des IL-4 et IL-13, nous avons investigué la morphologie des RHE avec nos deux modèles. Cette investigation morphologique s'est déroulée à travers l'observation de coupes histologiques par microscopie à fond clair (bright-field) des RHE avec ou sans le traitement aux IL-4 et IL-13 de 48 heures (**Fig. 13-14**). Pour cette observation, les RHE ont été préalablement colorés à l'hémalun/éosine (H&E). Le noyau est coloré en bleu-violet par l'hémalun et le cytoplasme en rose par l'éosine, permettant ainsi l'analyse histologique de l'épiderme reconstruit.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que les kératinocytes N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ et *IL13RA1*⁻⁰ sont capables de reproduire un RHE histologiquement complet comprenant les différentes couches épidermiques, dont la présence d'une couche basale, d'une couche épineuse, d'une couche granuleuse et d'une couche cornée typiquement rencontrées dans un épiderme humain normal (**Fig. 13**), confirmant la kératinisation des cellules N/TERT qui a été démontrée dans la littérature (Smits, J. P. et al, 2017). Nous observons que le tissu reconstruit ressemble à celui formé à partir de cellules primaires. Toutefois, une différence notable visuellement est un amincissement de la couche cornée pour les RHE reconstitués avec les kératinocytes N/TERT en comparaison avec les RHE reconstruits à partir de cellules primaires (**Fig. 14**). En ce qui concerne l'effet des IL-4 et IL-13, nous ne notons aucune modification morphologique marquante des épidermes après 48 heures d'exposition au mélange des ILs, que ce soit pour les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ ou *IL13RA1*⁻⁰ clone4 et clone 10.

Tout comme il a été démontré dans la littérature, nous avons pu reproduire un épiderme reconstruit à partir de nos kératinocytes primaires (Fig. 4). Les modèles 3D d'épidermes reconstruits avec des kératinocytes primaires, exposés aux IL-4 et IL-13, ont permis de reproduire certaines des caractéristiques typiques des lésions pathologiques de la DA, telles que l'hypogranulose et la spongiose du tissu épidermique. Cependant, l'analyse morphologique des RHE primaires ne révèle aucun changement notable pour toutes les conditions analysées, que ce soit avec ou sans exposition aux IL-4 et IL-13, ou que ce soit avec ou sans le prétraitement réalisé avec les inhibiteurs de JAK (Tofacitinib, Upadacitinib ou Ruxolitinib).

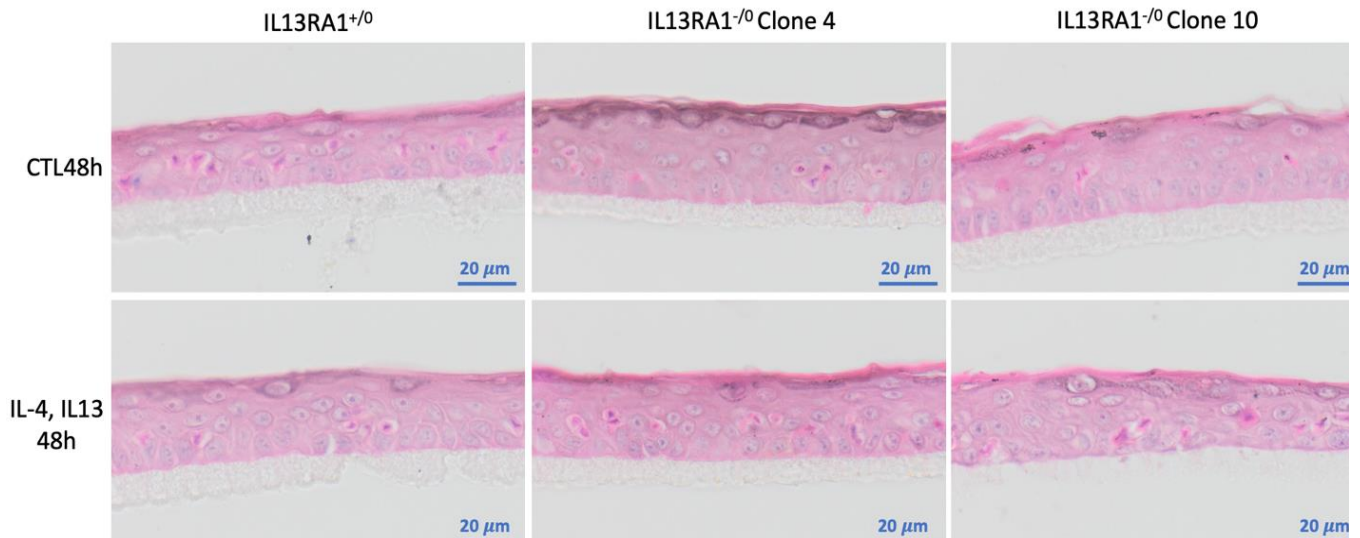


Figure 13. Analyse de changements morphologiques dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-} et *IL13RA1*^{-/-} après exposition à l'IL-4 et à l'IL-13. Les coupes histologiques ont été fixées dans du formol acétique, ont été enrobées dans la paraffine et ont été tranchées de 6 μm. Les observations ont été réalisées par coloration à l'Hémalun et à l'Éosine (H&E) de RHE N/TERT exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Ces micrographies sont représentatives de trois expériences indépendantes. La barre d'échelle représente 20 μm.

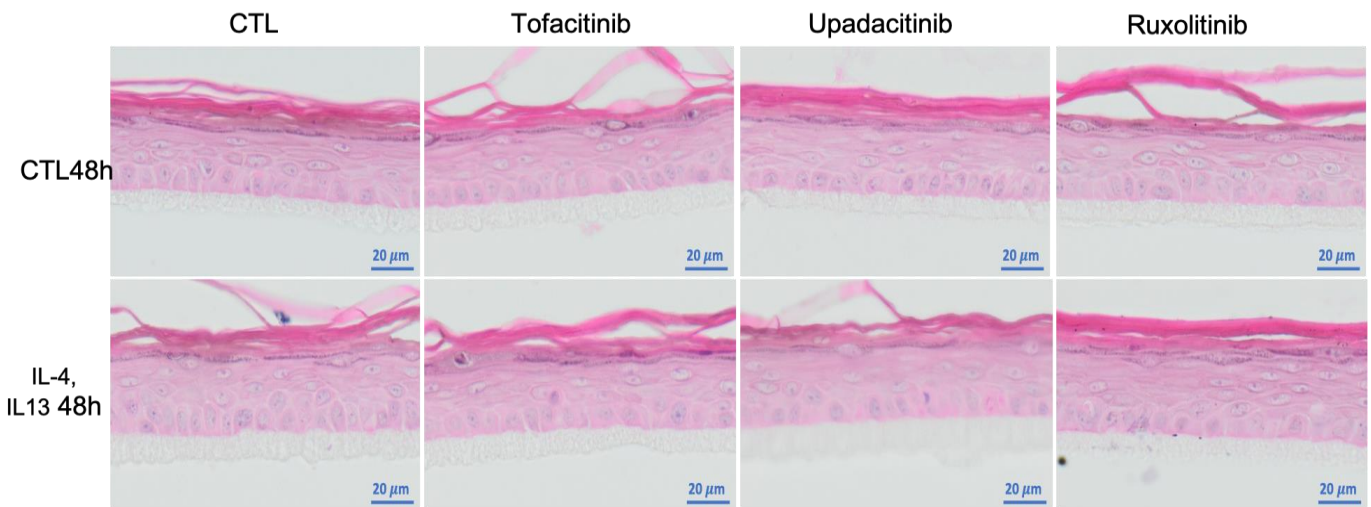


Figure 14. Analyse de changements morphologiques dans les RHE reconstruits avec les kératinocytes primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK, après exposition aux IL-4 et IL-13. Les coupes histologiques ont été fixées dans du formol acétique, ont été enrobées dans la paraffine et ont été tranchées de 6 μm. Les observations ont été réalisées par coloration à l'Hémalun et à l'Éosine (H&E) de RHE prétraités 24h aux inhibiteurs de JAK (Tofacitinib 1 μM, Upadacitinib 0,2 μM et Ruxolitinib 1 μM), puis exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Ces micrographies sont représentatives de deux expériences indépendantes. La barre d'échelle représente 20 μm.

3.3 Le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 induit l'expression génique de la sous-unité IL-2R γ et du récepteur IL-13R α 2 après exposition aux IL-4 et IL-13 dans les RHE *IL13RA1*^{+/-0} et RHE de kératinocytes primaires. L'induction de l'expression génique de la sous-unité IL2R γ et du récepteur IL-13R α 2 n'est pas présente dans les kératinocytes des RHE *IL13RA1*^{-/0} et des RHE prétraités avec les inhibiteurs de JAK.

Puisqu'il a été démontré que les IL-4 et les IL-13 induisent l'expression génique de la sous-unité IL-2R γ du récepteur de type I et du récepteur IL-13R α 2 dans un modèle RHE, reconstruit au sein de notre laboratoire (Progneaux A., recherche doctorale, URPhyM-NARILIS, Université de Namur, Belgique), nous avons recherché si le récepteur de type II pourrait jouer un rôle de régulateur central dans l'expression de IL-2R γ et du récepteur IL-13R α 2. Pour ce faire, dans un premier modèle, nous avons comparé les niveaux d'expression en ARNm de nos RHE N/TERT non édités et édités *IL13RA1*^{-/0} et de nos RHE primaires prétraités et non-prétraités aux inhibiteurs de JAK. Dans ce but, nous avons analysé l'expression de IL-2R γ et IL-13RA2 dans nos deux modèles de RHE au 11^e jour de reconstruction, exposés aux IL-4 et IL-13 pendant 48 heures (**Fig. 11-12**).

Tout d'abord, sans stimulation aux ILs, nous remarquons que la sous-unité IL-2R γ et le récepteur IL-13R α 2 sont faiblement exprimés par les kératinocytes, au vu du nombre de Cq élevés (Cq~30-35) obtenus par RT-qPCR dans la condition contrôle des RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0} (**Fig. 11b-c**). Ensuite, nous avons démontré une augmentation significative (*P>0,05) de l'expression relative en ARNm de IL-2R γ et de IL-13R α 2, suite à l'exposition avec le mélange d'IL-4 et IL-13, dans les RHE N/TERT *IL-13RA1*^{+/-0}. Nous avons pu remarquer une absence de l'induction de l'expression de la sous-unité IL-2R γ et du récepteur IL-13R α 2 dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{-/0} clones 4 et 10 après exposition aux ILs comparativement aux RHE non-édités *IL13RA1*^{+/-0}.

A l'instar de RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}, nous notons que la sous-unité IL-2R γ et le récepteur IL-13R α 2 sont également peu exprimés (Cq~36-37) dans les RHE primaires non-prétraités (**Fig. 12b-c**). De plus, une induction de l'expression de IL-2R γ et IL-13R α 2 n'a pas été identifiée dans les RHE non-prétraités après incubation en présence d'IL-4 et IL-13. Enfin, nous avons observé également que l'expression de la sous-unité IL-2R γ et celle du récepteur IL-13R α 2 ne sont plus induites dans les RHE primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK. Néanmoins, l'effet inhibiteur du Ruxolitinib semble moins fort que le Toficitinib et l'Upadacitinib. A nouveau, il reste nécessaire de répéter l'analyse pour éventuellement établir la reproductibilité du résultat.

3.4 Le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 induit l'expression des marqueurs géniques de la DA CA2, NELL2 et HAS3 par les IL-4 et IL-13 dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0} et les RHE primaires. L'expression de CA2, NELL2 et HAS3 n'est plus induite dans les kératinocytes des RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ et des RHE primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK.

Précédemment nous avons vu que plusieurs études publiées ont démontré que l'IL-4 et l'IL-13 impactent le profil d'expression génique des kératinocytes primaires dans un modèle 3D RHE (études de De Vuyst *et al.*). L'analyse des kératinocytes primaires a révélé que leur profil d'expression génique se trouve alors modifié, caractérisé par une diminution de l'expression de protéines ayant un rôle important pour la barrière épidermique (loricrine et filaggrine) et une hausse de l'expression des marqueurs typiques modifiés au cours de la DA. Nous avons pu constater que la présence du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 a un impact sur l'expression de la sous-unité IL-2R γ du récepteur de type I et du récepteur IL-13R α 2. De ce fait, nous avons exploré l'intervention du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 dans l'expression des protéines de la barrière telles que la *LOR*, la *FLG1* et la *FLG2* ainsi des marqueurs caractéristiques de la DA comme *CA2*, *NELL2* et *HAS3*. En pratique, une RT-qPCR a été employée sur nos deux modèles RHE traités aux IL-4 et IL-13 durant 48 heures (**Fig. 15-16**).

Avant toute chose, nous pouvons constater que, sans traitement aux ILs, l'expression basale est faible pour les trois marqueurs *CA2*, *NELL2* et *HAS3*, au vu de la valeur des Cq (Cq~ 28-30) observés dans les RHE NTERT *IL13RA1*^{+/-0} (**Fig. 15d-f**). Par contre, suite à l'exposition aux IL-4 et IL-13, nous avons pu identifier une élévation significative (*P<0,05) de cette expression relative en ARNm de *CA2*, *NELL2* et *HAS3* dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}. Toutefois, nous avons noté une disparition de l'induction de l'expression des trois marqueurs de la DA dans nos deux RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et clone 10, après exposition avec le mix d'ILs. A contrario, pour les protéines de la barrière *LOR*, *FLG1* et *FLG2*, leur expression basale en ARNm est élevée (avec des Cq~20-22) dans les RHE NTERT *IL13RA1*^{+/-0} (**Fig. 15a-c**). De plus, aucune différence marquante de cette expression n'a été observée par l'analyse RT-qPCR dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ par rapport aux RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}.

A l'instar des N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}, nous constatons une faible expression basale dans les RHE non-prétraités pour *CA2*, *NELL2* et *HAS3* (Cq~ 30-38) (**Fig. 16d-f**). L'effet d'induction de l'expression en ARNm des trois marqueurs *CA2*, *NELL2* et *HAS3* a été également observée dans les RHE primaires non-prétraités aux inhibiteurs, suite à l'exposition aux IL-4 et IL-13, par rapport à la condition contrôle. Inversement, nous remarquons que l'expression basale des protéines *LOR*, *FLG1* et *FLG2*, qui est élevée (Cq~) dans les RHE primaires non-prétraités, ne semble pas varier suite à l'exposition de ces tissus aux ILs (**Fig. 16a-c**). Néanmoins, il sera nécessaire de répéter l'expérience afin d'établir sa reproductibilité au niveau statistique.

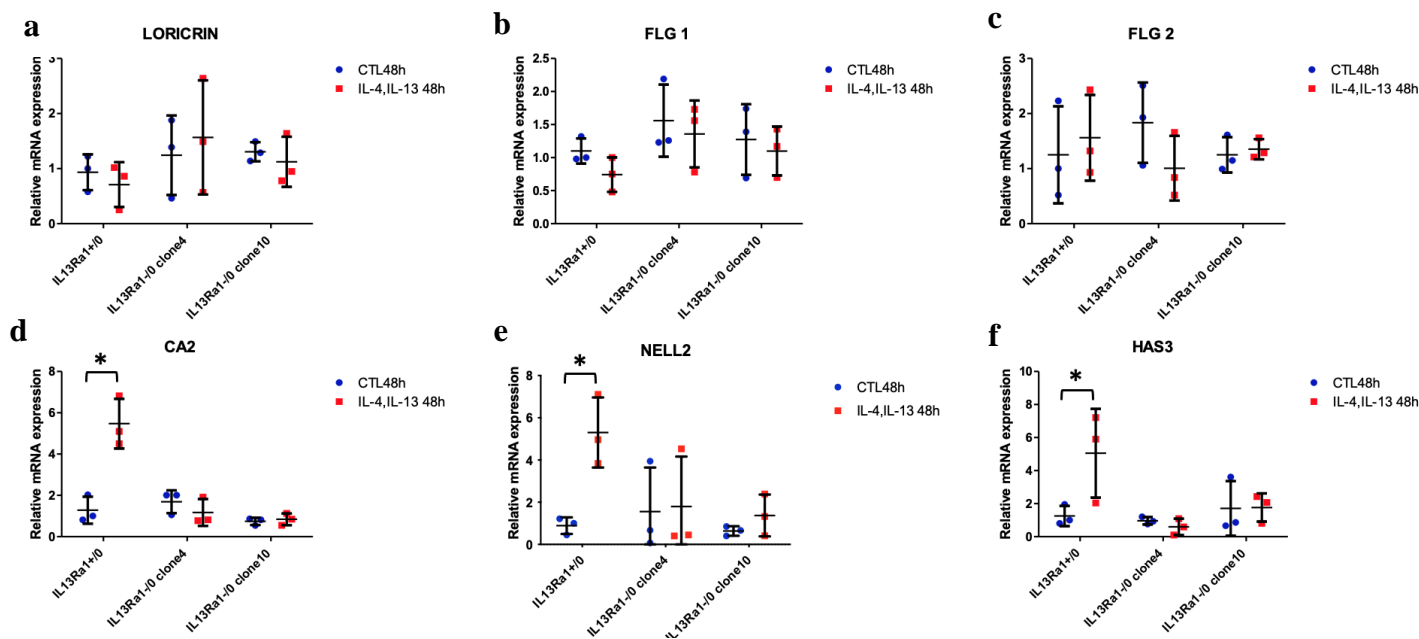


Figure 15. L'expression génique des marqueurs de la DA *CA2*, *NELL2* et *HAS3* n'est pas induite dans les RHE *N/TERT IL13RA1*^{-/-0} exposés aux IL-4 et IL-13. L'expression génique de (a) *LOR*, (b) *FLG1*, (c) *FLG2*, (d) *CA2*, (e) *NELL2*, (f) *HAS3* a été analysée par RT-qPCR, dans des RHE exposés à l'IL-4 (50 ng/ml) et à l'IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Le gène de référence choisi est RPLP0. Les données sont représentées sous forme de moyennes ± SD (n = 3 ; * P < 0,05).

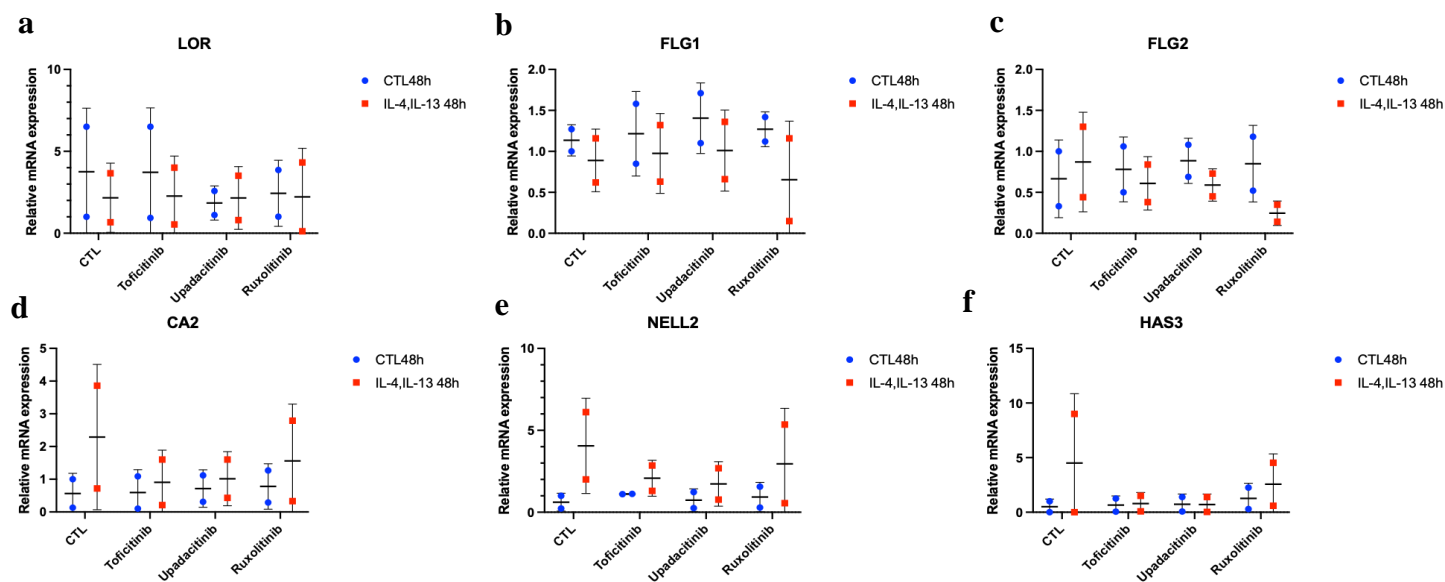


Figure 16. Inhibition de l'induction de l'expression des marqueurs de la DA *CA2*, *NELL2* et *HAS3* dans les RHE prétraités avec des inhibiteurs de JAK après exposition à IL-4 et IL-13. L'expression génique de (a) *LOR*, (b) *FLG1*, (c) *FLG2*, (d) *CA2*, (e) *NELL2*, (f) *HAS3* a été analysée par RT-qPCR, dans des RHE exposés à l'IL-4 (50 ng/ml) et à l'IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Le gène de référence choisi est RPLP0. Les RHE reconstruits avec des kératinocytes ont été prétraités 24 heures avec des inhibiteurs de JAK (Tofacitinib 1 µM, Upadacitinib 0,2 µM et Ruxolitinib 1 µM). Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

3.5 Le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 intervient dans la phosphorylation de la protéine STAT6 suite à l'ajout des IL-4 et IL-13. Les IL-4 et IL-13 n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de la protéine ERK.

Les résultats précédents montrent l'implication du récepteur de type II dans l'expression des récepteurs aux IL-4 et IL-13 et des marqueurs de la DA (*CA2*, *NELL2* et *HAS3*). On sait également que le récepteur de type II active différentes voies de signalisation impliquant la phosphorylation de STAT6, STAT3 ou l'activation des voies de MAPK. Par conséquent, il serait intéressant d'investiguer l'activation des voies de signalisation afin de voir quelle voie et quelle protéine sont impliquées dans l'induction de l'expression relative en ARNm des récepteurs et des marqueurs de différenciation. L'analyse de l'activation de voies de signalisation a été réalisée par Western blot sur deux modèles RHE avec différents temps d'exposition aux IL-4 et IL-13 : 15, 30 et 60 minutes (**Fig. 17-18**).

D'abord, la révélation de la membrane a mis en évidence l'induction de la phosphorylation de la protéine STAT6 après exposition aux IL-4 et IL-13 dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ (**Fig. 17**). Par ailleurs, nous pouvons constater un effet « on-off » de la phosphorylation de STAT6 en comparant nos RHE N/TERT RHE *IL13RA1*⁻⁰ (clone 4 et clone 10) et RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰. Pour ce qui est de la phosphorylation de STAT3 et de AKT, celles-ci restent inchangées avec ou sans le mix d'ILs pour les RHE *IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et 10 par rapport aux RHE *IL13RA1*⁺⁰. En outre, nous avons pu déceler une phosphorylation de la protéine ERK après 15 et 30 minutes d'exposition aux IL-4 et IL-13, que ce soit dans les RHE N/TERT édités ou non édités.

La phosphorylation de la protéine STAT6 est également présente suite à l'exposition aux IL-4 et IL-13 dans les RHE primaires non-prétraités aux inhibiteurs de JAK ; cependant la phosphorylation est faible. Nous observons une perte d'induction de la phosphorylation de STAT6, dans les RHE primaires prétraités aux inhibiteurs par rapport aux RHE non-prétraités, après traitement aux ILs (**Fig. 18**). Par ailleurs, nous pouvons remarquer que STAT3 semble être phosphorylé après 15 et 60 minutes dans les RHE non-prétraités. De plus, nous notons aussi une stimulation de la phosphorylation de ERK après 15 et 30 minutes d'exposition avec le mix d'ILs, que ce soit dans les RHE primaires non-prétraités ou prétraités aux JAK-inhibiteurs.

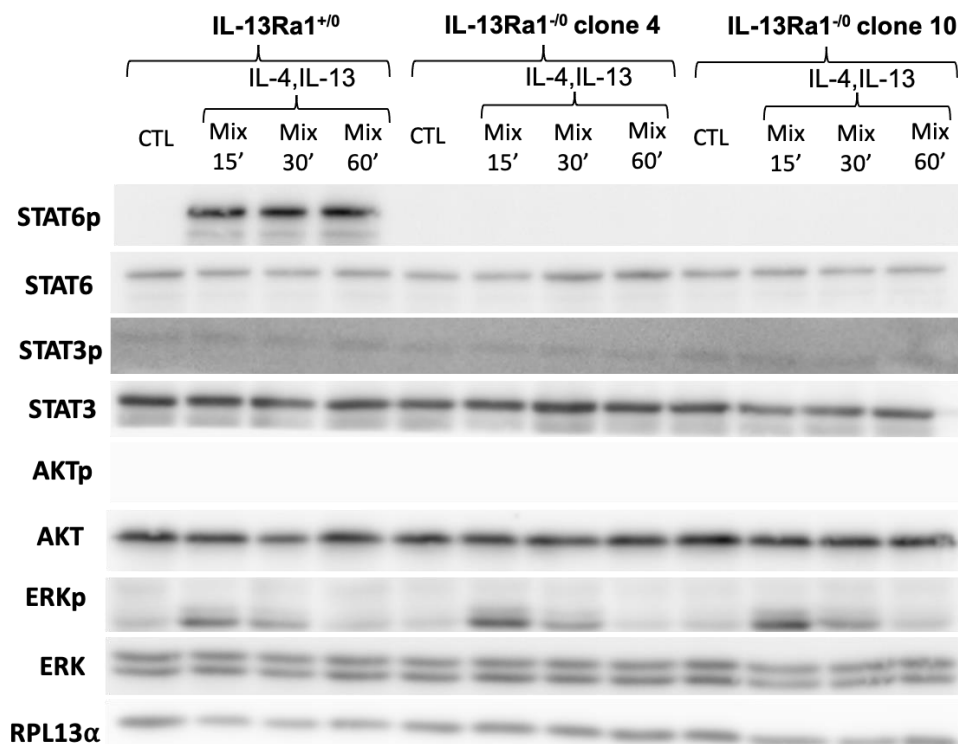


Figure 17. La phosphorylation de la protéine STAT6 n'est pas induite dans les RHE N/TERT inactivés *IL13RA1*^{-/-} après exposition à IL-4 et IL-13. Les formes phosphorylées de STAT6, STAT3, ERK et AKT ainsi que les formes totales de STAT6, STAT3, ERK et AKT ont été analysées par Western blot dans les RHE *IL13RA1*^{+/-} et *IL13RA1*^{-/-} traités à IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng /ml) pendant 15 minutes, 30 minutes ou 1 heure. La protéine RPL13α a été utilisée comme contrôle de charge. La révélation de STAT6p, STAT3p et ERKp est représentative de trois expériences indépendantes.

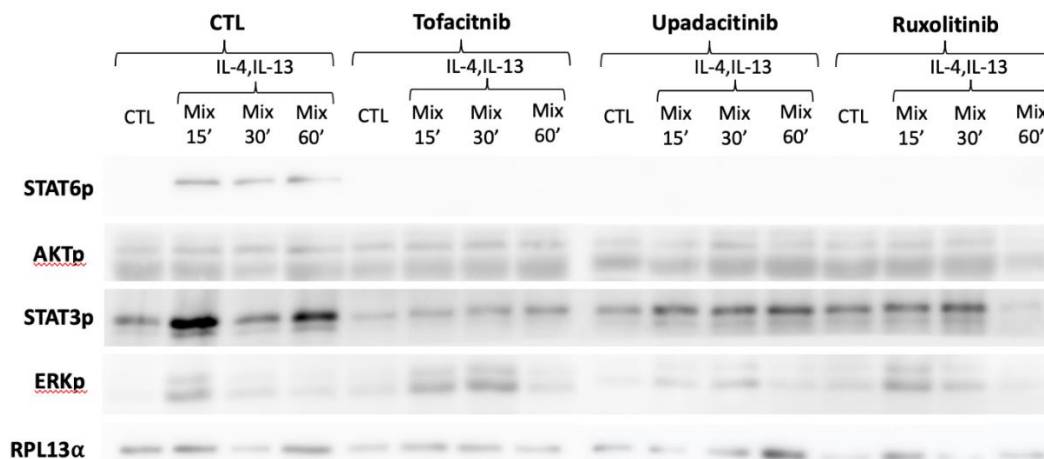


Figure 18. La phosphorylation de la protéine STAT6 n'est pas induite dans les RHE primaires après exposition aux IL-4 et IL-13 avec les inhibiteurs de JAK. Les formes phosphorylées de STAT6, STAT3, AKT et ERK ont été analysées par Western blot dans les épidermes reconstruits avec les kératinocytes primaires prétraités 24 heures aux inhibiteurs de JAK (Tofacitinib 1 μM, Upadacitinib 0,2 μM et Ruxolitinib 1 μM) et exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng /ml) pendant 15 minutes, 30 minutes ou 1 heure. La protéine RPL13α a été utilisée comme contrôle de charge. La révélation est représentative de deux expériences indépendantes.

3.6 Les IL-4 et IL-13 altèrent l'intégrité de la barrière épidermique dans les épidermes reconstruits N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}. Cette altération de la barrière cutanée n'est pas apparente dans les RHE N/TERT *IL-13RA1*^{-/-0} et les RHE primaires avec et sans les inhibiteurs de JAK.

Etant donné qu'il a été démontré que les IL-4 et IL-13 jouent un rôle dans l'altération de la barrière épidermique, nous avons investigué la possible implication du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 dans la perte d'intégrité de la barrière cutanée, dans nos modèles RHE en condition inflammatoire. Tout d'abord, une comparaison de la mesure de la résistance électrique transépithéliale a donc été réalisée entre les RHE N/TERT *IL-13RA1*^{+/-0} et RHE N/TERT *IL13RA1*^{-/-0} ainsi qu'entre les RHE primaires non-prétraités et prétraités aux inhibiteurs de JAK. La mesure de résistance électrique a été effectuée à l'aide d'un volt-ohmmètre sur les RHE avec ou sans traitement par IL-4 et IL-13 pendant 48 heures, (Fig. 19-20).

Une diminution marquante de la résistance électrique a été mise en évidence dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0} après exposition aux IL-4 et IL-13 (Fig. 19). Les valeurs de résistance électrique mesurées passent d'environ 10 000 ohms pour la condition contrôle à environ 3000-4000 ohms pour la condition exposée avec le mélange d'ILs. L'analyse statistique montre que la différence de résistance est significative entre la condition contrôle et celle avec les ILs (*P>0,05). Par contre, aucune différence significative de résistance électrique n'est constatée dans les RHE *IL13RA1*^{-/-0} clone 4 et *IL13RA1*^{-/-0} clone 10.

Les résultats de la résistance électrique obtenus avec les deux clones *IL13RA1*^{-/-0} corroborent avec ceux obtenus avec l'analyse de l'activation des voies de signalisation par western blot, préalablement présentés dans la Fig. 7. En effet, la phosphorylation de la protéine STAT6 reste inchangée entre la condition contrôle et la condition avec les IL-4 et IL-13.

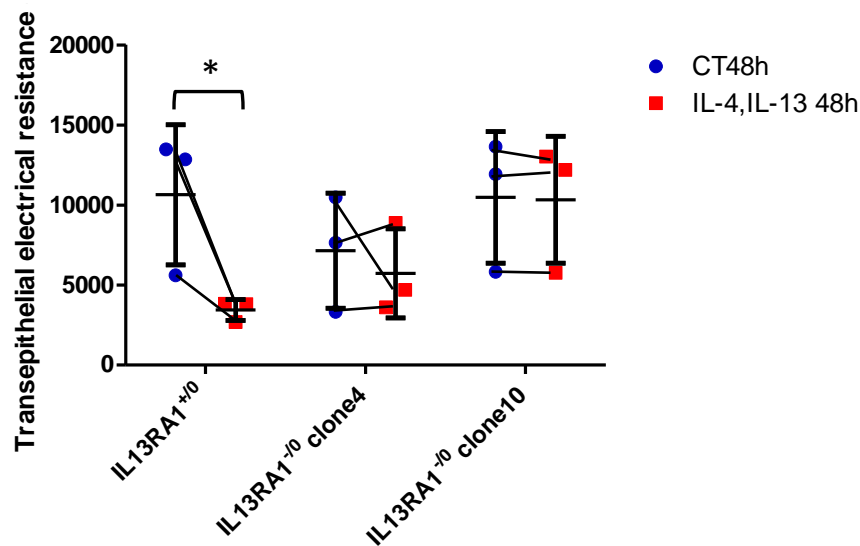


Figure 19. La barrière épidermique n'est pas altérée dans les RHE inactivés *IL13RA1*^{-/-0} après exposition à IL-4 et IL-13, contrairement aux RHE *IL13RA1*^{+/-0}. L'efficacité de la barrière a été analysée par mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) avec des RHE exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD (n = 3 ; * P < 0,05).

Nous ne remarquons également aucune différence entre la résistance électrique correspondant aux RHE primaires non-prétraités aux inhibiteurs de JAK après exposition aux IL-4 et IL-13, comparativement à la condition contrôle sans ILs (**Fig. 20**). L'analyse de la résistance électrique révèle une réduction d'une valeur mesurée aux environs de 14000 ohms pour la condition contrôle, à une valeur de 11000 ohms pour la condition traitée aux IL-4 et IL-13. Ces résultats, corrélés avec la faible phosphorylation de STAT6 qui a été constatée par l'analyse en Western blot. Nous n'apercevons pas non plus de différence de résistance significative dans les RHE primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK, entre la condition traitée et celle des tissus non-traités aux ILs. Néanmoins, il est nécessaire de reproduire l'expérience une fois de plus afin de prouver si cette variation est significative ou non.

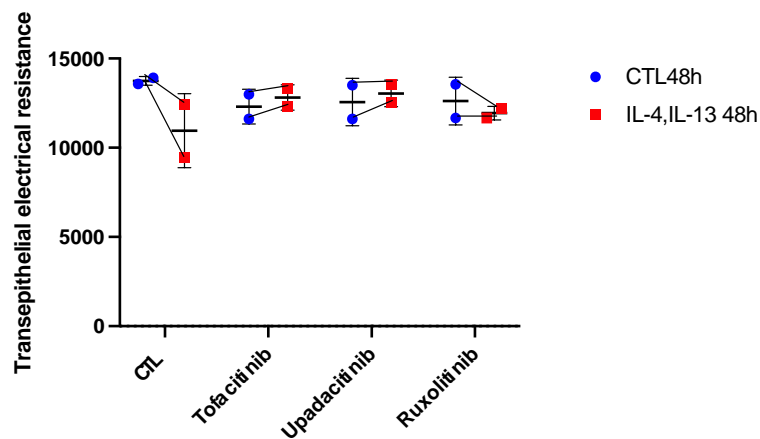


Figure 20. Les IL-4 et IL-13 ne semblent pas impacter l'intégrité de la barrière épidermique dans les RHE reconstruits avec des kératinocytes primaires. L'efficacité de la barrière a été analysée par mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) avec des RHE prétraités aux inhibiteurs de JAK (Tofacitinib 1 μ M, Upadacitinib 0,2 μ M et Ruxolitinib 1 μ M) et exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Les mesures sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Subséquentement, afin d'analyser avec une autre méthodologie l'intervention du récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 pour altérer ses caractéristiques fonctionnelles, nous avons investigué l'intégrité de la barrière épidermique à l'aide d'un test inside-outside utilisant la biotine et un marquage fluorescent biotine-streptavidine. Pratiquement, nous incubons nos RHE avec de la biotine pendant 30 minutes. La biotine va remonter les couches de l'épiderme, de la couche basale jusqu'à la couche granuleuse, mais elle sera bloquée par la couche cornée à cause des jonctions serrées. Par conséquent, dans le cas d'une condition normale, sans altération, la biotine s'accumule dans la couche granuleuse sous la couche cornée. Dans le cas où la biotine s'accumule dans la couche cornée, cela démontre une altération de la barrière épidermique. Par conséquent, nous avons comparé les résultats entre les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ et *IL13RA1*⁻⁰ ainsi que les RHE primaires non-prétraités et prétraités, et ceci avant et après exposition aux IL-4 et IL-13 durant 48 heures (**Fig. 21-22**).

Le test inside-outside de la biotine révèle que le signal fluorescent s'accumule jusqu'en dessous de la couche cornée (sous la ligne pointillée) dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ non traités aux IL-4 et IL-13 (**Fig. 21**). Dès que les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ ont été exposés aux ILs pendant 48 heures, nous avons constaté l'accumulation de la biotine par endroit dans la couche cornée (au-dessus de la ligne pointillée). A contrario, l'observation de

ce phénomène n'est pas remarquée dans les RHE N/TERT *IL13RA*⁻⁰, où aucun signal fluorescent n'est visualisé dans la couche cornée.

Toutefois, l'efficacité de la barrière épidermique dans les RHE primaires non-prétraités ne dévoile aucun marquage fluorescent dans la couche cornée, que ce soit pour la condition incubée avec les IL-4 et IL-13 ou non (**Fig. 22**). Ceci corrèle avec les mesures de la résistance électrique et la faible phosphorylation de STAT6 obtenue par l'analyse en Western blot, récoltées lors des analyses précédentes. Pareillement, il n'y a pas de détection de signal fluorescent dans les RHE primaires prétraités avec les inhibiteurs de JAK, avec ou sans exposition aux IL-4 et IL-13. Néanmoins, il faudra répéter ces observations car actuellement ces micrographies ne proviennent que d'une seule expérience.

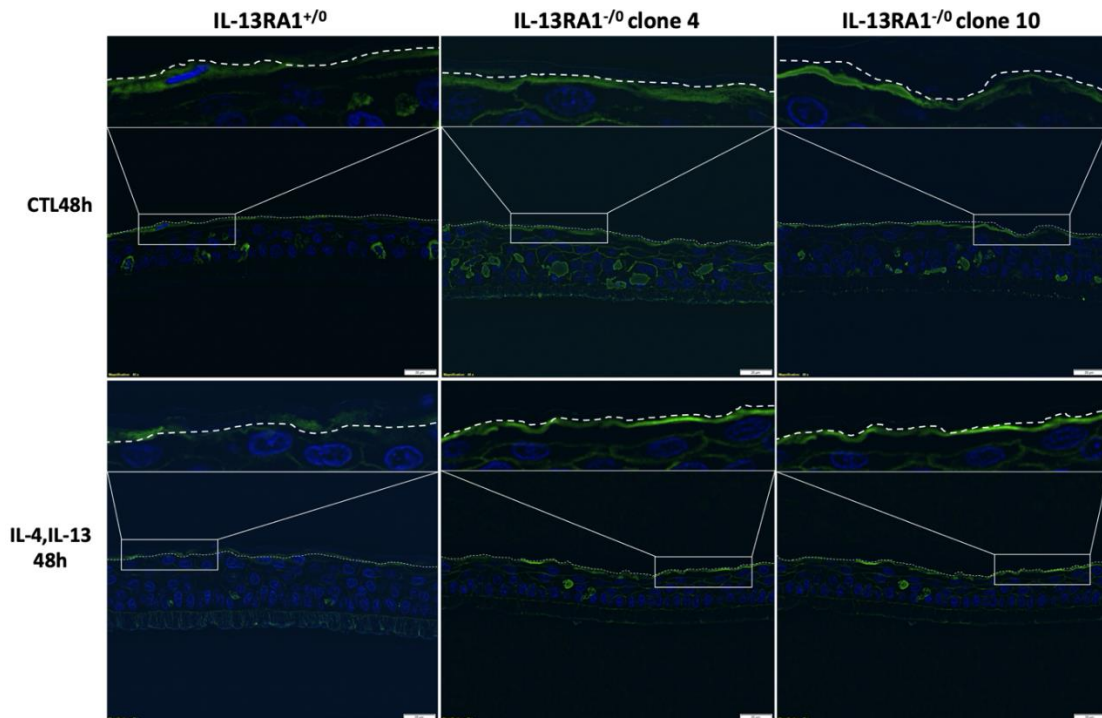


Figure 21. L'intégrité de la barrière épidermique n'est pas impactée par les IL-4 et IL-13 dans les RHE inactivés *IL13RA1*⁻⁰. La barrière cutanée a été analysée par un test « inside-outside » à la biotine. En cas d'altération de la barrière, la biotine s'accumule au niveau de la couche cornée. Les RHE ont été exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Les RHE ont été incubés dans la biotine pendant 30 minutes à 37°C. Les RHE ont été fixés dans du formol acétique, ont été enrobés en paraffine et ont été tranchés de 6 µm. L'observation de la biotine a été effectuée par marquage fluorescent vert à la streptavidine (1/500) et des noyaux par marquage fluorescent bleu au Hoescht (1/100). Ces micrographies sont représentatives de trois expériences indépendantes. La ligne en pointillés représente la séparation entre les cellules vivantes et la couche cornée. La barre d'échelle représente 50 µm.

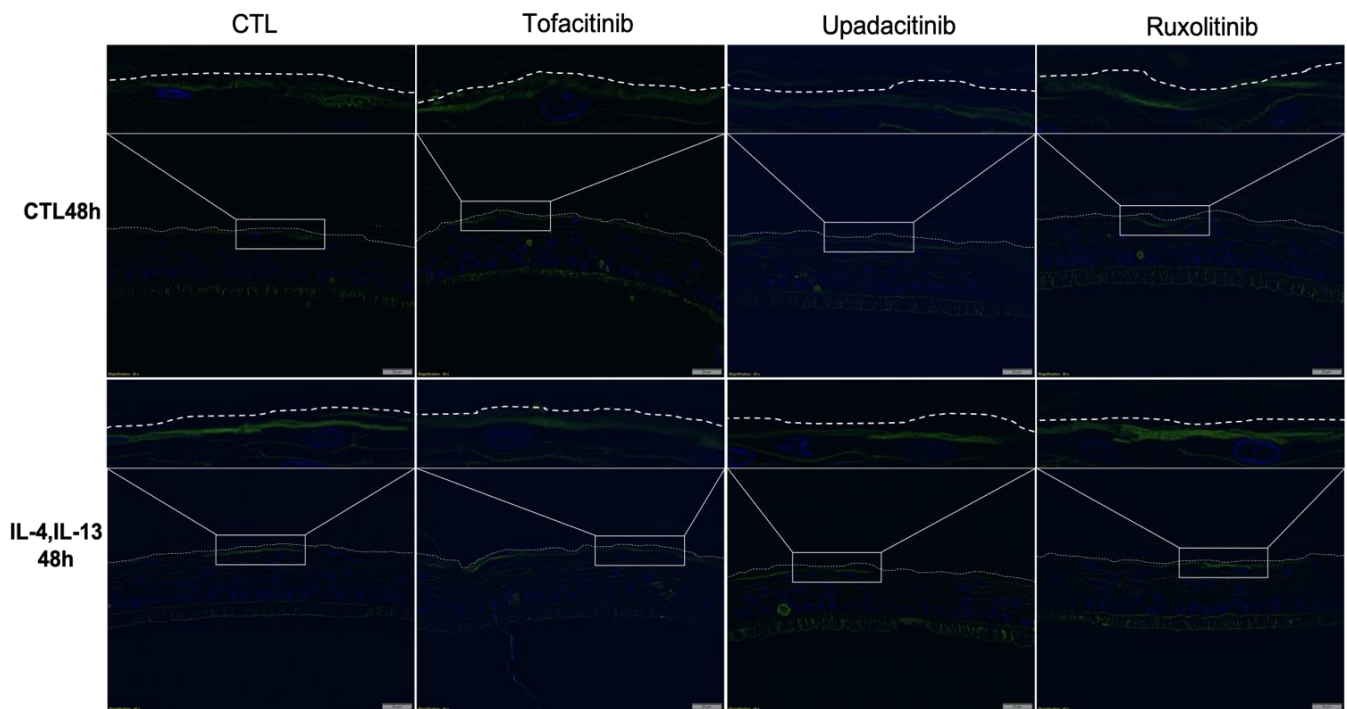


Figure 22. L'intégrité de la barrière épidermique n'est pas impactée par les IL-4 et IL-13 dans les RHE avec ou sans les inhibiteurs de JAK. La barrière cutanée a été analysée par un test « inside-outside » à la biotine. En cas d'altération de la barrière, la biotine s'accumule au niveau de la couche cornée. Les RHE ont été prétraités aux inhibiteurs de JAK (Tofacitinib 1 μ M, Upadacitinib 0,2 μ M et Ruxolitinib 1 μ M) puis exposés aux IL-4 (50 ng/ml) et IL-13 (50 ng/ml) pendant 48 heures. Les RHE ont été incubés dans la biotine pendant 30 minutes à 37°C. Les RHE ont été fixés dans du formol acétique, ont été enrobés en paraffine et ont été tranchés de 6 μ m. L'observation de la biotine a été effectuée par marquage fluorescent vert à la streptavidine (1/500) et des noyaux par marquage fluorescent bleu au Hoescht (1/100). Ces micrographies sont représentatives d'une expérience. La ligne en pointillés représente la séparation entre les cellules vivantes et la couche cornée. La barre d'échelle représente 50 μ m.

Discussion/Perspectives

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu confirmer que notre modèle RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ était bien édité pour le gène *IL13RA1* avant d'utiliser dans notre projet les cellules générées par l'édition CRISPR-Cas9 de leur génome. L'analyse de l'expression a démontré, par le biais d'une analyse des transcrits par RT-qPCR, que nos épidermes N/TERT reconstruits avec deux clones de kératinocytes édités *IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et clone 10 sont bel et bien KO pour ce récepteur. En effet, nous ne notons aucune détection d'expression en ARNm dans les deux clones pour *IL13RA1* comparativement aux kératinocytes N/TERT non édités (**Fig. 11**). Toutefois, il serait intéressant de réaliser d'autres études supplémentaires en parallèle afin d'en être sûr. Par exemple, on pourrait explorer l'expression en protéines par western blot ou effectuer une analyse RT-qPCR avec des amorces ciblant les morceaux nondélévés du gène *IL13RA1* pour vérifier que la technique CRISPR-Cas9 a fonctionné correctement et édité le gène entre l'exon 2 et l'exon 11.

Ensuite, les prémices de nos explorations avec les inhibiteurs de JAK (Tofacitinib, Upadacitinib et Ruxolitinib) dans les RHE primaires, ont révélé que l'expression de *IL13RA1* n'augmente pas avec le mix IL-4 et IL-13 quand les cellules ont été inhibées par ces substances (**Fig. 12**). D'après nos résultats, il semble que l'expression du récepteur IL4R α /IL13R α 1 ne se trouve nullement modifiée par l'incubation avec les IL-4 et IL-13. Nous constatons, en effet, que l'expression des deux chaînes du récepteur reste inchangée, avec ou sans les inhibiteurs de JAK. Ceci nous informe que les inhibiteurs de JAK n'ont aucune action sur l'expression du récepteur de type 2 IL4R α /IL13R α 1.

Suite à nos analyses de l'expression génique, de l'activation de voies de signalisation et de l'intégrité de la barrière, nous avons pu mettre en évidence les rôles potentiels du récepteur IL4R α /IL13R α 1 en condition inflammatoire dans un modèle d'épiderme reconstruit.

Nous pouvons observer que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 est impliqué dans l'expression de la sous-unité IL-2R γ du récepteur de type I et du récepteur IL13R α 2. En effet, l'analyse de l'expression relative en ARNm révèle que ni l'expression d'*IL-2R γ* , ni celle d'*IL13RA2* ne se trouvent induites après le traitement par les incubations avec IL-4 et IL-13, dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ clone 4 et clone 10 (**Fig. 11**). Nous pouvons constater également que les deux clones 4 et 10 présentent un profil d'expression génique pour IL-2R γ et IL13R α 2 quasiment identique. Le fait d'obtenir un profil d'expression identique nous conforte dans les résultats obtenus avec les deux clones RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ ainsi que dans la reproductibilité de l'expérience. Il est intéressant de constater que les résultats obtenus à partir nos deux clones convergent parfaitement avec ceux réalisés par un autre membre de notre laboratoire (Progneaux A., recherche doctorale, URPhyM-NARILIS, Université de Namur, Belgique). De plus, en présence des inhibiteurs de JAK qui vraisemblablement bloquent la fonctionnalité du récepteur IL4R α /IL13R α 1 dans les RHE primaires, l'expression de *IL-2R γ* et *IL13RA2* n'est pas induite non plus, après le traitement aux IL-4 et IL-13 (**Fig. 12**). Suite à l'analyse de l'activation de voies de signalisation, nous constatons que la phosphorylation de la protéine STAT6 n'est plus induite avec les IL-4 et IL-13, dans les RHE primaires prétraités, ce qui confirme leur activité inhibitrice. Ce qui nous conforte aussi dans l'idée que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 intervient dans la modification de l'expression des deux autres récepteurs aux IL-4 et IL-13. Ces inhibiteurs de JAK n'ont toutefois pas montré la même efficacité, en tant qu'inhibiteurs situés en aval de l'activation du IL4R α /IL13R α 1. En effet, parmi les trois inhibiteurs utilisés, les analyses de l'expression en ARNm ont révélé que le Ruxolitinib semble avoir une capacité inhibitrice moins élevée que les deux autres, pour l'expression de *IL-2R γ* et *IL13RA2*. Tandis que le Tofacitinib et l'Upadacitinib, eux, semblent

avoir un effet inhibiteur équivalent. Cette différence d'efficacité pour Ruxolitinib n'est toutefois pas observée lors de l'analyse par western blot, où aucune induction de la phosphorylation n'est constatée pour les trois inhibiteurs. Cette disparité entre les résultats d'analyse par RT-qPCR et western blot pourrait s'expliquer par le fait que l'estimation des concentrations utilisées pour les inhibiteurs n'a été réalisée que par western blot uniquement. Il serait donc intéressant de tester à nouveau plusieurs concentrations différentes de Ruxolitinib en RT-qPCR, en parallèle d'un western blot, afin de confirmer le choix de la concentration minimale efficace.

Suite à nos résultats, nous avons également démontré que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 modifie le profil d'expression génique des kératinocytes en ce qui concerne les marqueurs géniques typiques de la physiopathologie de la DA. En effet, dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ clones 4 et 10, il n'y a pas d'augmentation de l'expression relative en ARNm pour les gènes *CA2*, *NELL2* et *HAS3* suite à l'ajout des IL-4 et IL-13 quand on compare leurs niveaux d'expression avec ceux qui sont détectés dans les cellules contrôles (**Fig. 15**). De la même manière, l'investigation qui utilise les inhibiteurs de JAK a permis des observations qui convergent avec ce qu'on observe lorsqu'on analyse les phénotypes des cellules qui constituent les RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰. Les trois inhibiteurs de JAK (Tofacitinib, Upadacitinib et Ruxolitinib) semblent empêcher l'induction de l'expression des trois marqueurs de la DA (**Fig. 16**). Toutefois, nous pouvons noter une disparité dans l'efficacité des trois inhibiteurs de JAK sur l'expression de ces trois gènes. Encore une fois, le Ruxolitinib semble moins efficace par rapport au Tofacitinib et à l'Upadacitinib, qui sembleraient avoir la même force d'action. Comme expliqué précédemment, la différence d'inhibition pour le Ruxolitinib pourrait être due à l'utilisation d'une concentration qui n'est pas optimale. Etant donné que le Ruxolitinib comme le Tofacitinib et l'Upadacitinib sont tous trois spécifiques à JAK1, on peut en déduire que le Ruxolitinib pourrait avoir une affinité plus faible pour JAK1.

Notre analyse de l'activation de voies de signalisation nous a permis d'observer qu'une fois que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 est activé par les IL-4 et les IL-13, une phosphorylation de la protéine STAT6 est déclenchée. En effet, l'analyse des voies de signalisation par western blot a prouvé, dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ clones 4 et 10, que la protéine STAT6 n'était pas phosphorylée contrairement aux RHE *IL13RA1*⁺⁰, après exposition aux IL-4 et IL-13 (**Fig. 17**). De plus, nous avons observé une perte de cette induction de la phosphorylation pour STAT6 avec les inhibiteurs de JAK, comparativement à la condition sans inhibiteurs, où la phosphorylation est présente après exposition aux ILs (**Fig. 18**). Le récepteur de type II IL4R α /IL13R α 1 pourrait donc intervenir dans la condition inflammatoire épidermique en utilisant la voie impliquant la protéine STAT6. Pour vérifier, que la voie STAT6 est la voie utilisée par le récepteur dans la condition inflammatoire Th2, nous pourrions essayer d'inhiber STAT6p. Pratiquement, nous pourrions utiliser un inhibiteur spécifique de STAT6 avec, par exemple, l'inhibiteur AS1517499 (Chiba et al., 2009; Chu et al., 2020). Nous pourrions également générer des kératinocytes knock-down en utilisant des ARNsi (Darcan-Nicolaisen et al., 2009) ou des kératinocytes knock-out (DiScala et al., 2020) pour le gène *STAT6*. Comme cela nous pourrions analyser si le récepteur IL4R α /IL13R α 1 garde son effet sur l'épiderme. Nous avons également mis en évidence que les IL-4 et IL-13 induisent la phosphorylation de la protéine ERK. La révélation du western blot dévoile une phosphorylation de la protéine, avec une cinétique relativement courte (15-30 minutes), que ce soit dans les RHE N/TERT édités ou non édités pour *IL13RA1* ou dans les RHE primaires, avec ou sans les inhibiteurs de JAK (**Fig. 17-18**). Nous proposerions donc l'hypothèse selon laquelle l'IL-4 et/ou l'IL-13 seraient responsables de la phosphorylation de ERK,

indépendamment du récepteur IL4R α /IL13R α 1. De manière à identifier l'origine de ce qui induit cette phosphorylation, nous pourrions réaliser des traitements par les ILs, mais avec les IL-4 et les IL-13 ajoutées séparément, pour déterminer laquelle IL est impliquée dans l'induction. Afin de vérifier si les récepteurs IL4R α /IL13R α 1 et IL4R α /IL-2R γ interviennent dans cette induction de la phosphorylation de ERK, nous travaillerions avec des RHE reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT doublement KO pour le gène *IL13RA1* et *IL2RG*. Etant donné que le Tofacitinib, l'Upadacitinib et le Ruxolitinib ne sont pas des inhibiteurs très spécifiques, car ils inhibent tous JAK1 qui est une JAK communément associée aux récepteurs IL4R α /IL-2R γ et IL4R α /IL13R α 1. Nous pourrions utiliser un inhibiteur, de tyrosine kinase 2 (TYK2), plus spécifique du récepteur IL4R α /IL13R α 1 (comme l'inhibiteur BMS-986165 ou PF-0670084 ; Gadina et al., 2018).

Par ailleurs, nous avons remarqué que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 n'est pas impliqué dans la modification de l'expression génique de protéines de la barrière cutanée dans nos deux modèles RHE. En effet, l'analyse de l'expression en ARNm pour la *LOR*, la *FLG1* et la *FLG2* n'atteste aucun changement notable de l'expression des trois gènes dans les RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0} et *IL13RA1*^{-/0} (clone 4 et clone 10), avec ou sans l'ajout des IL-4 et IL-13 (**Fig. 15**). De plus, l'utilisation des RHE primaires et des inhibiteurs de JAK appuie également le fait que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 ne semble pas être impliqué dans cette modification du profil génique (**Fig. 16**). Nous n'observons pas davantage de modification de l'expression des trois protéines dans les RHE primaires, incubés avec ou sans les inhibiteurs de JAK.

De plus, nous avons démontré que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 n'intervient pas au niveau des changements morphologiques du tissu épidermique. Nos observations morphologiques des coupes histologiques prouvent que la reconstruction du modèle 3D RHE avec les kératinocytes N/TERT et primaires est une réussite et que l'épiderme est complet histologiquement (**Fig. 13-14**), comme on pouvait l'attendre, au vu de la littérature. Il est toutefois essentiel de garder à l'esprit que les RHE N/TERT ne miment pas parfaitement les RHE primaires ; avec comme principale différence une couche cornée plus mince, comparativement aux RHE formés par les cellules primaires en culture. Ensuite, nous n'avons remarqué aucun changement morphologique, telles qu'une hypogranulose ou une spongiose, que ce soit dans nos RHE *IL13RA1*^{+/-0}, *IL13RA1*^{-/0} et RHE primaires, prétraités ou non, après incubation avec les IL-4 et IL-13. Au vu du mimétisme incomplet des RHE N/TERT *IL13RA1*^{+/-0}, on peut penser que les kératinocytes N/TERT ne sont pas parfaitement adéquats pour étudier les modifications morphologiques de l'épiderme produites par les conditions de réponse immune Th2. Par contre, l'absence de modification morphologique dans nos RHE primaires est étonnante car cela s'oppose aux résultats vus dans la littérature. En effet, la spongiose et l'hypogranulose n'ont pas pu être observées après l'exposition aux IL-4 et IL-13 avec nos RHE primaires non -prétraités, ce qui ne confirme pas ce qui a été publié ; comme par exemple, dans l'étude de De Vuyst et al. Dans cette étude, des RHE ont été reconstruits à partir de kératinocytes primaires et ont été exposés pendant 48 heures aux IL-4, IL-13 et IL-25. Il a été démontré que le traitement aux ILs a provoqué une hypogranulose (un amincissement de la couche granuleuse) et une spongiose (une augmentation des espaces intercellulaires) au sein des épidermes. Cette disparité entre nos résultats et l'étude préalablement réalisée par De Vuyst et al pourrait s'expliquer par une différence d'origine des kératinocytes primaires. En effet, les kératinocytes de notre étude proviennent d'un patient différent. Les kératinocytes primaires utilisés dans notre étude pourraient peut-être répondre aux stimulations étudiées de manière différente à ceux utilisés lors de l'étude réalisée par De Vuyst et al. La disparité entre notre étude et celle précitée, pourrait aussi être due au fait que le traitement appliqué est différent. En plus des IL-4 et IL-13, que nous utilisons, ils utilisent

l'IL-25 et la méthyl- β -cyclodextrine. Il serait donc nécessaire de reproduire notre étude avec des RHE reconstruits à partir de kératinocytes primaires provenant d'au minimum deux patients différents supplémentaires. Ceci permettrait de confirmer ou non les résultats obtenus jusqu'à présent avec nos RHE primaires et comprendre l'éventuelle variabilité.

Enfin, nous notons que l'activation du récepteur IL4R α /IL13R α 1 jouerait potentiellement un rôle dans l'altération de la barrière épidermique. La première partie de notre étude avec les RHE N/TERT prouve que le récepteur est impliqué dans l'altération de la barrière cutanée. Nous avons remarqué dans nos RHE N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ que la barrière épidermique ne s'altère pas lors du traitement par les IL-4 et IL-13, comparativement aux RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰. En effet, nous avons observé que la résistance électrique reste inchangée dans RHE *IL13RA1*⁻⁰ par rapport aux RHE *IL13RA1*⁺⁰ où la résistance diminue, traduisant une altération de l'efficacité la barrière cutanée vis-à-vis d'ions de petite taille (**Fig. 19**). De plus, le test de perméabilité de la barrière *inside-outside* à la biotine révèle également que la barrière reste efficace dans les RHE KO *IL13RA1*⁻⁰ après exposition au mélange d'IL-4 et IL-13, comparé aux RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ non édités où on peut retrouver de la biotine dans la couche cornée, révélant une altération (**Fig. 21**). Ceci nous conforte dans l'idée que la signalisation en aval du récepteur IL4R α /IL13R α 1 modifie le phénotype cellulaire d'une façon qui finalement perturbe la barrière épidermique. Cependant, ces modifications ne sont pas constatées dans les RHE primaires. Contrairement aux RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰, nous retrouvons une barrière intacte après le traitement aux IL-4 et IL-13, dans les RHE primaires prétraités mais aussi non-prétraités aux inhibiteurs de JAK. Les résistances électriques diminuent légèrement dans le contrôle mais elles restent hautes (au-dessus de 8000) dans les RHE primaires non-prétraités, ce qui signifie que la barrière n'est pas, ou peu, impactée (**Fig. 20**). De plus, le test *inside-outside* de la barrière à la biotine ne révèle aucun signal fluorescent dans la couche cornée, après incubation aux IL-4 et IL-13, dans les RHE primaires non-prétraités indiquant que la barrière est inaltérée (**Fig. 22**).

Cette disparité, en termes de résultats d'altération de la barrière entre les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰ et les RHE primaires non-prétraités, pourrait s'expliquer par une épaisseur bien plus mince de la couche cornée présente dans les RHE N/TERT. Nous pourrions de ce fait émettre l'hypothèse que la barrière est plus facilement altérable avec les RHE N/TERT. La disparité entre nos résultats concernant la barrière dans les RHE primaires et ceux de l'étude de De Vuyst et al pourrait s'expliquer par une légère différence de traitement. En effet, l'IL-25 a aussi été ajouté lors du traitement en plus des IL-4 et IL-13. L'ajout d'IL-25 pourrait avoir un effet non négligeable sur la barrière, comme démontré dans la littérature, ce qui expliquerait éventuellement la divergence de nos résultats. Par ailleurs, l'analyse de l'expression génique pour les protéines de la barrière dans nos RHE primaires et RHE N/TERT va dans le même sens que nos résultats de la résistance électrique et du test *inside-outside* à la biotine dans les RHE primaires. En effet, nous ne constatons pas de différence de l'expression pour la loricrine et la filaggrine après exposition aux IL-4 et IL-13 dans notre projet. Cependant, nous avons remarqué tout de même une altération de la barrière épidermique dans les RHE N/TERT *IL13RA1*⁺⁰, après le traitement aux ILs. Par conséquent, nous pourrions proposer l'hypothèse selon laquelle l'activation du récepteur IL4R α /IL13R α 1 pourrait jouer un rôle dans la perturbation de la barrière. Ceci en impactant l'expression d'autres protéines importantes pour la barrière cutanée, telles que les protéines S100 et les protéines SPRRs (small proline-rich proteins). Ces protéines sont codées par les gènes EDC (epidermal differentiation complex) sur trouvant sur le chromosomes 1q21 (Hoffjan & Stemmler, 2007).

Pour conclure, l'ensemble de nos résultats suggèrent que le récepteur de type II IL4R α /IL13R α 1 est capable de jouer un rôle central dans la condition inflammatoire induite par les IL-4 et IL-13, dans un modèle d'épiderme reconstruit. Tout d'abord, ce récepteur IL4R α /IL13R α 1 semble intervenir dans l'induction de l'expression de la sous-unité IL-2R γ du récepteur de type I et du récepteur IL13R α 2. Ensuite, nos analyses révèlent l'intervention du récepteur IL4R α /IL13R α 1 dans la modification du phénotype des kératinocytes constituant les épidermes reconstruits. Le récepteur jouerait un rôle dans l'induction de l'expression de trois marqueurs (à savoir CA2, NELL2 et HAS3) caractéristiques de la physiopathologie de la dermatite atopique. L'analyse de l'activation de voies de signalisation dévoile une phosphorylation de STAT6 suite à l'activation du récepteur IL4R α /IL13R α 1. Pour finir, les analyses dévoilent aussi que le récepteur IL4R α /IL13R α 1 pourrait être impliqué dans la perte d'intégrité dans la barrière en conditions inflammatoires provoquées par des cytokines de type Th2. Les expériences utilisant les épidermes reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT KO suggèrent une intervention du récepteur dans l'altération la barrière. Le récepteur de type II IL4R α /IL13R α 1 serait impliqué dans la modification du profil d'expression génique des kératinocytes, ainsi que dans l'altération de la barrière cutanée. Ce qui en fait une cible thérapeutique extrêmement intéressante pour de futures thérapies contre la dermatite atopique.

Cependant, il sera nécessaire de répéter certaines analyses : morphologiques, d'expressions relatives en ARNm, d'activation de voies de signalisation et de l'intégrité de la barrière épidermique avec les RHE primaires prétraités aux inhibiteurs de JAK afin de pouvoir évaluer la signification de nos résultats au niveau statistique. De plus, nous avons vu précédemment qu'il serait intéressant d'ajouter des analyses réalisées sur des kératinocytes primaires provenant de deux patients différents supplémentaires. Nous devrions également travailler avec au minimum un troisième clone N/TERT *IL13RA1*⁻⁰ supplémentaire. L'utilisation d'un troisième clone confirmerait que les résultats obtenus ne sont pas dus au hasard mais spécifiquement dus à l'inactivation du gène *IL13RA1*.

Pour aller plus loin dans nos recherches, nous pourrions analyser l'implication du récepteur de type II IL4R α /IL13R α 1 en condition inflammatoire, mais aussi en condition d'infection, dans un modèle d'épiderme reconstruit. En effet, dans la littérature, nous avons remarqué une augmentation des IL-4 et IL-13, ainsi qu'une prédisposition aux infections à des pathogènes, comme *staphylococcus aureus*, dans la peau de patient atteint de la DA. De ce fait, nous pourrions élaborer un modèle d'infection in vitro impliquant *staphylococcus aureus*. Nous pourrions débiter avec le modèle d'infection le plus simple possible. Pour ce faire, nous pourrions essayer de mimer la présence de *S.aureus* en utilisant un antigène du pathogène avec notre modèle RHE. Une molécule intéressante à utiliser serait le LTA. Le LTA (acide lipoteichoïque) est une molécule produite par *S.aureus*, retrouvée dans la paroi de la bactérie. Il a été démontré que le LTA est une molécule-clé dans l'inflammation épidermique induite par *S.aureus*, causant des dommages à la barrière cutanée et inhibant la différenciation des kératinocytes (Brauweiler et al., 2019; Brauweiler et al., 2021). Ainsi, il serait intéressant de mettre nos épidermes une fois reconstruits et plus particulièrement leur couche cornée en contact avec le LTA de *S.aureus*. Nous pourrions comparé les RHE traités et non traités aux IL-4 et IL-13 en plus du LTA afin d'investiguer si l'effet des ILs favorise ou non, la pénétration de LTA au niveau de la couche cornée. Ceci tenterait de confirmer ou non, l'hypothèse inside-outside avec le cercle vicieux. Cependant, des mises au point sont nécessaires afin de déterminer le temps d'incubation et la concentration utilisée pour la molécule. Après l'emploi du LTA, nous pourrions passer à un modèle d'infection avec la bactérie *S.aureus* elle-même, comme cela a déjà été fait dans la littérature (Popov et al., 2014;

Rosignoli et al., 2018). Ici aussi, il sera nécessaire de mettre au point le modèle et d'évaluer le temps d'incubation et la concentration en bactéries à utiliser. Il est également possible de passer à un modèle HSE (human skin equivalent) en condition d'infection avec *S.aureus* (Haisma et al., 2013), en ajoutant des cellules immunitaires (comme des lymphocytes). Ceci, permettra de prendre en compte les réponses immunitaires au sein du modèle et ainsi d'investiguer l'hypothèse outside-inside du cycle vicieux. Nous pourrions aussi étudier l'intervention du récepteur de type II IL4R α /IL13R α 1 dans un modèle encore plus complexe, comme un modèle de peau vascularisée. En effet, il a été démontré qu'il était possible de réaliser, grâce à des techniques de bio-impression en 3D, un modèle de tissu multicellulaire avec un derme vascularisé humain en 3D (Liu et al., 2020). Etant donné que ce modèle de peau vascularisé a révélé des ressemblances très étroites avec la peau humaine *in vivo*, il pourrait être très intéressant pour étudier l'implication de notre récepteur IL4R α /IL13R α 1 en condition *in vivo* et ainsi proposer une alternative aux expérimentations animales (Groeber et al., 2016).

Bibliographie

- Andrews, A. L., Nordgren, I. K., Kirby, I., Holloway, J. W., Holgate, S. T., Davies, D. E., & Tavassoli, A. (2009). Cytoplasmic tail of IL-13R α 2 regulates IL-4 signal transduction. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4), 873-876. <https://doi.org/10.1042/BST0370873>
- Bakker, D. S., van der Wal, M. M., Heeb, L. E. M., Giovannone, B., Asamoah, M., Delemarre, E. M., Drylewicz, J., Nierkens, S., Boyman, O., de Bruin-Weller, M. S., Thijs, J. L., & van Wijk, F. (2021). Early and Long-Term Effects of Dupilumab Treatment on Circulating T-Cell Functions in Patients with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 141(8), 1943-1953 e1913. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.022>
- Bieber, T., Simpson, E. L., Silverberg, J. I., Thaci, D., Paul, C., Pink, A. E., Kataoka, Y., Chu, C. Y., DiBonaventura, M., Rojo, R., Antinew, J., Ionita, I., Sinclair, R., Forman, S., Zdybski, J., Biswas, P., Malhotra, B., Zhang, F., Valdez, H., & Investigators, J. C. (2021). Abrocitinib versus Placebo or Dupilumab for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*, 384(12), 1101-1112. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2019380>
- Bissonnette, R., Papp, K. A., Poulin, Y., Gooderham, M., Raman, M., Mallbris, L., Wang, C., Purohit, V., Mamolo, C., Papacharalambous, J., & Ports, W. C. (2016). Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br J Dermatol*, 175(5), 902-911.
- Bitton, A., Avlas, S., Reichman, H., Itan, M., Karo-Atar, D., Azouz, N. P., Rozenberg, P., Diesendruck, Y., Nahary, L., Rothenberg, M. E., Benhar, I., & Munitz, A. (2020). A key role for IL-13 signaling via the type 2 IL-4 receptor in experimental atopic dermatitis. *Sci Immunol*, 5(44). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw2938>
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatol Alergol*, 33(1), 1-5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Brauweiler, A. M., Goleva, E., & Leung, D. Y. M. (2019). Staphylococcus aureus Lipoteichoic Acid Damages the Skin Barrier through an IL-1-Mediated Pathway. *J Invest Dermatol*, 139(8), 1753-1761 e1754. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.02.006>
- Brauweiler, A. M., Leung, D. Y. M., & Goleva, E. (2021). The Transcription Factor p63 Is a Direct Effector of IL-4- and IL-13-Mediated Repression of Keratinocyte Differentiation. *J Invest Dermatol*, 141(4), 770-778. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.09.009>
- Cabanillas, B., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr Opin Immunol*, 42, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.002>
- Cau, L., Pendaries, V., Lhuillier, E., Thompson, P. R., Serre, G., Takahara, H., Mechin, M. C., & Simon, M. (2017). Lowering relative humidity level increases epidermal protein

- deimination and drives human filaggrin breakdown. *J Dermatol Sci*, 86(2), 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.02.280>
- Chiba, Y., Todoroki, M., Nishida, Y., Tanabe, M., & Misawa, M. (2009). A novel STAT6 inhibitor AS1517499 ameliorates antigen-induced bronchial hypercontractility in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41(5), 516-524. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0163OC>
- Cho, E., Kim, C., Kook, J.-K., Jeong, Y. I., Kim, J. H., Kim, Y. A., Endo, M., & Hwang, C. H. (2012). Fabrication of electrospun PVDF nanofiber membrane for Western blot with high sensitivity. *Journal of Membrane Science*, 389, 349-354. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.10.047>
- Chu, K. H., Lin, S. Y., & Chiang, B. L. (2020). STAT6 Pathway Is Critical for the Induction and Function of Regulatory T Cells Induced by Mucosal B Cells. *Front Immunol*, 11, 615868. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615868>
- Darcan-Nicolaisen, Y., Meinicke, H., Fels, G., Hegend, O., Haberland, A., Kuhl, A., Loddenkemper, C., Witzenrath, M., Kube, S., Henke, W., & Hamelmann, E. (2009). Small interfering RNA against transcription factor STAT6 inhibits allergic airway inflammation and hyperreactivity in mice. *J Immunol*, 182(12), 7501-7508. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713433>
- David, M., Ford, D., Bertoglio, J., Maizel, A. L., & Pierre, J. (2001). Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene*, 20(46), 6660-6668. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204629>
- De Vuyst, E., Giltaire, S., Lambert de Rouvroit, C., Chretien, A., Salmon, M., & Poumay, Y. (2015). The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. *Arch Dermatol Res*, 307(4), 309-318. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1537-3>
- De Vuyst, E., Giltaire, S., Lambert de Rouvroit, C., Malaisse, J., Mound, A., Bourtembourg, M., Poumay, Y., Nikkels, A. F., Chretien, A., & Salmon, M. (2018). Methyl-beta-cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol*, 27(4), 435-437. <https://doi.org/10.1111/exd.13113>
- De Vuyst, E., Mound, A., Lambert de Rouvroit, C., & Poumay, Y. (2016). Modelling atopic dermatitis during the morphogenetic process involved in reconstruction of a human epidermis. *Curr Res Transl Med*, 64(4), 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.005>
- De Vuyst, E., Prognaux, A., Bourtembourg, M., Salmon, M., de Rouvroit, C. L., & Poumay, Y. (2018). In vitro model of altered epidermal barrier indicates roles for as yet unsuspected receptors. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(5), S156.
- De Vuyst, E., Salmon, M., Evrard, C., Lambert de Rouvroit, C., & Poumay, Y. (2017). Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Front Med (Lausanne)*, 4, 119. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00119>

- DiScala, M., Najor, M. S., Yung, T., Morgan, D., Abukhdeir, A. M., & Cobleigh, M. A. (2020). Loss of STAT6 leads to anchorage-independent growth and trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer cells. *PLoS One*, *15*(6), e0234146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234146>
- Evrard, C., Faway, E., De Vuyst, E., Svensen, O., De Glas, V., Bergerat, D., Salmon, M., De Backer, O., Flamion, B., Le-Buanec, H., Lambert de Rouvroit, C., & Poumay, Y. (2021). Deletion of TNFAIP6 Gene in Human Keratinocytes Demonstrates a Role for TSG-6 to Retain Hyaluronan Inside Epidermis. *JID Innovations*, *1*(4). <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2021.100054>
- Ferreira, S., Guttman-Yassky, E., & Torres, T. (2020). Selective JAK1 Inhibitors for the Treatment of Atopic Dermatitis: Focus on Upadacitinib and Abrocitinib. *Am J Clin Dermatol*, *21*(6), 783-798. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00548-6>
- Frankart, A., Malaise, J., De Vuyst, E., Minner, F., de Rouvroit, C. L., & Poumay, Y. (2012). Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol*, *21*(11), 871-875. <https://doi.org/10.1111/exd.12020>
- Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T., & Kipnis, J. (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*, *189*(9), 4213-4219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>
- Gadina, M., Johnson, C., Schwartz, D., Bonelli, M., Hasni, S., Kanno, Y., Changelian, P., Laurence, A., & O'Shea, J. J. (2018). Translational and clinical advances in JAK-STAT biology: The present and future of jakinibs. *J Leukoc Biol*, *104*(3), 499-514. <https://doi.org/10.1002/JLB.5RI0218-084R>
- Groeber, F., Engelhardt, L., Lange, J., Kurdyn, S., Schmid, F. F., Rucker, C., Mielke, S., Walles, H., & Hansmann, J. (2016). A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation. *ALTEX*, *33*(4), 415-422. <https://doi.org/10.14573/altex.1604041>
- Haisma, E. M., Rietveld, M. H., de Breij, A., van Dissel, J. T., El Ghalbzouri, A., & Nibbering, P. H. (2013). Inflammatory and antimicrobial responses to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound infection model. *PLoS One*, *8*(12), e82800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082800>
- Hennies, H. C., & Poumay, Y. (2021). Skin Disease Models In Vitro and Inflammatory Mechanisms: Predictability for Drug Development. *Handb Exp Pharmacol*, *265*, 187-218. https://doi.org/10.1007/164_2020_428
- Hoffjan, S., & Stemmler, S. (2007). On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol*, *157*(3), 441-449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07999.x>
- Honari, G., Andersen, R., & Maibach, H. L. (2017). *Sensitive skin syndrome*. CRC Press.
- Huet, F., Severino-Freire, M., Cheret, J., Gouin, O., Praneuf, J., Pierre, O., Misery, L., & Le Gall-Ianotto, C. (2018). Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *J Dermatol Sci*, *89*(3), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.015>

- Ishitsuka, Y., & Roop, D. R. (2020). Loricrin: Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072271>
- Junttila, I. S. (2018). Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol*, 9, 888. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>
- Kalinin, A., Marekov, L. N., & Steinert, P. M. (2001). Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci*, 114(Pt 17), 3069-3070. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590230>
- Kezic, S., & Jakasa, I. (2016). Filaggrin and Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol*, 49, 1-7. <https://doi.org/10.1159/000441539>
- Kezic, S., Novak, N., Jakasa, I., Jungersted, J. M., Simon, M., Brandner, J. M., Middelkamp-Hup, M. A., & Weidinger, S. (2014). Skin barrier in atopic dermatitis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, 542-556. <https://doi.org/10.2741/4225>
- Kim, B. S., Howell, M. D., Sun, K., Papp, K., Nasir, A., Kuligowski, M. E., & Investigators, I. S. (2020). Treatment of atopic dermatitis with ruxolitinib cream (JAK1/JAK2 inhibitor) or triamcinolone cream. *J Allergy Clin Immunol*, 145(2), 572-582. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.08.042>
- Koh, B. H., Hwang, S. S., Kim, J. Y., Lee, W., Kang, M. J., Lee, C. G., Park, J. W., Flavell, R. A., & Lee, G. R. (2010). Th2 LCR is essential for regulation of Th2 cytokine genes and for pathogenesis of allergic asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(23), 10614-10619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005383107>
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Leung, D. Y. (2013). New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*, 62(2), 151-161. <https://doi.org/10.2332/allergolint.13-RAI-0564>
- Liu, X., Michael, S., Bharti, K., Ferrer, M., & Song, M. J. (2020). A biofabricated vascularized skin model of atopic dermatitis for preclinical studies. *Biofabrication*, 12(3), 035002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab76a1>
- Malaisse, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit, C., Nikkels, A. F., Flamion, B., & Poumay, Y. (2014). Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol*, 134(8), 2174-2182. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.147>
- Mathes, S. H., Ruffner, H., & Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliv Rev*, 69-70, 81-102. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>

- Nithya, S., Radhika, T., & Jeddy, N. (2015). Loricrin - an overview. *J Oral Maxillofac Pathol*, 19(1), 64-68. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.157204>
- Popov, L., Kovalski, J., Grandi, G., Bagnoli, F., & Amieva, M. R. (2014). Three-Dimensional Human Skin Models to Understand Staphylococcus aureus Skin Colonization and Infection. *Front Immunol*, 5, 41. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00041>
- Rosignoli, C., Thibaut de Menonville, S., Orfila, D., Beal, M., Bertino, B., Aubert, J., Mercenier, A., & Piwnica, D. (2018). A topical treatment containing heat-treated *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 reduces *Staphylococcus aureus* adhesion and induces antimicrobial peptide expression in an in vitro reconstructed human epidermis model. *Exp Dermatol*, 27(4), 358-365. <https://doi.org/10.1111/exd.13504>
- Rouaud-Tinguely, P., Boudier, D., Marchand, L., Barruche, V., Bordes, S., Coppin, H., Roth, M. P., & Closs, B. (2015). From the morphological to the transcriptomic characterization of a compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 173(4), 1006-1014. <https://doi.org/10.1111/bjd.14012>
- Smits, J. P. H., Niehues, H., Rikken, G., van Vlijmen-Willems, I., van de Zande, G., Zeeuwen, P., Schalkwijk, J., & van den Bogaard, E. H. (2017). Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep*, 7(1), 11838. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12041-y>
- Sriram, G., Bigliardi, P. L., & Bigliardi-Qi, M. (2019). Full-Thickness Human Skin Equivalent Models of Atopic Dermatitis. *Methods Mol Biol*, 1879, 367-383. https://doi.org/10.1007/7651_2018_163
- Tsakok, T., Woolf, R., Smith, C. H., Weidinger, S., & Flohr, C. (2019). Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol*, 180(3), 464-474. <https://doi.org/10.1111/bjd.16934>
- Venus, M., Waterman, J., & McNab, I. (2010). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 28(10), 469-472. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.07.011>
- Williams, H. C. (2005). Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 352(22), 2314-2324. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp042803>
- Yuan, S.-M. (2019). Interleukin-13 in the pathogenesis of pulmonary artery hypertension. *Journal of Laboratory Medicine*, 43(1), 5-11. <https://doi.org/10.1515/labmed-2018-0323>
- Zhang, J. L., Buehner, M., & Sebald, W. (2002). Functional epitope of common gamma chain for interleukin-4 binding. *Eur J Biochem*, 269(5), 1490-1499. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02796.x>
- Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75(1), 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>