



Etude du rôle de PAR-2 dans l'inflammation neurogène cutanée

Olivier Gouin

► To cite this version:

Olivier Gouin. Etude du rôle de PAR-2 dans l'inflammation neurogène cutanée. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT : 2017BRES0030 . tel-01717705

HAL Id: tel-01717705

<https://theses.hal.science/tel-01717705>

Submitted on 26 Feb 2018

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

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

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie-Santé

École Doctorale « Santé, Information, Communication,
Mathématique, Matière » (ED SICMA 373)

présentée par

Olivier GOUIN

Préparée au Laboratoire des Interactions
Epithéliums-Neurones (LIEN), EA-4685

Thèse soutenue le 24 mars 2017

devant le jury composé de :

Pr Laurent MISERY

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Directeur de thèse
Laboratoire des Interactions Epithéliums-Neurones (LIEN), EA-4685

Dr Nicolas LEBONVALLET

Docteur, Université de Bretagne Occidentale / Co-encadrant de thèse
Laboratoire des Interactions Epithéliums-Neurones (LIEN), EA-4685

Dr Hélène BOUDIN

Docteur, Université de Nantes / Rapporteur
INSERM, UMR-913

Dr Laurence MICHEL

Docteur, Université Paris Diderot / Rapporteur
INSERM, UMR-976

Pr Alain HOVNANIAN

Professeur, Université Paris Descartes / Examineur
INSERM, UMR-S1164

Pr Jean-Luc CARRÉ

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Examineur
Laboratoire des Interactions Epithéliums-Neurones (LIEN), EA-4685

Dr Luc LEFEUVRE

Pharmacien, Laboratoires Dermatologiques d'Uriage / Invité

**Etude du rôle de PAR-2
dans
l'inflammation neurogène cutanée**

Remerciements

« *Alea jacta est* » et je franchis le Rubicon de ces trois années de thèse.

(Suétone, *Caesar*, 32)

Tout d'abord, je souhaite remercier chaleureusement le Pr Laurent Misery, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du Laboratoire des Interactions Epithéliums-Neurones (LIEN). J'ai pu mener mon travail jusqu'au bout grâce à son encadrement, ses conseils et ses encouragements.

Mon second remerciement va tout naturellement à mon co-encadrant de thèse, le Dr Nicolas Lebonvallet, pour sa présence et les différentes discussions professionnelles tout au long de ma thèse.

Je remercie également les Laboratoires Dermatologiques d'Uriage pour nous avoir fait confiance ainsi que pour le financement qui nous a permis de mener à bien ce travail. Je tiens plus particulièrement à remercier le Dr Luc Lefeuvre pour ses conseils avisés et ses expertises lors de nos rencontres.

Je tiens à remercier tous les membres de mon Jury de thèse le Pr Laurent Misery, le Pr Jean-Luc Carré, le Pr Alain Hovnanian, le Dr Laurence Michel, le Dr Hélène Boudin et le Dr Nicolas Lebonvallet qui m'ont fait l'honneur de lire et d'évaluer mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse.

J'adresse aussi mes remerciements au Dr Olivier Mignen et à toute son équipe de l'UMR1078, Canalopathies et Signalisation Calcique, pour la mise à disposition de la plateforme d'imagerie calcique, de leurs conseils avisés et pour les échanges scientifiques approfondis.

Un grand MERCI à mes deux acolytes de bureau. Tout d'abord à Killian L'Hérondelle, j'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, merci pour m'avoir toujours fait confiance en me faisant participer à tes réflexions scientifiques, de m'avoir conseillé, soutenu et critiqué dans mon travail. Merci également pour toutes les discussions et moments que nous avons partagés, pour ton écoute et tes conseils. Tu fais partie des personnes qui m'ont aidé à grandir (même si je mesure déjà 1 m 90). Merci à Mohammed Boujaranne, pour ta bonne humeur et

surtout ton humour décallé, toutes nos discussions partagées mais également pour ton aide et tes conseils dans la relecture de mon manuscrit. Périnée forever :) !!

Je remercie plus particulièrement le Dr Christelle Le Gall-Ianotto, le Dr Virginie Buhé et le Dr Raphaële Le Garrec pour m'avoir guidé dans des réflexions et expériences scientifiques tout au long de ces 3 années. Je les remercie pour leur disponibilité, leur exigence et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail de recherche.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont fait partie de l'équipe. Raphaël Leschiera, pour avoir partagé ton expérience, le Dr Mehdi Sakka, pour ta gentillesse, ta disponibilité et nos discussions au labo et le Dr Matthieu Talagas et le Dr Véronique Thébaut, pour nos échanges scientifiques.

Un grand merci à la relève du laboratoire : à Adeline Bataille, Ophélie Pierre (casse noisette) et Peyman Najafi pour tous ces moments magnifiques et conviviaux passés ensemble autour d'une Chouffe.

Pour finir, je remercie Katell Floch et Micheline Rouillard pour ces trois magnifiques années de thèse passées avec elles. Je les remercie surtout pour leur bonne humeur, pour leur soutien et pour tous les bons moments.

Un immense merci à ma famille sans qui rien n'aurait été possible. A ma compagne, Aurore, pour son soutien, son aide précieuse, sa patience et surtout pour ses déplacements entre Paris-Brest (pas le dessert). A mes parents, mon frère et tous mes amis pour leur soutien tout au long de ma thèse, même si la biologie cutanée reste un grand mystère pour eux. A ma petite boule de poils de chat, Athénaïs, qui a su m'apporter calins et compagnie durant les longues soirées de rédaction de ma thèse.

Mille mercis pour tout.

Sommaire

INTRODUCTION	11
I. Peau et inflammation cutanée	12
A. La peau	12
1. Définition	12
2. Organisation	13
2.1. L'épiderme	14
2.2. La jonction dermo-épidermique	17
2.3. Le derme	17
2.4. L'hypoderme	21
3. Le réseau vasculaire cutané	21
B. L'inflammation cutanée	23
1. Définition	23
2. Déroulement de l'inflammation	23
II. Système nerveux cutané et Inflammation Neurogène Cutanée	25
A. Le système nerveux cutané	26
1. Organisation de l'innervation cutanée	26
2. Le système nerveux sensoriel cutané	26
2.1. La sensibilité	26
2.2. Organisation morphologique	27
2.3. Les nocicepteurs, thermocepteurs et pruricepteurs cutanés	29
3. Interactions neuro-cutanées	32
B. Inflammation Neurogène Cutanée	34
1. Définition et principaux acteurs impliqués dans l'INC (Article 1)	34
2. Rôle des TRPs et de leur sensibilisation dans l'INC (Article 2)	39
Abstract	40
1. Introduction	41
2. TRPV1	43
3. TRPA1	50
4. Cross-regulation between TRPV1 and TRPA1	58
5. Conclusions and future directions	60
C. Dermatoses associées à l'INC et traitements	62
1. Dermatoses prurigineuses associées à l'INC et aux récepteurs PARs	62
2. Traitements des dermatoses prurigineuses associées à l'INC	65
2.1. Traitements des dermatoses prurigineuses	65
2.2. L'eau thermale d'Uriage et les dermatoses prurigineuses	67
OBJECTIFS DE TRAVAIL	70
A. Problématique	71
B. Objectifs	72
MATÉRIEL & MÉTHODES	73
A. Culture cellulaire	74
1. Conditions de culture	74
2. Milieux et solutions pour la culture cellulaire	74
3. Cultures primaires de kératinocytes humains	74
3.1. Obtention des kératinocytes	74
3.2. Entretien et différenciation des kératinocytes	75
4. Cultures primaires de neurones sensoriels de rat	75
4.1. Obtention des neurones sensoriels issus des GRD	75
4.2. Entretien des neurones sensoriels	75
5. Lignée de PC12 de rat	76
6. Application des composés pharmacologiques	76
6.1. Les agonistes et antagonistes	76

6.2. Transfection des ARN interférents	77
6.3. Utilisation de l'eau thermale d'Uriage	77
7. Mesure de la viabilité cellulaire	78
B. Immunofluorescence	78
C. Etudes biochimiques et biomoléculaires	79
1. Extraction et dosage des ARNs et des protéines	79
1.1. Isolation et dosages des ARNs	80
1.2. Isolation et dosages des protéines	80
2. Réverse transcription et PCR en temps réel	81
2.1. Synthèse de l'ADN complémentaire	81
2.2. qPCR	81
2.3. Analyse des résultats de PCR	84
3. Western Blot	84
3.1. Dénaturation et migration des protéines	84
3.2. Transfert	85
3.3. Hybridation de la membrane	85
3.4. Quantification relative des protéines	85
4. Analyse de l'activité NF- κ B	86
5. Dosage des cytokines inflammatoire	86
D. L'imagerie calcique	87
1. Principe	87
2. Procédure expérimentale	87
E. Analyse statistique	88
Chapitre I. Caractérisation des PC12 comme modèle alternatif à l'utilisation des neurones sensoriels issus des GRD de rat	89
A. Introduction	90
B. Résultats	91
1. Caractérisation des PC12 comme neurones	91
2. Les PC12, des neurones périphériques associés aux fibres de type A δ et C	92
3. Détection de récepteurs de l'INC dans les PC12	93
4. Réponse calcique des PC12 aux médiateurs de l'INC	94
C. Discussion	95
1. Caractérisation comme neurones sensoriels	95
2. Etude de la fonctionnalité de PAR-2 et TRPV1 dans les PC12	96
D. Conclusion et perspectives	97
Chapitre II. Criblage de l'expression de gènes régulés par l'activation de PAR-2 et PAR-4 dans les GRD et les DhPK	98
A. Introduction	99
B. Résultats	103
1. Expression de PAR-2 et PAR-4 dans les GRD et les DhPK	103
2. Criblage des gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels	104
3. Criblage des gènes modulés par PAR-2 dans les DhPK	106
C. Discussion	108
1. Détection de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels et les DhPK	108
2. Criblage des gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels	108
2.1. Les neuropeptides	109
2.2. Les neurotrophines	109
2.3. Les facteurs de croissance	110
2.4. Les cytokines	111
2.5. Conclusion sur le rôle de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels	111
3. Criblage des gènes modulés par PAR-2 dans les DhPK	113
3.1. Les cytokines	114
3.2. Les MMPs	114
3.3. Les neuropeptides	115
3.4. Les neurotrophines	115
3.5. Les jonctions	115

3.6. Les facteurs de croissance	116
3.7. Conclusion sur PAR-2 dans les DhPK.....	116
D. Corrélation des résultats du criblage de PAR-2 dans les neurones sensoriels et les DhPK.....	117
Chapitre III. Effets de l'eau thermale d'Uriage sur les gènes modulés par PAR-2 dans les DhPK	120
A. Introduction.....	121
B. Résultats.....	121
C. Discussion	124
D. Conclusion et perspectives	126
Chapitre IV. Rôle inflammatoire et voies de signalisation de PAR-2 dans les DhPK.....	127
A. Introduction.....	128
B. Rôle pivot de InsP3R et TRPV1 dans la réponse inflammatoire induite par PAR-2 dans les DhPK (Article 3)	129
Abstract.....	130
1. Introduction	131
2. Results	133
2.1. SLIGKV activates PAR-2-evoked Ca ²⁺ stores depletion in the UhPK and DhPK	133
2.2. PAR-2-evoked Ca ²⁺ stores depletion did not trigger SOCEs in the DhPK.....	134
2.3. PAR-2 evoked Ca ²⁺ store depletion is dependant of PLC and downstream of both InsP3R and TRPV1 in DhPK.....	137
2.4. PAR-2 stimulated NF-κB activity and inflammatory mediators expression through PLC and both TRPV1 and InsP3R in DhPK	139
2.5. PAR-2 up-regulated inflammatory mediators release through PLC and both TRPV1 and InsP3R in DhPK	142
3. Discussion.....	143
4. Materials and Methods.....	148
4.1. Reagents and chemicals.....	148
4.2. Human Primary Keratinocytes Culture.....	148
4.3. siRNA transfection	149
4.4. Western blotting	149
4.5. Reverse transcription and real-time quantitative PCR	150
4.6. Immunocytological assay.....	150
4.7. Intracellular Ca ²⁺ measurement	151
4.8. NF-κB-luciferase assay	152
4.9. Analysis of cytokine release.....	152
4.10. Statistical analysis.....	152
5. Supplementary data.....	153
5.1. Supplementary data 1	153
5.2. Supplementary data 2	154
C. Expériences complémentaires de l'article 3	155
1. Contrôle de l'effet des antagonistes et de leur solvant sur DhPK.....	155
1.1. Sur la viabilité.....	155
1.2. Sur la déplétion des réserves calciques	156
2. Contrôle de la transfection des ARNi.....	157
D. Conclusion et perspectives	158
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	159
A. Conclusion.....	160
B. Perspectives	163
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	165
ANNEXES	194
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	197

Liste des abréviations

AC	Adénylate Cyclase
ADN, ADNc	Acide désoxyribonucléique, ADN complémentaire
ACTH	« Adreno cortico trophic hormone », hormone adrénocorticotropique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN, ARNm, ARNi	Acide ribonucléique, ARN messenger, ARN interférent
ATP	Adénosine triphosphate
BCR	« B-cell-receptor », récepteur des cellules B
BDNF	« Brain derived neurotrophic factor », Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
Brn3A	« brain-specific homeobox/POU domain protein 3A »
Da / kDa	Dalton, kiloDalton
DA	Dermatite atopique
DAG	Diacylglycérols
DhPK	« Differentiated human primary keratinocyte », culture primaire de kératinocytes humains différenciés
Ca ²⁺	Calcium
Cds	Cellules dendritiques
CD4 / 8	Cluster de différenciation 4 / 8
CGRP	« Calcitonin gene related peptide », peptide lié au gène de la calcitonine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CRAC	« Calcium release-activated channels », canaux calciques activés par la déplétion des réserves calciques
CSF	« Colony-stimulating factor », facteur stimulant les colonies
Cx	Connexines
CXCL	« Chemokine (C-X-C motif) ligand », chimiokine contenant le motif C-X-C
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phénylindole
DMEM	« Dubelcco's minimun essentiel medium »
DMEM-F12	DMEM-Ham'sF12
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPBS	« Dubelcco's phosphate buffered salin », tampon phosphate
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	« Epithelial growth factor », facteur de croissance épithéliale
ELISA	« Enzyme-linked immunosorbent assay », technique immuno-enzymatique
FGF	« Fibroblast growth factor », facteur de croissance fibroblastique
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fura 2-AM	« Fura 2-acetoxymethyl ester »
g	Gravité
g, mg, µg, ng, pg	Gramme, milligramme, microgramme, nanogramme, picogramme
GAG	Glycosaminoglycanes
GRD	Ganglions rachidiens dorsaux
GRP	« Gastrin-releasing peptide », peptide de libération de gastrine
H	Heure (s)
H & E	Hématoxyline et éosine
HRP	Horse radish peroxydase, peroxydase extraite de radis noir
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G

ILs	Interleukines
INC	Inflammation neurogène cutanée
InsP3, InsP3R	« Inositol-3-phosphate receptor », récepteur de l'InsP3
JDE	Jonction dermo-épidermique
K, CK	Kératine, cytokératine
KGF	« Keratinocyte Growth Factor », facteur de croissance kératinocytaire
KSFM	« Keratinocyte serum-free medium », milieu de culture pour kératinocytes sans sérum
L, mL, μ L	Litre, millilitre, microlitre
LT, LB	Lymphocytes T, lymphocytes B
M, mM, μ M	Mol/l, millimol/l, μ mol/l
MEC	Matrice extracellulaire
MIF	« Migration inhibitory factor », facteur inhibiteur de la migration
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSH	« Melanocyte stimulating hormone », hormone stimulatrice des mélanocytes
MRGPR	« Mas-related G protein-coupled receptors », pruricepteurs couplés à la protéine G
NMF	« natural moisturizing factor », facteur naturel d'hydratation
NPY	Neuropeptide Y
NF	Neurofilament
NT	Neurotrophine
NGF	« Nerve growth factor », facteur de croissance neuronal
ORAI1	« CRAC protein 1 », canal calcique activé par la déplétion des réserves calciques
PACAP	« Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide », Polypeptide d'activation de l'adénylate cyclase pituitaire
PAF	« Platelet activating factor », facteur d'activation plaquettaire
PARs	« Protease-activated récepteurs », récepteurs activés par les protéases
pb	Paire de base
PC12	Pheochromocytoma cell line, nom de clone d'une lignée cellulaire obtenu à partir d'un pheochromocytome de la glande surrénale de rat
PDGF	« Platelet-derived growth factor », facteur de croissance
PGs	Prostaglandines
PGP9.5	« Protein gene product 9.5 »,
pH	Potentiel hydrogène
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA, PKC	Protéine-kinase A et C
PLC	Phospholipase C
PVDF	« Polyvinylidene fluoride »
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RT-qPCR	« Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction », reverse transcription- réaction en chaîne de polymérisation quantitative
Sema3A	Semaphorine 3A
SERCA	« Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase », Pompe à Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique
SN	Syndrome de Netherton
SNC	Système nerveux central
SNIEC	Système neuro-immuno-endocrino- cutané
SOCE	« Store-operated calcium entry », influx de Ca^{2+} à travers les CRAC
SP	Substance P
STIM	« Stromal interaction molecule 1 », senseur de la déplétion des réserves calciques

SVF	Sérum de veau foetal
TG	Thapsigargin (inhibitor des pompes SERCA)
TGF	« Transforming growth factor », facteur de croissance transformant
TIMP	« Tissue inhibitor of metalloproteinases », inhibiteur tissulaire des MMPs
TRITC	Tetramethylrhodamine
Trk A, B, C	« Tyrosine kinase receptors A, B, C », récepteur tyrosines kinases
TRPV1	« Transient Receptor Potential cation channel, subfamily Vanilloid, member 1 »
TRPA1	« TRP, subfamily Ankyrin, member 1 »
TRPM8	« TRP, subfamily Melastatin, member 8 »
TSLP	« Thymic stromal lymphopoietin »
TNF	« Tumor necrosis factor », facteur de nécrose tumoral
UhPK	« Undifferentiated human primary keratinocytes », culture primaire de kératinocytes humains non différenciés
UVs	Ultra-violets
VEGF	« Vascular endothelial growth factor », facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIP	« Vasoactive intestinal peptide », peptide vasoactif intestinal
XestC	Xestopongin C

Liste des figures

Figure 1. Organisation histologique de la peau	13
Figure 2. Organisation cellulaire de l'épiderme	15
Figure 3. Les kératines marqueurs des différentes couches épidermiques	16
Figure 4. Le réseau vasculaire cutané	22
Figure 5. L'inflammation cutanée.	24
Figure 6. Représentation de l'innervation cutanée	28
Figure 7. Représentation des voies du prurit : du récepteur au SNC.....	32
Figure 8. Déclenchement par la KLK5 d'une réaction inflammatoire et d'un microenvironnement proallergique dans le syndrome de Netherton (SN).....	65
Figure 9. Analyse de la présence des marqueurs des neurones dans les PC12.....	91
Figure 10. Analyse de la présence des marqueurs des neurones périphériques dans les PC12.	92
Figure 11. Détection de TRPV1 et PAR-2 dans les PC12	93
Figure 12. Réponses calciques des PC12 différenciées en neurones aux agonistes de PAR-2 et TRPV1	94
Figure 13. Détection de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels de rat et les DhPK.....	104
Figure 14. Criblage des gènes modulés par l'activation de PAR-2 et PAR-4 sur les neurones sensoriels de rat <i>in vitro</i>	105
Figure 15. Criblage des gènes modulés par l'activation de PAR-2 dans les DhPK <i>in vitro</i>	107
Figure 16. Effet de l'eau thermale d'Uriage sur viabilité cellulaire des DhPK.	122
Figure 17. Effets de l'eau thermale d'Uriage sur la modulation de l'expression de la Cx26 et -43, les CXCL1 et -2, le TNF- α , IL-1 β , la TSLP et la MMP9 induite par PAR-2 dans des DhPK.	123
Figure 18. Viabilité des DhPK au solvant, ARNi et antagonistes.	155
Figure 19. Effets du solvant et des antagonistes sur la réponse calcique des DhPK.	156
Figure 20. Contrôle de l'efficacité des ARNi dans les UhPK et DhPK	157
Figure 21 : Schéma de synthèse des mécanismes cellulaires et intracellulaires de PAR-2 dans les neurones sensoriels et les DhPK.....	162
Figure 22. Contrôle de l'effet des séquences inverses des peptides agonistes de PAR-2 et PAR-4 sur les neurones sensoriels de rat <i>in vitro</i>	195
Figure 23. Contrôle de l'effet de la séquence inverse du peptide agoniste de PAR-2 sur les DhPK <i>in vitro</i>	196

Liste des tableaux

Tableau 1. Les médiateurs préformés et néoformés des mastocytes et leurs effets biologiques.....	20
Tableau 2. Composition ionique de l'eau thermale d'Uriage	67
Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires pour l'immunohistochimie.	79
Tableau 4. Amorces rats pour la qPCR.....	82
Tableau 5. Amorces humaines pour la qPCR	83

INTRODUCTION

I. Peau et inflammation cutanée

La peau est le principal organe au contact de l'environnement. Elle est essentielle dans nos contacts sociaux et pour le développement psychique du nourrisson et de l'enfant. Elle est également le reflet de nos émotions, de notre état de santé, de notre niveau social et de notre personnalité. Le stress, la pollution, les produits chimiques, des allergènes de la vie courante et des facteurs endogènes conduisent à une dérégulation de l'homéostasie cutanée qui se caractérise par une inflammation. Il s'agit d'une réaction de défense universelle du corps faisant intervenir les cellules de l'immunité innée et adaptative ainsi que les cellules de la peau telles que les kératinocytes et les neurones sensoriels. Afin de mieux comprendre ce phénomène complexe qu'est l'inflammation, nous commencerons par introduire les notions sur la peau.

A. La peau

1. Définition

La peau constitue l'organe le plus important du corps humain de par son poids (4 kg) et sa surface (2 m²). Elle est constituée de plusieurs couches permettant d'interagir avec l'environnement extérieur. La première fonction de la peau est de protéger l'organisme contre les agressions extérieures (physiques, biologiques, et chimiques) par une action physique et immunitaire. La peau joue également un rôle dans le métabolisme de la vitamine D3 qui participe au maintien des niveaux sanguins normaux de Ca²⁺. La sécrétion de sueur par des glandes sudoripares et la présence de mécanismes de vasodilatation ou vasoconstriction des artérioles cutanées font de la peau un organe thermorégulateur. La peau permet également de conserver l'équilibre de nos fluides corporels en limitant les pertes en eau.

L'abondance de terminaisons nerveuses la parcourant classe la peau comme un organe hautement sensoriel (Roosterman et al., 2006). Elle répond continuellement à une grande variété de stimuli de nature physique (thermique, mécanique, électrique, UV...) et chimique, ou encore à des allergènes, des haptènes et des agents microbiologiques conduisant à des sensations cutanées normales ou

pathologiques (Brazzini et al., 2003; Gouin et al., 2015a; Roosterman et al., 2006). Pour assurer cette fonction sensorielle, elle fait intervenir des mécanorécepteurs, des thermorécepteurs, des nocicepteurs et des pruricepteurs. Ces senseurs transmettent les stimuli vers le système nerveux central (SNC) où ces informations seront interprétées comme des messages tactiles, thermiques, prurigineux ou nociceptifs.

2. Organisation

D'un point de vue histologique et anatomique, la peau est constituée de trois couches superposées (Figure 1). La partie la plus superficielle est l'épiderme puis séparée par la jonction dermo-épidermique vient le derme et enfin l'hypoderme. Différentes annexes cutanées y sont présentes incluant les poils et les glandes. La peau est richement innervée et vascularisée.

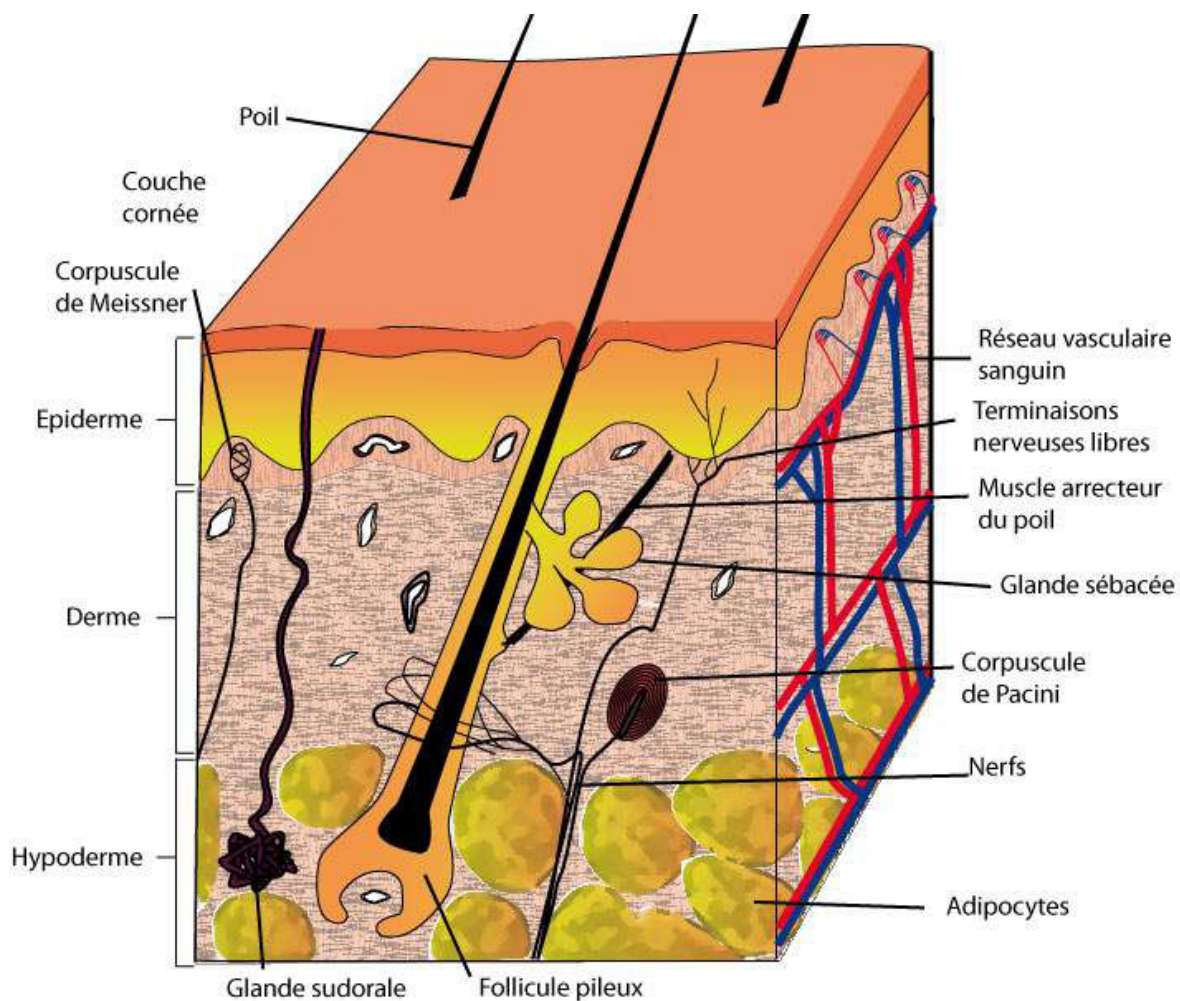


Figure 1. Organisation histologique de la peau

(http://static.wixstatic.com/media/435c28_70db7530b1684543a6de81f4620bf827.jpg).

2.1. L'épiderme

2.1.1. Organisation et fonctions

L'épiderme est en contact direct avec l'environnement. Il est caractérisé par sa minceur, son innervation et son absence de vascularisation. D'un point de vue histologique, il s'agit d'un épithélium pluristratifié pavimenteux kératinisé d'origine ectodermique. Son épaisseur peut varier de 0,1 à 1 mm en fonction de sa localisation et des contraintes environnementales.

Au niveau cellulaire, l'épiderme est constitué de 80 à 90% de kératinocytes. Ils subissent un processus d'auto-renouvellement, de migration et de différenciation, de la jonction dermo-épidermique vers la surface extérieure. Cela contribue à la formation des différentes couches de l'épiderme. Quatre couches épidermiques sont formées allant de la plus profonde à la plus superficielle : germinative ou basale, épineuse, granuleuse et cornée (Figure 2). Par cette architecture pluristratifiée, l'épiderme peut s'auto-renouveler et protéger notre organisme des attaques extérieures. D'autres types cellulaires le constituent dans une moindre mesure : les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langherans (Figure 2).

L'épiderme se distingue par la présence d'un réseau de terminaisons nerveuses libres non myélinisées de type A δ ou C. Ces terminaisons vont jouer un rôle essentiel dans la perception ainsi que dans la modulation des pathologies inflammatoires (Dallos et al., 2006; Gouin et al., 2015a; Reznik, 1996; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013)

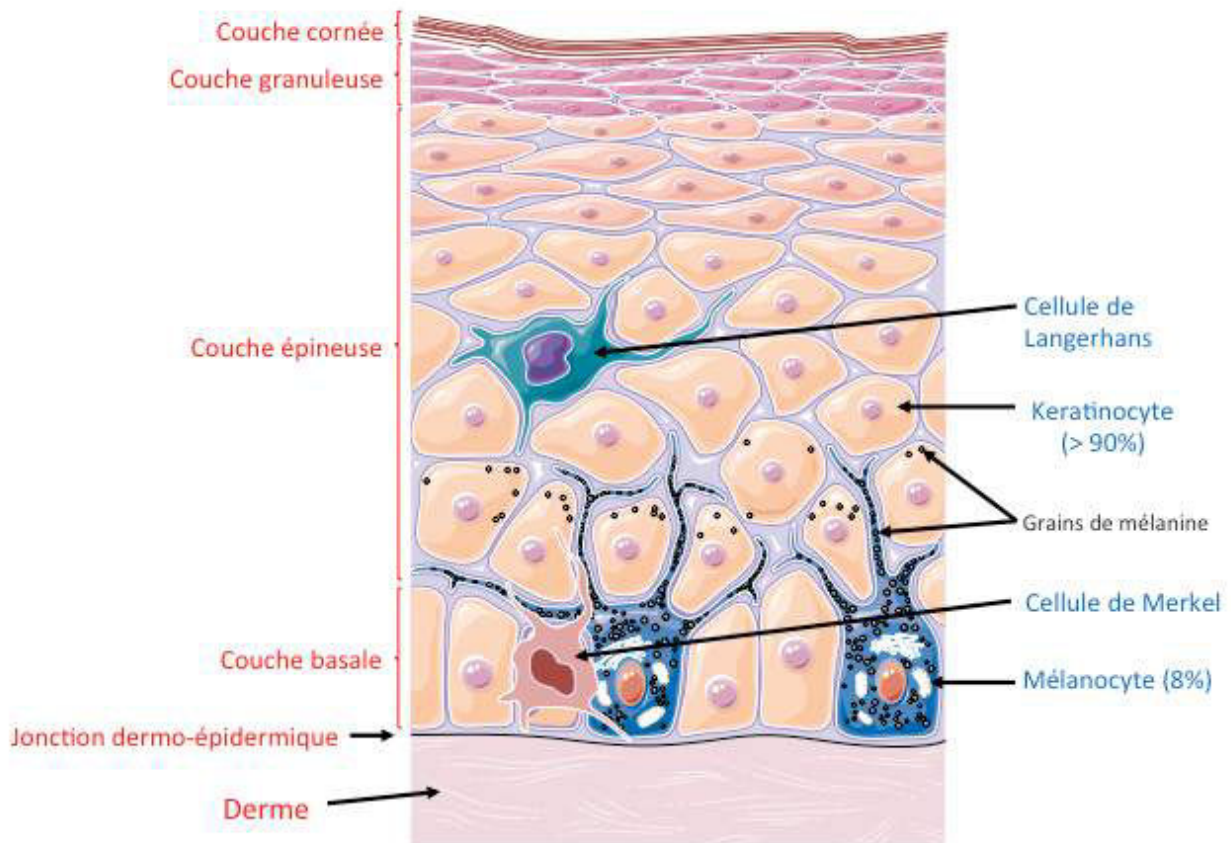


Figure 2. Organisation cellulaire de l'épiderme

2.1.2. Les cellules de l'épiderme

- **Les kératinocytes** subissent au cours de leur différenciation, un processus dit de « kératinisation ». Cela est réalisé à travers la synthèse de protéines fibreuses, résistantes et insolubles dans l'eau : les kératines (K). Par leurs caractéristiques hydrophobes, ces protéines rendent l'épiderme imperméable protégeant la peau et les tissus sous-jacents des agressions externes. Associées par paires, elles sont l'un des constituants fondamentaux des filaments intermédiaires du cytosquelette des kératinocytes. Elles assurent donc la structure et l'adhérence des kératinocytes en se liant aux desmosomes et hémidesmosomes. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la structure et la fonction barrière de l'épiderme. Ces paires de kératines peuvent servir de marqueur de différenciation des kératinocytes dans l'épiderme tels que la K5-K14 pour la couche basale et la K1-K10 pour les couches supra-basales (Chu and Weiss, 2002). D'autres marqueurs de la différenciation des kératinocytes sont également connus comme l'involucrine pour la couche épineuse, la loricrine et la filaggrine pour la couche granuleuse (Eckhart et al., 2013) (Figure 3).

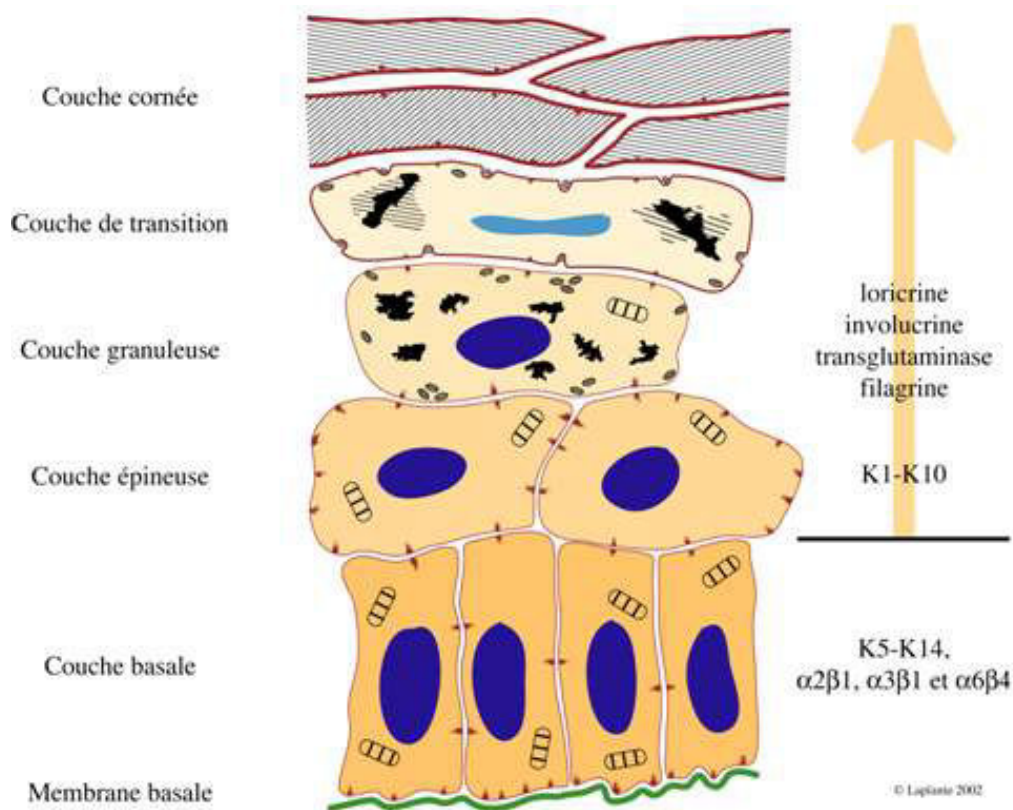


Figure 3. Les kératines marqueurs des différentes couches épidermiques

K, Kératine (D'après http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/19935/19935_6.png).

• **Les mélanocytes** représentent 5 à 8% des cellules de l'épiderme et synthétisent les mélanines dans des mélanosomes caractérisant la couleur de la peau spécifique à chaque individu. Les corps cellulaires des mélanocytes sont localisés au niveau de la couche basale de l'épiderme. Par l'intermédiaire de leurs prolongements dendritiques, ils vont entrer en contact avec les kératinocytes supra-basaux et leur transmettre la mélanine. Cette dernière va s'accumuler autour des noyaux des kératinocytes formant une barrière photoprotectrice. Ce mécanisme permet de protéger l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules épidermiques des rayonnements UVs délétères émis par le soleil.

• **Les cellules de Langerhans** représentent la troisième population cellulaire de l'épiderme (3 à 8% des cellules épidermiques). Elles ont une morphologie dendritique et ont un rôle crucial dans la réponse immunitaire. En effet, ces cellules vont présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT) transépithéliaux au cours de réponses inflammatoires (Bos, 1997; Sparber et al., 2010).

• **Les cellules de Merkel** sont les moins représentées dans l'épiderme. Elles sont localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme et sont étroitement associées aux terminaisons nerveuses. Leur répartition est irrégulière et très diffuse. Elles représentent 0,2 à 5% des cellules de l'épiderme. Elles ont une morphologie en disque et sont particulièrement abondantes au niveau des lèvres, des paumes, de la pulpe des doigts et de la plante des pieds. Actuellement, leur rôle demeure peu connu mais elles sont généralement associées à des fonctions de mécanorécepteurs à adaptation lente de type I. Elles expriment un marqueur spécifique, la cytokératine 20 (CK20), qui peut être utilisée pour leur détection dans l'épiderme par immuno-marquage (Nakatani et al., 2015; Niu et al., 2014).

2.2. La jonction dermo-épidermique

L'épiderme et le derme sont séparés par une membrane basale également appelée jonction dermo-épidermique (JDE). Il s'agit d'une matrice composée de laminine, de nidogène, de collagène IV et de perlecan. Cette composition va permettre l'ancrage de l'épiderme. Outre son implication dans l'adhérence, elle joue également le rôle de filtre sélectif dans les échanges moléculaires et cellulaires entre ces deux compartiments. Par sa composition en laminine, la JDE contrôle la ré-épidermisation lors de la cicatrisation cutanée en servant de support pour l'adhérence et la migration des kératinocytes (Zhang and Kramer, 1996). La JDE détermine également la polarité des kératinocytes basaux, leur organisation spatiale et donc la structure de l'épiderme. Lors de la stratification de l'épiderme, les kératinocytes qui prolifèrent restent attachés à la membrane basale et les cellules-filles générées migrent et se différencient vers les couches supérieures de l'épiderme.

2.3. Le derme

2.3.1. Organisation et fonctions

Le derme se situe entre l'épiderme et l'hypoderme. C'est un tissu conjonctif qui est principalement composé d'une matrice extracellulaire (MEC) produite par des fibroblastes, la principale population cellulaire dermique. La MEC est constituée de fibres de collagènes et d'élastine dans un gel aqueux de glycoprotéines. Par sa composition, la MEC joue le rôle de tissu de soutien et nourricier. Il s'agit d'un tissu

très vascularisé par la présence de vaisseaux lymphatiques et surtout sanguins. Le derme est le centre de collecte des informations tactiles en hébergeant des mécanorécepteurs sensitifs incluant les récepteurs des follicules pileux, les corpuscules de Meissner (toucher), les corpuscules de Ruffini (vibration, étirement léger) et les corpuscules de Pacini (vibration, pression profond) (Munger and Ide, 1988; Reznik, 1996). Ces mécanorécepteurs seront détaillés ultérieurement dans la partie Introduction II.3.2.

Le derme abrite également les annexes cutanées incluant les glandes sébacées et sudoripares ainsi que les follicules pileux. Les cellules du derme sont peu nombreuses et comprennent les fibroblastes, les cellules dendritiques (Cds) dermiques, les macrophages, les plasmocytes et les mastocytes. Le derme est classiquement divisé en deux régions, le derme papillaire et le derme réticulaire, qui se distinguent par leur composition et l'organisation de leur MEC respective.

2.3.2. Les cellules du derme

- **Les fibroblastes** sont majoritairement localisés au niveau du derme papillaire, et constituent le principal type cellulaire du derme. La fonction primaire des fibroblastes est de produire, renouveler ou dégrader les composants de la MEC. Pour ce faire, ils sécrètent du collagène, de l'élastine et de la fibrilline (Krieg and Braun-Falco, 1989). Ces mêmes fibroblastes peuvent également sécréter des facteurs de croissance et des enzymes dont des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) pour dégrader, renouveler et réorganiser la MEC.

- **Les mastocytes** sont des cellules immunitaires du derme. Alors qu'ils sont absents dans l'épiderme, ils peuvent être considérés comme la deuxième population du derme avec une densité de 7000 à 20000 par mm^3 . Ils sont préférentiellement localisés à proximité des vaisseaux sanguins, des mécanorécepteurs ainsi qu'au niveau des annexes cutanées (Gilfillan and Beaven, 2011). Ils sont caractérisés par la présence en abondance de grains ou de granules intra-cytoplasmiques de sécrétion, les qualifiant de cellules à fort pouvoir sécréteur. Leurs fonctions sont étroitement liées aux propriétés de leurs granules. Ceux-ci sont principalement composés de médiateurs dits préformés comme l'histamine, l'héparine, des facteurs

chimiotactiques, des neuropeptides des protéases et des glycosaminoglycanes (Theoharides et al., 2012) (Tableau 1). Consécutivement à cette première libération nommée dégranulation, des médiateurs néoformés, essentiellement des métabolites de l'acide arachidonique et le facteur d'activation plaquettaire (FAP), sont sécrétés. D'autres médiateurs néoformés tels que des cytokines et des facteurs de croissance sont également libérés (Gilfillan and Beaven, 2011; Harvima et al., 2010; Theoharides et al., 2012) (Tableau 2). Les médiateurs sécrétés par les mastocytes agissent en deux phases distinctes. D'une part, les médiateurs préformés participent à la phase immédiate de la réaction. D'autre part, les médiateurs néoformés, dans une phase plus tardive, accentuent l'action des médiateurs préformés en recrutant les cellules de l'inflammation (éosinophiles, neutrophiles, monocytes, lymphocytes et thrombocytes). Lors de cette phase tardive, les mastocytes vont moduler ou amplifier la réaction inflammatoire par la sécrétion de cytokines néoformées. Les mastocytes sont impliqués dans de nombreuses dermatoses prurigineuses inflammatoires dont les plus connues sont l'urticaire, l'allergie de contact, la dermatite atopique (DA) et le psoriasis. Ils sont associés aux pathologies de type allergique suite à la formation d'un complexe entre l'allergène et le récepteur de haute affinité des immunoglobulines E (IgE). De ce complexe résulte la dégranulation des mastocytes conduisant aux signes cliniques de l'allergie inflammatoire (Theoharides et al., 2012). Actuellement, il est considéré que les mastocytes sont les principaux producteurs de protéases de notre organisme pouvant conduire à l'inflammation (Caughey, 2011; Dai and Korthuis, 2011; Gouin et al., 2015a; Schechter et al., 1998). De nombreuses autres substances peuvent conduire à la dégranulation des mastocytes incluant des hormones, des neuropeptides, des protéases, des facteurs de croissance, des bactéries, des virus, des venins ou encore des enzymes.

Médiateurs préformés	Principaux effets physiopathologiques
Amines Histamine	Vasodilatation, angiogénèses, mitogenèse, douleur
Chemokines : CXCL-1, 2, 5, 7, 8, 11 et 13	Chimoattraction et infiltration des tissus par les leucocytes
Enzymes Tryptase MMPs	Destruction des tissus, activation de PAR-2, inflammation et douleur. Destruction des tissus, modification des cytokines/chemokines
Peptides : SP VEGF VIP	Inflammation et douleur Vasodilatation Vasodilatation et activation des mastocytes
Proteoglycannes : Héparine	Angiogénèse et croissance/stabilité neuronale
Médiateurs néoformés	Principaux effets physiopathologiques
Cytokines : IL-1,2,3,4,5,6,8,9,10,13,16,18 IFN- α , IFN- β , IFN- γ ; TGF β ; TNF- α ,	Inflammation, migration leucocytaire, douleur Inflammation, prolifération/activation leucocytaire
Facteurs de croissances : β -FGF, NT3, NGF, PDGF, TGF β , VEGF	Croissance/prolifération/survie de nombreuses cellules
Métabolites de l'acide arachidonique : Leukotriene C ₄ PAF Prostaglandin D ₂	Recrutement leucocytaire Vasoconstriction, pain Action plaquettaire, vasoconstriction Douleur

Tableau 1. Les médiateurs préformés et néoformés des mastocytes et leurs effets biologiques

CXCL, chémokine (C-X-C motif) ligand ; MMPs, Métalloprotéinases matricielles ; SP, substance P ; VEGF, vascular endothelial growth factor ; IL, interleukine ; IFN, interféron ; TNF, tumor necrosis factor ; FGF, fibroblast growth factor ; NT3, Neurotrophin 3 ; PDGF, platelet-derived growth factor ; TGF, transforming growth factor ; VEGF, vascular endothelial growth factor ; PAF, Platelet activating factor ; VIP, vasoactive intestinal peptide (d'après (Theoharides et al., 2012).

- **Les Cds dermiques** sont des cellules immunitaires cutanées ayant une morphologie dendritique. Les Cds sont principalement localisées dans le derme profond. Elles assurent comme les cellules de Langerhans la fonction de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) *via* des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Elles déclenchent des réponses immunitaires en présentant les antigènes apprêtés aux lymphocytes T et B (LT et LB) transépithéliaux ou à ceux des ganglions lymphatiques locaux (Chu et al., 2011; Sparber et al., 2010).

- **Les cellules endothéliales** forment les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques. En dehors de leur fonction primaire de permettre la circulation sanguine et lymphatique, elles jouent un rôle primordial dans la régulation de l'inflammation cutanée. D'une part, elles sécrètent un grand nombre de molécules de l'inflammation : des cytokines (interleukines-6 et -8 (IL-6 et -8) ; facteur de nécrose des tumeurs (TNF) ; interféron (INF) et des chémokines (chémokines (C-X-C motif) ligand (CXCLs)). D'autre part, elles expriment des protéines d'adhérence et des MMPs. Par cette sécrétion et l'expression de ces molécules, elles vont pouvoir attirer et capter les cellules immunitaires circulantes par diapédèse induisant leur infiltration dans le tissu. Par la vasodilatation, les cellules endothéliales jouent également un rôle important dans le nombre de cellules à recruter sur le site en augmentant le nombre de cellules circulantes.

2.4. L'hypoderme

L'hypoderme est à la fois la couche la plus épaisse et la plus profonde de la peau. Il est situé juste sous le derme réticulaire, auquel il est rattaché par des fibres de collagène et d'élastine. Il est essentiellement constitué d'un seul type de cellule spécialisée dans l'accumulation et le stockage des graisses, les adipocytes.

3. Le réseau vasculaire cutané

Afin de se pourvoir en éléments essentiels à sa survie, la peau est dotée d'une architecture vasculaire très organisée. Alors que le derme et l'hypoderme présentent un réseau vasculaire, l'épiderme en est dépourvu. Outre ses fonctions nutritionnelles, le réseau vasculaire joue un rôle important dans la thermorégulation (vasodilatation/vasoconstriction) ainsi que dans la détoxification de l'organisme (Braverman and Yen, 1977a, 1977b). Il s'agit d'un réseau sanguin très structuré d'artérioles de moyen/petit calibre, de capillaires et de veinules formant un système à deux étages. Les artères entrent dans la peau au niveau de l'hypoderme profond, traversent l'hypoderme et forment à la jonction entre l'hypoderme et le derme réticulaire, un plexus qui sera le réseau vasculaire cutané.

Deux types de ramifications partent de ce plexus en direction de la surface. La première partie se dirige vers les annexes cutanées qui forment des collatérales pour le bulbe pileux et les glandes délivrant les éléments essentiels à leur survie. La deuxième forme un second plexus à la jonction entre le derme réticulaire et papillaire. Des boucles capillaires émergent de ce plexus sous-papillaire vers les crêtes épidermiques permettant l'apport des éléments essentiels à la survie de l'épiderme (Figure 4). Les réseaux veineux et lymphatiques sont calqués sur le modèle artériel.

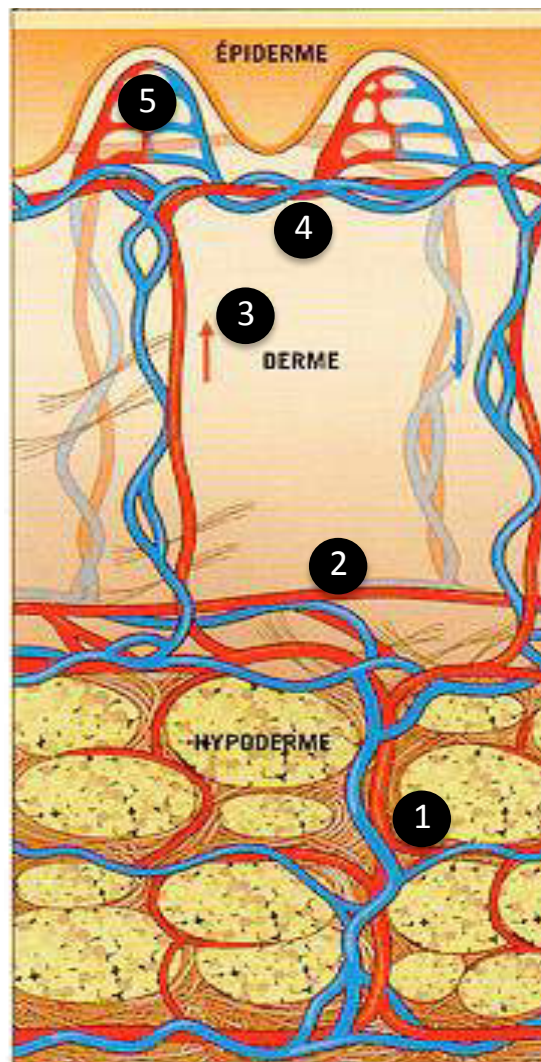


Figure 4. Le réseau vasculaire cutané

1 Artère traversant l'hypoderme ; 2 Plexus à la jonction hypoderme/derme réticulaire ; 3 Artère traversant le derme réticulaire ; 4 Plexus à la jonction derme réticulaire/derme papillaire ; 5 Boucles capillaires des crêtes épidermiques (<http://chainedit.univ-nantes.fr/chainedit/projets/introhisto/site/html/1.html>).

B. L'inflammation cutanée

1. Définition

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire normale de l'organisme à une agression de type : infectieuse, thermique, mécanique (ultra violet (UV)), chimique, lésionnelle ou encore allergique. Elle se caractérise en quatre points qui sont : la rougeur, la chaleur, le gonflement (oedème) et la douleur (Démarchez, 2014; Harvima et al., 2010). L'inflammation cutanée aiguë est une réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par un gonflement intense. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement. La chronicité apparaît lorsque l'inflammation ne guérit pas spontanément, persiste ou s'aggrave pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

L'inflammation a pour but d'isoler, d'inactiver, de détruire les éléments étrangers puis d'éliminer les débris cellulaires en recrutant sur la zone lésée des phagocytes et des protéines plasmatiques. Le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs quel que soit le type d'agression. Cependant, le type de facteur déclenchant conditionne l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire ainsi que l'aspect lésionnel.

2. Déroulement de l'inflammation

La réaction inflammatoire est un processus dynamique comportant plusieurs étapes successives : vasculaire (vasodilatation), la diapédèse des leucocytes et le chimiotactisme des cellules immunitaires et pour finir la détersion (Figure 5).

Au départ, la peau lésée réagit, à travers une dégranulation locale d'histamine et de sérotonine par les mastocytes. Ces deux substances stimulent la vasodilatation, ce qui provoque un afflux sanguin plus important associé à un ralentissement local de la circulation sanguine. Cela permet une accumulation de protéines plasmatiques et la diapédèse leucocytaire correspondant à la traversée active des parois vasculaires et à l'accumulation de cellules immunitaires circulantes : les lymphocytes, les neutrophiles et les monocytes dans le foyer lésionnel (Wilgus and Wulff, 2014; Wilgus et al., 2013).

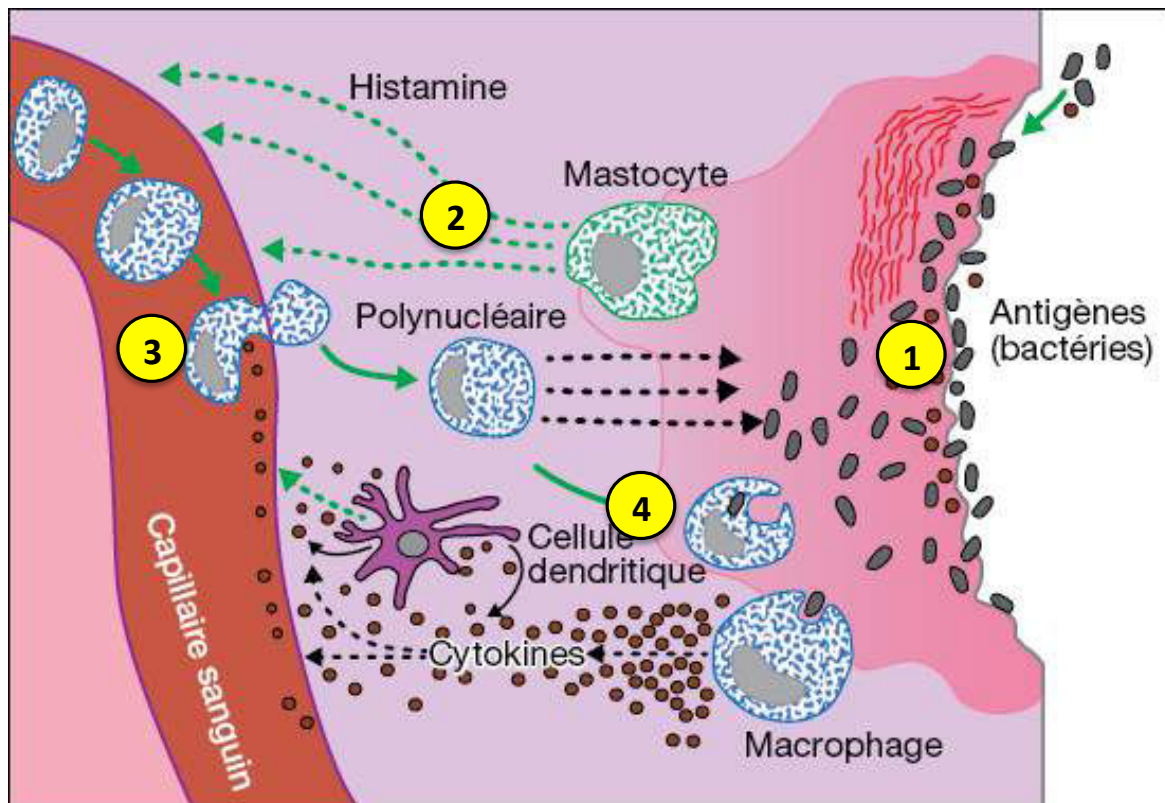


Figure 5. L'inflammation cutanée.

1) La lésion cutanée permet le passage des agents pathogènes à travers l'épiderme. 2) La phase vasculaire est la vasodilatation des capillaires et le gonflement de la plaie sous l'effet de l'histamine sécrétée par les mastocytes. 3) Diapédèse leucocytaire est le recrutement et le passage à travers la paroi des capillaires des leucocytes. 4) Le chimiotactisme et la détersion correspondent à la migration des cellules immunitaires sur le site lésé et au nettoyage de la zone inflammée par les macrophages (<http://www.maxicours.com/se/fiche/7/8/395887.html/ts>).

Dans les premières heures, la diapédèse concerne les polynucléaires incluant les neutrophiles et monocytes. Les neutrophiles ont pour fonctions d'attirer d'autres cellules inflammatoires par chimiotactisme et de nettoyer le site lésé en sécrétant des substances antimicrobiennes et des protéases (Wilgus et al., 2013). Elles peuvent également phagocyter des pathogènes conduisant à leur mort prématurée (Gomides et al., 2014; Houle et al., 2005; Paukov, 1986). Les neutrophiles ayant une durée de vie courte, les monocytes recrutés extemporanément prennent le relais. Ils migrent par chimiotactisme et se différencient en macrophage nettoyant la zone lésée (ou détersion). Ils sécrètent également des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α), des protéases, des prostaglandines (PGs) et des IFNs permettant le maintien et/ou l'amplification de l'inflammation (Rodero and Khosrotehrani, 2010). A travers leur fonction de CPA, les monocytes coopèrent avec les lymphocytes pour le développement de la réaction immunitaire spécifique (Chéret et al., 2013; Liuzzo et al., 1999; Nathan, 1987; Paukov, 1986).

Les dernières cellules immunitaires à arriver sur la zone lésée sont les lymphocytes qui migrent tardivement sous l'influence de cytokines telles que l'IFN γ et MCP-1, essentiellement secrétées par les macrophages. Ils sont activés par la présentation de l'antigène/allergène par les CPA : les macrophages, les Cds, les cellules de Langerhans et les LB (Chu et al., 2011; Paukov, 1986; Sparber et al., 2010). Les LT acquièrent ainsi des propriétés cytotoxiques ou auxiliaires permettant respectivement de tuer les cellules infectées et de sécréter des cytokines qui vont stimuler les autres lymphocytes. Ils coopèrent également avec les LB et provoquent leur différenciation en plasmocytes qui, par la sécrétion des immunoglobulines, contiennent l'inflammation en neutralisant les virus, les bactéries, les parasites et autres éléments étrangers à l'organisme (Geherin et al., 2012) (Chu et al., 2011).

La détersion est consécutive à la phase vasculaire et contemporaine de la diapédèse leucocytaire. Il s'agit de l'élimination des tissus nécrosés et des agents pathogènes. Cette élimination est assurée par phagocytose par les macrophages et les neutrophiles. L'inflammation aiguë va évoluer en inflammation chronique dans le cas où la détersion est incomplète.

II. Système nerveux cutané et Inflammation Neurogène Cutanée

L'inflammation neurogène cutanée (INC) se définit comme l'induction et/ou l'amplification d'un processus inflammatoire primaire par les terminaisons nerveuses. La stimulation des neurones, en particulier sensoriels, induit la sécrétion de neuropeptides qui vont agir sur les cellules cibles de la peau induisant par la suite les signes cliniques de l'inflammation. Actuellement, un nouveau concept émerge, suggérant que les cellules de la peau sont également aptes à déclencher ou amplifier l'INC puisqu'elle produisent des neuropeptides. Afin de mieux aborder la notion de l'INC, nous présenterons dans un premier temps le système nerveux cutané et les interactions neuro-cutanées.

A. Le système nerveux cutané

1. Organisation de l'innervation cutanée

La peau est un organe sensoriel très performant. Ses caractéristiques sensorielles sont permises par une innervation dense et variée provenant du système nerveux périphérique. Deux voies composent ce système nerveux. La première voie est afférente et correspond au système nerveux sensoriel périphérique qui est impliqué dans la perception aux stimuli extérieurs. La seconde est efférente et correspond au système nerveux végétatif (ou autonome) qui est impliqué dans les fonctions non soumises au contrôle volontaire. Cette voie efférente participe à la thermorégulation par la sécrétion et l'excrétion des glandes sudoripares, la vasodilatation/constriction des vaisseaux sanguins et la piloérection des poils (Talagas et Misery, 2015). Ces deux composantes innervent l'ensemble des couches de la peau par des prolongements neuritiques ou fibres nerveuses produisant un réseau nerveux dense, communément appelé « système nerveux cutané ». Le corps cellulaire de ces fibres nerveuses est localisé dans les ganglions nerveux spinaux, ou ganglions rachidiens dorsaux (GRD), au niveau des racines spinales postérieures. Ces fibres nerveuses sensibles et végétatives sont détectables par immunomarquage de la « protein gene product 9.5 » (PGP9.5), des neurofilaments et neuromédiateurs qu'elles produisent (Munger et Ide, 1988; Roosterman et al., 2006; Talagas et Misery, 2015). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux fibres nerveuses sensorielles connues pour jouer un rôle dans l'INC (Gouin et al., 2015a; Herbert and Holzer, 2002; Steinhoff et al., 2003a).

2. Le système nerveux sensoriel cutané

2.1. La sensibilité

La peau participe à la sensibilité dite somatique, qui est extéroceptive c'est-à-dire réagissant à l'environnement extérieur (Boulais et Misery, 2008; Denda et al., 2007; Talagas et Misery, 2015). Elle transmet ainsi l'information qui nous rend conscient des stimuli externes. Si les stimuli sont assez intenses, ils sont convertis en potentiels d'action transmis le long des fibres sensibles afférentes. Ce message parvient au SNC où la perception sensorielle est identifiée, interprétée et localisée.

Différentes perceptions peuvent être analysées au niveau central incluant les sensations mécaniques (pression, vibration, toucher, frottements), thermiques, douloureuses, nociceptives ou prurigineuses (Misery et al., 2014; Munger and Ide, 1988).

2.2. Organisation morphologique

L'innervation sensitive se distribue de façon inégale le long du corps conduisant à des zones plus ou moins sensibles. Les fibres nerveuses traversent la peau en longeant les vaisseaux sanguins et forment des plexus vasculo-nerveux. Elles se subdivisent en un plexus nerveux profond à la jonction hypoderme-derme puis un plexus nerveux superficiel à la jonction derme réticulaire-papillaire (Talagas and Misery, 2015).

Les fibres sensibles sont classées en fonction de leur vitesse de conduction, définie à partir de leur diamètre et leur caractère myélinisé ou non. Elles se subdivisent en trois catégories :

- Les fibres de type A β , fortement myélinisées, dont le diamètre varie de 4 à 22 μm , se définissent par une vitesse de conduction de 10 à 100 m/s,
- Les fibres de type A δ , modérément myélinisées, dont le diamètre varie de 2 à 5 μm , se définissent par une vitesse de conduction de 3 à 15 m/s,
- Les fibres de type C, amyélinisées, dont le diamètre varie de 1 à 2 μm , se définissent par une vitesse de conduction de 1 à 2 m/s.

Au niveau des extrémités de ces fibres A β , A δ et C vont s'organiser des structures plus ou moins complexes, nommées récepteurs cutanés sensoriels (Figure 6). Ces récepteurs sensoriels assurent la transduction des stimuli mécaniques, chimiques, nociceptifs ou prurigineux en potentiels électriques qui seront analysés par le SNC en informations sensorielles. Ils s'organisent en structures corpusculaires ou libres et peuvent être superficiels ou profonds. Leur répartition et leur densité varient entre la peau glabre et la peau poilue. Ils sont classés en fonction de la nature des stimuli auxquels ils répondent, définissant les mécanorécepteurs, les thermorécepteurs, les nocicepteurs et les pruricepteurs.

Les mécanorécepteurs sont associés aux fibres nerveuses de type $A\beta$ et s'organisent en structures corpusculaires : les corpuscules de Meissner, Pacini, Ruffini et les complexes de Merkel. Ils détectent l'ensemble des stimuli mécaniques pour encoder de façon optimale l'information tactile (Nakatani et al., 2015; Nolano et al., 2003; Talagas and Misery, 2015). Les terminaisons libres ou fibres intra-épidermiques sont associées aux fibres nerveuses de type $A\delta$ et C, et sont impliquées dans la mécanocception, la nociception, la thermoception et la pruriception. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur ces fibres intra-épidermiques qui sont les acteurs majeurs de l'INC.

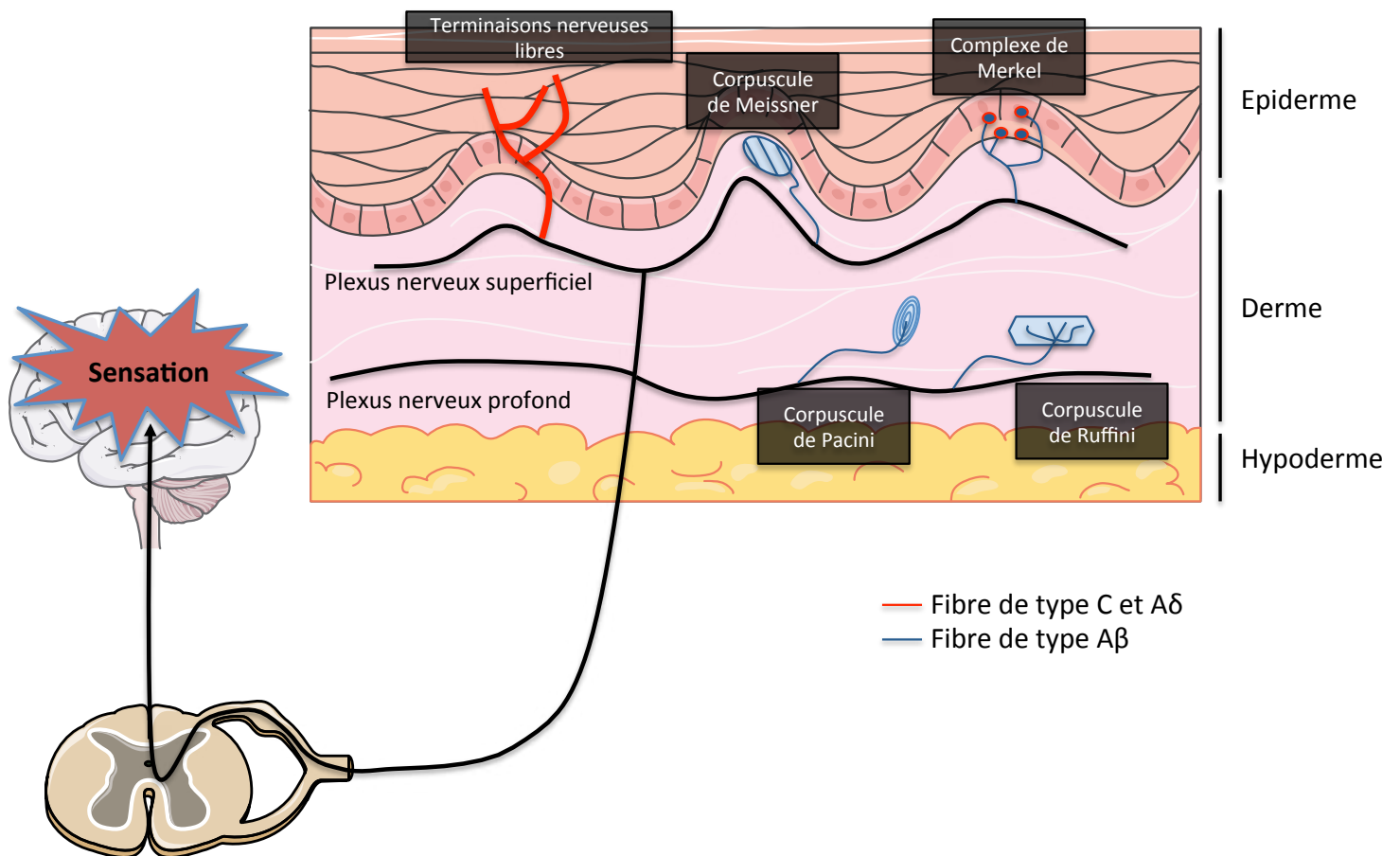


Figure 6. Représentation de l'innervation cutanée

Les fibres nerveuses de type $A\beta$ s'organisent en structures corpusculaires de type complexe de Merkel, corpuscule de Ruffini, corpuscule de Meissner et corpuscule de Paccini qui forment les mécanorécepteurs. Les fibres nerveuses intra-épidermiques ou libres de type $A\delta$ et C s'organisent en structures libres et sont impliquées dans la nociception, la thermoception et pruriception.

2.3. Les nocicepteurs, thermocepteurs et pruricepteurs cutanés

2.3.1. Organisation des fibres intra-épidermiques

Les fibres nerveuses intra-épidermiques sont des ramifications terminales de fibres nerveuses peu ou amyélinisées de type A δ et C, qui perdent leur gaine de myéline à l'entrée de l'épiderme. Ces fibres cheminent entre les kératinocytes dans toutes les couches vivantes de l'épiderme (de la couche basale à la couche granuleuse). Ne présentant pas de structure terminale apparente, elles ont été préalablement décrites comme terminaisons nerveuses libres (Talagas and Misery, 2015).

Ces fibres nerveuses intra-épidermiques correspondent à des nocicepteurs polymodaux, des mécanorécepteurs à haut seuil d'activation, des thermocepteurs et des pruricepteurs. Elles jouent un rôle dans de nombreuses dermatoses prurigineuses inflammatoires comme par exemple le psoriasis, la DA et le syndrome de Netherton (SN) (Briot et al., 2010; Gouin et al., 2015a; Hovnanian, 2013; Mollanazar et al., 2015; Steinhoff et al., 2000; Wilson and Bautista, 2014).

2.3.2. Les nocicepteurs mécaniques, thermiques et polymodaux

Les fibres intra-épidermiques nociceptives peuvent être subdivisées en trois catégories en fonction du type de message douloureux qu'elles véhiculent : thermique, mécanique ou encore polymodal. Ces différentes fibres nociceptives sont décrites ci-dessous :

- Les fibres thermoceptives répondent à des températures inférieures à 10-15°C ou supérieures à 42°C transmettant des informations thermiques douloureuses (Davis, 1998; Huang et al., 2006). La densité de ces fibres est très variable dans les différentes régions du corps conduisant à une différence de sensibilité aux stimuli thermiques et douloureux. Les parties du corps glabre (paume des mains, plante des pieds) ont un seuil de douleur à la chaleur plus bas que les zones pileuses (abdomen, dos des mains, dessus des pieds...) (Säterö et al., 2000). En revanche, les seuils de douleur au froid semblent identiques entre peau glabre et peau pileuse mais les sensations de picotements sont plus souvent rapportées au niveau des zones pileuses (Davis, 1998). La spécificité de sensibilité au chaud ou au froid de ces thermorécepteurs est principalement associée à l'expression de canaux

calciques spécifiques au chaud et au froid, que sont les « transient receptor potential channels » (TRP) (Benecke et al.; Cho et al., 2014; 2011; Wilson and Bautista, 2014). Nous nous focaliserons sur deux de ces membres le TRPV1 et TRPA1 (vanilloïde 1 et ankyrin 1) qui sont également connus pour être impliqués dans des pathologies cutanées associées à l'INC et au prurit (Bautista et al., 2013; Gouin et al., 2015a; Horváth et al., 2015; 2011). La sensibilisation et l'implication de ces deux TRPs dans l'inflammation cutanée ont fait l'objet d'une revue qui est présentée dans la partie introduction II.B.2.

- Les fibres mécanocéptives à haut seuil d'activation répondent à des stimuli mécaniques de fortes intensités (LaMotte and Campbell, 1978).
- Les fibres nociceptives polymodales répondent autant aux stimuli nociceptifs thermiques que mécaniques (LaMotte and Campbell, 1978).

2.3.3. Les pruricepteurs

Le prurit est défini comme une sensation déplaisante qui provoque le besoin de se gratter. Il émerge depuis peu la notion de pruricepteurs, récepteurs spécifiques permettant de percevoir le prurit, mais leur distinction de la famille des récepteurs nociceptifs reste encore débattue (LaMotte et al., 2014; Misery, 2014a; Misery and Ständer, 2010). En effet, ces pruricepteurs utilisent les fibres intra-épidermiques de type A δ et surtout celles de type C (Potenzieri and Udem, 2012; Schmelz et al., 1997, 2003). Ils sécrètent des neuropeptides : la substance P (SP), le « calcitonin gene related peptide » (CGRP) et le « vasoactive intestinal peptide » (VIP) (Ikoma et al., 2006; Misery et al., 2014; Wallengren, 2005).

En 1997, Martin Schmelz montrait que l'histamine pouvait induire un prurit grâce à l'activation de terminaisons nerveuses très spécifiques, que l'on peut qualifier de pruricepteurs (Schmelz et al., 1997). Les effets pruritogènes de l'histamine passent essentiellement par la liaison de l'histamine à son récepteur histaminergique 1 (H1) et dans une moindre mesure par H2 et H4. A l'inverse, sa fixation sur le H3 inhibe le prurit. L'absence d'efficacité des anti-histaminergiques dans certains prurits laisse croire qu'il existe d'autres voies indépendantes de l'histamine, dites non-histaminergiques (Misery, 2014a; Misery et al., 2014).

Depuis peu, le rôle des protéases (trypsine, papaïne, kallicréine, cathepsine G, thrombine etc.) dans l'induction du prurit a été clairement établi. En effet, leur récepteur, PAR-2 (récepteur activé par des protéases de type 2), a été défini comme la deuxième grande voie d'activation du prurit (Misery, 2014a; Misery et al., 2014; Steinhoff et al., 2003b; Tsujii et al., 2008). Il a également été identifié comme un acteur important dans de nombreuses pathologies cutanées inflammatoires : le psoriasis, la DA et le SN (Asfaha et al., 2007; Briot et al., 2010; Fu et al., 2014; Gouin et al., 2015a; Lee et al., 2010a). Plus récemment, le récepteur PAR-4 a également été montré comme étant impliqué dans le prurit et l'INC (Asfaha et al., 2007; Fu et al., 2014; Misery, 2014a; Misery et al., 2014). Ces deux PARs seront présentés ultérieurement dans un article de revue dans la partie Introduction II.B.1. De nombreux autres médiateurs tels que la SP, la sérotonine, la « thymic stromal lymphopoietin » (TSLP), l'IL-2, l'IL-31, l'IFN- γ et la prostaglandine E2 sont connus pour déclencher un prurit (Misery, 2014a; Misery et al., 2014; Wilson et al., 2013a).

L'implication de canaux ioniques ou d'autres récepteurs spécifiques du prurit émerge peu à peu. Les canaux TRPV1 et TRPA1 ont été identifiés comme participant directement ou indirectement au déclenchement d'un prurit ainsi que dans l'inflammation cutanée (voir Introduction II.B.2.) (Jian et al., 2016; Wilson et al., 2013a, 2013b; Yun et al., 2011). Il a récemment été démontré l'implication de nouveaux récepteurs cellulaires du prurit non-histaminergique, les « Mas-related G protein-coupled receptor » (MRGPR), dont les membres MRGPA3, MRGPC11 et MRGPRX1 ont clairement été identifiés comme étant impliqués dans le prurit et l'inflammation (LaMotte et al., 2014; McNeil and Dong, 2014; Solinski et al., 2012; Wilson et al., 2011) . Il s'agit de récepteurs couplés à la protéine G qui sont activés par des pruritogènes comme la chloroquine et la « bovine adrenal medulla 8-22 » (BAM8-22) (Figure 7). Le rôle de ces récepteurs dans l'inflammation cutanée et le prurit sera détaillé plus précisément dans l'article de point de vue dans la partie Introduction II.B.1.

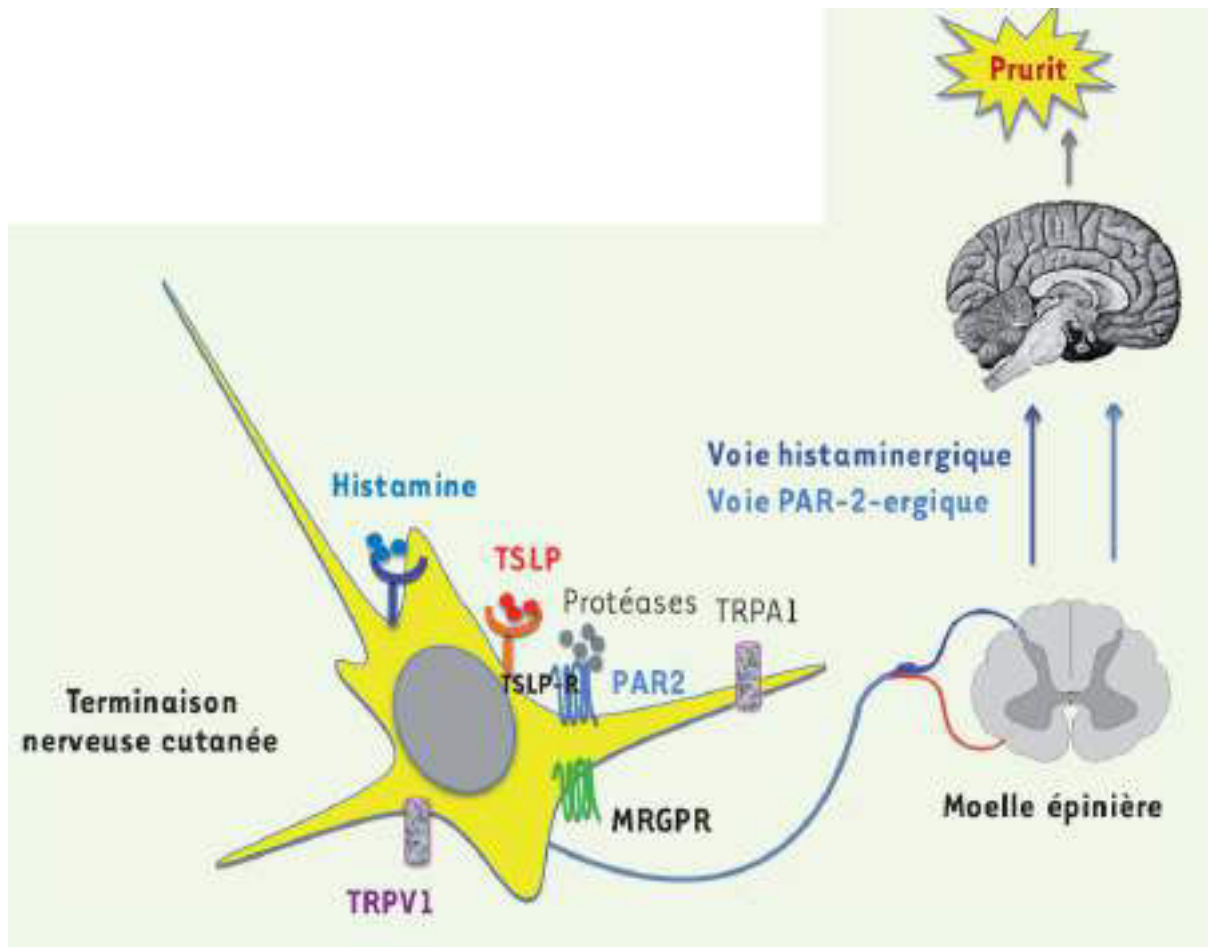


Figure 7. Représentation des voies du prurit : du récepteur au SNC.

La présence simultanée de récepteurs sur la terminaison nerveuse n'est pas démontrée et est peu probable ; tous ces récepteurs ont été figurés sur la même cellule par simplification (Misery, 2014a).

3. Interactions neuro-cutanées

Les fibres nerveuses intra-épidermiques interagissent directement ou indirectement avec les cellules cutanées et les cellules du système endocrinien, lymphatique et immunitaire. Ces communications ont conduit à la définition d'un système neuro-immuno-endocrino-cutané (SNIEC) (Bayliss, 1901; Boulais and Misery, 2008; Brazzini et al., 2003; Jancsó et al., 1967; Misery, 1997; Roosterman et al., 2006). Pour fonctionner, ce système nécessite un langage commun constitué de molécules de différentes natures : les neuromédiateurs, les cytokines et des facteurs de croissance. Ces molécules sont synthétisées et libérées par les cellules de la peau ainsi que par les terminaisons nerveuses intra-épidermiques. Elles agissent sur elles mêmes et sur les cellules voisines exprimant les récepteurs de ces molécules (Boulais and Misery, 2008; Chéret et al., 2013; Gouin et al., 2015a; Misery, 1996; Roosterman et al., 2006).

De nombreux neuromédiateurs peuvent être sécrétés au sein de la peau par ces fibres nerveuses intra-épidermiques. Ces molécules agissent sur le maintien de l'homéostasie de la peau, l'INC, le prurit ainsi que dans l'organisation et le renouvellement de l'épiderme (Birklein and Schmelz, 2008; Chéret et al., 2013; Dallos et al., 2006; Gouin et al., 2015a; Roosterman et al., 2006). Ces neuromédiateurs sont des neuropeptides (SP ; neurokinines A et B ; CGRP ; VIP ; somatostatine, «Gastrin-Releasing Peptide» (GRP) ; neuropeptide Y (NPY) ; neurotensine, bradykinine ; acétylcholine ; catécholamines ; endorphines ; enképhalines), des neurohormones (prolactine ; mélanotropine ; «Melanocyte Stimulating Hormone» (MSH) ; corticotropine ; «AdrenoCorticoTropic Hormone» (ACTH)) ou des neurotrophines («Nerve Growth Factor» (NGF) ; neurotrophines-3 et -4 (NT-3 et -4) ; « Brain Derived Neurotrophic factor » (BDNF)).

Les cellules épidermiques et dermiques de la peau peuvent également produire des neuromédiateurs, des enzymes (MMPs, protéases) (Briot et al., 2009; Chéret et al., 2013; Gouin et al., 2015a; Lee et al., 2010a, 2008), des neurotrophines (NGF), des cytokines (IL-6 et -8) (Chéret et al., 2013; Gouin et al., 2015a), des chémokines (CXCLs) (Takei-Taniguchi et al., 2012) et des facteurs de croissance (NT-3 et semaphorine 3A (Sema3A)) (Chéret et al., 2013; Gouin et al., 2015a; Ikezawa et al., 2010; Ji et al., 2002; Roosterman et al., 2006; Tang et al., 2004; Tominaga and Takamori, 2014). Ces médiateurs solubles régulent l'innervation cutanée et la réponse inflammatoire. Le NGF et la NT-3 permettent la repousse nerveuse, l'arborisation des terminaisons nerveuses sensorielles, la survie et le maintien des neurones. La Sema3A est un agent chemorépulseur qui inhibe la croissance neuronale. L'ensemble de ces médiateurs régule l'homéostasie de l'innervation cutanée par des mécanismes d'attraction et de répulsion.

En cas d'inflammation, les cellules immunitaires en transit ou présentes constitutivement dans la peau, peuvent s'activer sous l'action de ces médiateurs sécrétés par les terminaisons nerveuses sensorielles et les cellules de la peau. Ce processus conduit à une seconde vague de libération de cytokines et neuromédiateurs, issus des cellules immunitaires, qui engendrent une boucle d'amplification de l'inflammation (Chéret et al., 2013; Gouin et al., 2015a).

B. Inflammation Neurogène Cutanée

1. Définition et principaux acteurs impliqués dans l'INC (Article 1)

La définition de l'INC ainsi que le rôle des PARs et des Mrgpr dans la régulation des médiateurs de l'inflammation et, par conséquent, dans l'auto-entretien de l'INC ont été présentés dans un article de « viewpoint » publié dans **Experimental Dermatology**.

Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin

Olivier Gouin^{1,2}, Nicolas Lebonvallet¹, Killian L'Herondelle¹, Christelle Le Gall-Ianotto¹, Virginie Buhé¹, Emmanuelle Plée-Gautier¹, Jean-Luc Carré¹, Luc Lefeuvre² and Laurent Misery¹

¹University of Western Brittany, Laboratory of Neurosciences of Brest, Brest, France; ²Uriage Dermatological Laboratories, Courbevoie, France
Correspondence: Pr Laurent Misery, Department of Dermatology, University Hospital, 29609 Brest, France, Tel.: + 33 298 22 33 15; Fax: + 33 298 22 33 82, e-mail: laurent.misery@chu-brest.fr

Abstract: Cutaneous neurogenic inflammation (CNI) is frequently associated with skin disorders. CNI is not limited to the retrograde signalling of nociceptive sensory nerve endings but can instead be regarded as a multicellular phenomenon. Thus, soluble mediators participating in communication among sensory nerves, skin and immune cells are key components of CNI. These interactions induce the self-maintenance of CNI, promoting a vicious cycle. Certain G protein-coupled receptors (GPCRs) play a prominent role in these cell interactions and contribute to self-maintenance. Protease-activated receptors 2 and 4 (PAR-2 and PAR-4, respectively) and Mas-related G protein-coupled receptors

(Mrgpr) are implicated in the synthesis and release of neuropeptides, proteases and soluble mediators from most cutaneous cells. Regulation of the expression and release of these mediators contributes to the vicious cycle of CNI. The authors propose certain hypothetical therapeutic options to interrupt this cycle, which might reduce skin symptoms and improve patient quality of life.

Key words: inflammation – mrgpr – neurogenic – neurotransmitter – PAR – skin

Accepted for publication 6 July 2015

Neurogenic inflammation, which is classically associated with the release of neuropeptides from sensory nerve endings *via* antidromic conduction, is initially acute(1–3). Excessive release of neuropeptides, such as substance P (SP)(2,4–6), calcitonin gene-related peptide (CGRP)(1,6–11) and gastrin-releasing peptide (GRP)(12), induces skin inflammation(3,11,13). Increases in the interstitial concentration of neuropeptides within the skin affect neighbouring target cells, including keratinocytes, mast cells, neutrophils and fibroblasts(4,7,14,15) (Fig. 1). This phenomenon disrupts the homeostasis of the skin by favouring acute positive feedback loops of communication between sensory nerves, skin and immune cells. Excessive release of neuropeptides results in a pro-inflammatory feedback loop that is associated with abnormal skin growth, differentiation and immunomodulation.

Therefore, it is difficult to accept that cutaneous neurogenic inflammation (CNI) is limited to only the induction of inflammation by sensory nerves; instead, CNI appears to involve the activation of a multicellular network with multiple, multidirectional interactions (Fig. 1). After exogenous or endogenous inflammatory stimulation, skin and immune cells can also release a substantial amount of soluble mediators, including proteases, neuropeptides, neurotrophins(7), cytokines(5,14,16) and prostanoïdes(17). In turn, these mediators may stimulate or activate sensory nerve endings and other cells. This process contributes to an abnormal increase in soluble mediators and neuropeptides in the skin from these cells that initiate positive feedback loops to enhance the inflammatory process.

Thus, intense and narrow communication among sensory nerve endings, skin and immune cells contributes to the self-maintenance of CNI, leading to a vicious cycle of processes and resulting in chronic inflammation(15) (Fig. 2). G protein-coupled receptors

(GPCRs) play several roles in these inflammatory processes. The ability to disrupt this vicious cycle may help to alleviate the inflammatory symptoms in the skin.

Proteases, neuropeptides and other soluble mediators regulate cellular expression and the secretory profile of neighbouring target cells. Classically, the release of these mediators is dependent on an increase in intracellular calcium(4,18). Specific calcium channels are involved in the calcium increase that occurs after GPCR activation. Five specific GPCRs that are known to be involved in several skin disorders are key components of CNI: protease-activated receptors 2(19–21) and 4(19,22) (PAR-2 and PAR-4, respectively) and Mas-related G-coupled protein receptors C11, A3 and X (MrgprC11, MrgprA3 and MrgprX, respectively). Calcium channels such as the nociceptive transient receptor potential vanilloïd 1(4,23–26) (TRPV1) and transient receptor potential ankyrin 1(1,26–30) (TRPA1) co-localize with PARs(19,22,31) and Mrgprs(32,33). TRP channels are directly associated with calcium influx. Thus, an outstanding question concerns how GPCRs enhance CNI by affecting the release of soluble mediators and gene expression in sensory nerves, skin and immune cells.

Role of PARs

PAR-2 is involved in pruritus and many skin diseases such as atopic dermatitis(34,35). PAR-4 causes oedema formation(36), leucocyte recruitment(37) and analgesia(31,38,39); however, its role in sensory nerves remains unclear. PAR-2 and PAR-4 are expressed on many cutaneous cells and are activated by proteases, which are the first molecules released at the site of injury. These endogenous proteases can be released by mast cells, keratinocytes, fibroblasts, T cells, basophils, eosinophils and neutrophils. Moreover, exogenous proteases can be released by foreign organisms such as bacteria or fungi(19,34,40,41). The differing localizations of PAR-2 and

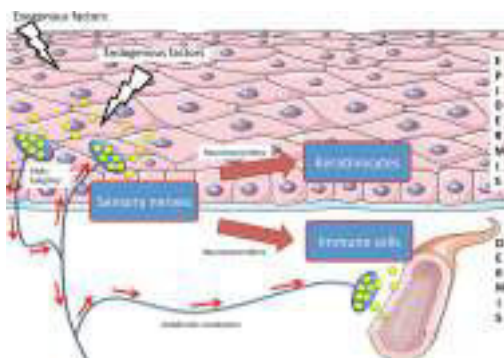


Figure 1. Traditional representation of cutaneous neurogenic inflammation: an unambiguous phenomenon.

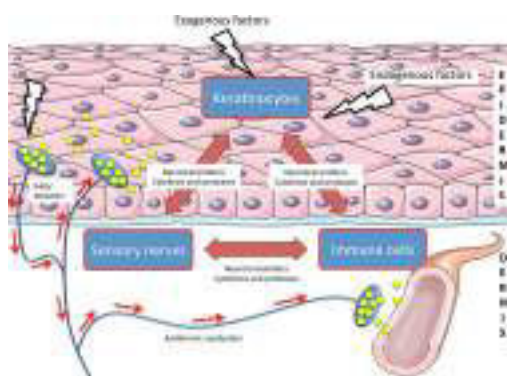


Figure 2. Proposed representation of CNI: the induction and self-maintenance of skin inflammation by a neurogenic mechanism.

PAR-4 on cutaneous cells could be linked to the different roles of these receptors. In particular, PAR-2 and PAR-4 are co-expressed on endothelial cells and sensory nerves. PAR-2 is found on keratinocytes, mast cells, neutrophils and DCs(21,42–44), whereas PAR-4 is expressed at high levels on platelets(22,37,45) but not on keratinocytes(46).

On sensory nerves, both PARs co-localize with neuropeptides such as CGRP and SP(19,47,48) and are regarded as activators or sensitizers of TRPs(49–51). PAR-2(44) and PAR-4(31) induce the release of these neuropeptides. In addition, PAR-2 mediates protease degranulation in dermal mast cells(52), as well as the release of soluble mediators (IL-8 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP))(16,22,43,53,54) from keratinocytes. PAR-2 is known to promote IL-6 and IL-8 in endothelial cells(55). In addition to the aforementioned functions, PAR-2 is mainly involved in cellular secretion(53,55), whereas the role of PAR-4 remains unclear in secretory profiles of cutaneous cells(55). Both PAR-2 and PAR-4 may support the concept of a CNI-related vicious cycle by increasing plasma extravasation and cutaneous cell communication (Fig. 2). However, PARs not only have secretory roles in CNI processes but also act as gene regulators.

Indeed, in many reports, PAR-2 and PAR-4 have been shown to regulate CNI-related gene expression in cutaneous cells. PAR-2

contributes to immune cell mobilization by upregulating IL-6 and IL-8 expression in endothelial cells(55). In the same cells, protease-mediated PAR-4 activation contributes to leucocyte recruitment. In this process, PAR-4 upregulates the expression of soluble mediators or adhesion molecules *via* the NF- κ B/p38 MAPK pathway(56). Studies have demonstrated that PAR-4 regulates neuropeptides in sensory nerves by affecting p-ERK1/2. In fact, PAR-4 contributes to the reinforcement of neurosecretory profiles by upregulating CGRP mRNA and peptide expression(47). In sensory nerves, studies have demonstrated that soluble mediators may affect PAR expression levels. Thus, pro-inflammatory IL-1 β (57) and capsaicin(58) induce PAR-4 upregulation in sensory nerve endings by affecting PKC and TRPV1, respectively. This process could contribute to the increasing sensitivity of sensory nerves to proteases, facilitating the induction of CNI. In mouse platelets, PAR-4 mediates calcium mobilization and IP3/PKC activation, promoting platelet aggregation(59). However, no evidence has been found to indicate that PAR-4 modulates gene expression in these cells. PAR-2 modulates keratinocyte adherence and mobility, and PAR-2 agonists cause the activation and nuclear translocation of the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B in keratinocytes from humans with atopic dermatitis. NF- κ B upregulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)(22,43,53,60). In addition, PAR-2 activation breaks tight junctions *via* the p38 MAPK kinase (p38 MAPK)(61), suggesting that PAR-2 can induce barrier instability and thereby create openings for new exogenous inducers of CNI. Both PAR-2 and PAR-4 could enhance or maintain a CNI-related vicious cycle by upregulating specific pro-inflammatory genes, although these genes have not yet been completely described.

One study provides a good illustration of how PAR-2 can act as a major facilitator of communication between cutaneous cells and regulators of gene expression. On keratinocyte, PAR2 mediates interaction between stromal interaction molecule 1(STIM1) and calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI1). This process promotes an intracellular calcium increase. This process contributes to the expression of the TSLP gene and the release of TSLP into the cutaneous plasma. TSLP then affects TRPA1 in sensory nerves *via* PKC, contributing to the release of neuropeptide (16,54). This study provides the first demonstration that activation of PAR-2 is associated with not only exocytosis but also the up- or downregulation of CNI-related gene expression. Other intriguing findings from the aforementioned study include the determination of genes that can be regulated by PAR-2 and how these genes affect sensory nerves. These data support the idea that CNI does not have a single inducer, but each cell can affect other cells. More interestingly, these data indicate that GPCRs can regulate the release of neuropeptides and soluble mediators through different intracellular pathways.

Role of Mrgpr

Current research has been focused on the Mrgpr family, which is divided into nine distinct subfamilies: MrgprA to MrgprH and MrgprX(62,63). Mrgprs are involved in histamine-independent itch pathways that are activated by pruritogens such as chloroquine (CQ)(64) and bovine adrenal medulla 8-22 (BAM 8-22)(27,32,33). In particular, three Mrgprs are known to be involved in peripheral itch transduction and the scratching response: MrgprA3, MrgprC11 and MrgprX1(32,33,50,65–67).

MrgprA3 and MrgprC11 were the first members of the Mrgpr family to be discovered on sensory nerves. MrgprA3 and MrgprC11 respond to CQ and BAM8-22, respectively. Subsequently, MrgprX1 expression was detected on mast cells; to date, this phenomenon is the only known instance of Mrgpr expression on non-neuronal cells(68). Mrgpr member activation on these cells is strongly associated with the temptation to scratch an itch. Scratching can lead to skin lesions and consecutive degradation of the skin barrier. This loss of skin homeostasis promotes mast cell and neutrophil degranulation followed by keratinocyte and sensory nerve activation.

Studies have demonstrated that MrgprA3 and MrgprC11 are sensitizers of TRPV1 and TRPA1 channels(32,33) in sensory neurons. In addition, both of these Mrgprs co-localize with various neuropeptides (GRP, SP and CGRP)(64) and the vesicular glutamate transporter VGlut2(32,63,65). These findings support the roles of Mrgprs in the secretory profiles of sensory nerves. We believe that both Mrgprs can play other central roles in CNI and itch by inducing the release of neuropeptides, soluble mediators and proteases. Mrgprs do not play the same roles in CQ- and BAM 8-22-mediated itches. Moreover, in pharmacological or genetic models, these drug-mediated itches can be abolished by knocking down TRPA1(33,64). The results of another study reinforced these data by demonstrating that CQ and BAM 8-22 induced the opening of TRPA1 but not TRPV1 *via* MrgprA3 and MrgprC11(33). Although TRPA1 is activated by MrgprA3 and MrgprC11, no data have demonstrated an association of TRPA1 with the secretory profiles of cutaneous cells. However, only MrgprX1 has been reported to promote neuropeptide release by PKC and TPPV1 induction in an F11 cell line that stably overexpresses MrgprX1. In addition, MrgprX1 activation results in the degranulation of mast cells(69). Release of the aforementioned proteases could induce the activation of other cutaneous cells through PAR activation. In accordance with this description, we suggest that Mrgprs involved in the activation of sensory neurons and mast cells play central roles in communication among sensory nerves, skin and immune cells.

Although the roles of Mrgprs in gene regulation have not been studied intensively, one publication has led us to believe that they are implicated in these functions. Although MrgprX1 mediates the release of the endogenous agonist chemokine ligand 2 (CCL2) in mast cell lines, MrgprX1 also upregulates the chemokine receptor 2 (CCR2) in sensory nerves(69). Interestingly, CCL2 is an agonist of CCR2, which suggests that MrgprX1 sensitizes sensory nerves to CCL2. This theory is supported by findings indicating that CCL2 sensitizes TRPV1 *via* CCR2 and promotes neuropeptide release(70). All of the aforementioned mechanisms reinforce or enhance inflammation and induce a vicious cycle of CNI.

Conclusions

After considering all of the above data, it is necessary to recapitulate how PARs and Mrgprs most likely have central roles in the cyclic amplification and self-maintenance of CNI. The activation of PARs and Mrgprs leads to the release of neuropeptides and other soluble mediators from sensory nerves, skin and immune cells; these mediators then act on neighbouring target cells. For example, the activation of PAR-2 on sensory nerves by an exogenous protease contributes to the release of SP and CGRP. These neuropeptides directly affect mast cell degranulation associated with protease release(71). Proteases contribute to the release of

neuropeptides from sensory nerves by acting on PAR-2. Thus, the cycle has returned to its starting point, and the self-maintenance of CNI has been established.

One skin disease might be a good model to study the CNI process: Netherton syndrome (NS), which is a rare and severe autosomal recessive skin disease characterized by chronic skin inflammation, eczematous-like lesions, congenital exfoliative erythroderma and atopic manifestations(34, 72, 73). NS is caused by the loss-of-function of the serine protease inhibitor Kazal-type 5 (Spink5) gene, which encodes the protease inhibitor lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor (LEKTI). This deficiency in LEKTI results in an uncontrolled activity of serine proteases expressed in the skin, in particular KLK5, which initiates a biological cascade resulting in skin inflammation and allergy in which PAR-2 plays a major role. The activation of PAR-2 promotes NF- κ B translocation and consecutive overexpression of TSLP, ICAM1 TNF- α , and IL-8 in keratinocytes from patients with NS and in the epidermis of Spink5(-/-) embryos(34, 73). These pro-inflammatory soluble mediators act on sensory neurons to stimulate the release of neuropeptides that induce CNI (16). In addition, the direct activation of these sensory neurones expressing both PAR-2 and PAR-4 should not be ruled out. This dual activation pathway of neuropeptide release may partly explain the chronicity of CNI in patients with NS. Furthermore, Spink5/PAR-2 double-knockout mice are characterized by a severe decrease in TSLP in the epidermis(54). Thus, by decreasing the TSLP-mediated sensory nerve activation, it is not impossible to control and abolish pruritus symptoms in patients with NS. Taken together, the NS could be a good model to study PAR-2-mediated CNI self-maintenance in keratinocytes and probably in sensory nerves.

To summarize this perspective, it would be wise to regard CNI as a multidirectional, multicellular and very interactive phenomenon that is rather similar to the unambiguous induction of inflammation by sensory nerve endings. Consequently, a cyclic amplification and self-maintenance of CNI occur in the skin. GPCRs (PARs and Mrgprs) help to enhance this self-maintenance and promote a vicious cycle. A better understanding of these interactions in the CNI network may aid in elucidating novel and interesting therapeutic approaches. Different means of interrupting the vicious CNI cycle, such as by affecting GPCRs, intracellular calcium increase or soluble mediators, may be proposed. The abrogation of this circle by targeting PAR-2 and PAR-4 or Mrgprs could represent a promising therapeutic option. This approach could block CNI in different ways, including by blocking either the initial induction or the self-maintenance of CNI. GPCR antagonists can downregulate the expression of pro-inflammatory soluble mediators and the secretion of these mediators from sensory neurons, skin and immune cells. In the case of patients with NS, the injection or application of the LEKTI-like protease inhibitor could result in a pronounced decrease in KLK5 in the epidermis. In these patients, PAR-2 seems to play a complex role. Therefore, the inhibition of PAR-2 could terminate these processes and thus contribute to the recovery of skin barrier homeostasis and permeability, which may reduce inflammatory skin symptoms. This inhibition could halt neutrophil recruitment and maintain skin barrier homeostasis. Thus, this approach could contribute to a decrease in skin symptoms.

Another treatment option involves the regulation of intracellular calcium by blocking increases in calcium. This approach relies on the finding that activation of PAR and Mrgpr is strongly associated with the activation and opening of calcium channels, including TRP and ORAI1. TRP or ORAI1 antagonists can be valuable therapeutic agents. The recovery of ionic stability could also be a promising therapeutic approach for the regulation of calcium. This idea could help to explain why thermal waters can have beneficial effects on certain skin disorders with neurogenic components (74, 75). The propriety of thermal water has been demonstrated in a psoriasis-like murine model. In this model, the use of thermal water in a balneotherapy suppressed important pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of psoriasis, including the lesional cytokines IL-23 and IL-17A (75). Thermal water was also found to antagonize the effects of SP on the cytotoxic activity of bacteria in keratinocytes (74). Taken together, thermal water could act on the skin and rescue skin homeostasis. However, the effects of thermal water remain unclear and require

further investigation as an alternative treatment. The final option could involve disrupting intracellular communications among sensory nerves, skin and immune cells. For example, the modulation of TSLP secretion from keratinocytes or blocking TSLP receptors on sensory nerves could aid in decreasing or terminating the vicious cycle and self-maintenance associated with CNL.

Acknowledgements

This work was supported by the Uriage Dermatological Laboratories, Courbevoie, France. The authors wish to thank the entire team of the Laboratory of Neurosciences of Brest.

Author contributions

OG drafted the manuscript. NL and LM helped to draft the manuscript. All of the authors have reviewed and agreed to the final version of the manuscript.

Conflict of interests

OG: Uriage; NL: BASF; KL: Uriage; CLG: L'Oréal, Natura, Clarins; VB: Clarins; EPG: none; JLC: none; LL: Uriage; LM: BASF, Bioderma, Clarins, L'Oréal, Natura, Pierre Fabre, Uriage.

References

- Koivisto A *et al.* Basic Clin Pharmacol Toxicol 2014; **114**: 50–55.
- Lembeck F, Holzer P. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol 1979; **310**: 175–183.
- Herbert M. K., Holzer P. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmedizin Schmerzther 2002; **37**: 314–325.
- Boillat A, Alijevic O, Kellenberger S. Mol Cell Neurosci 2014; **61C**: 13–22.
- Wei T *et al.* J Neuroinflammation 2012; **9**: 181.
- Dallos A *et al.* Neuropeptides 2006; **40**: 251–263.
- Chéret J., Lebonvallet N., Carré J.-L. *et al.* Wound Repair Regen 2013; **21**: 772–788.
- Pertovaara A, Koivisto A. Eur J Pharmacol 2011; **666**: 1–4.
- Pereira U *et al.* Exp Dermatol 2010; **19**: 931–935.
- Pereira U *et al.* Exp Dermatol 2010; **19**: 796–799.
- Bayliss W M. J Physiol 1901; **26**: 173–209.
- Liu X-Y *et al.* Mol Pain 2014; **10**: 4.
- Holzer P. Pharmacol Rev 1991; **43**: 143–201.
- Riol-Blanco L *et al.* Nature 2014; **510**: 157–161.
- Xanthos D N, Sandkühler J. Nat Rev Neurosci 2014; **15**: 43–53.
- Wilson S R *et al.* Cell 2013; **155**: 285–295.
- Dall'acqua M. C. *et al.* Life Sci 2014; **105**: 7–13.
- Huang L-Y M, Neher E. Neuron 1996; **17**: 135–145.
- Zhao P, Metcalf M, Bunnett N W. Front Endocrinol 2014; **5**: 67.
- Chen Y, Yang C, Wang Z J. Neuroscience 2011; **193**: 440–451.
- Steinhoff M *et al.* J Neurosci Off J Soc Neurosci 2003; **23**: 6176–6180.
- Fu Q *et al.* Inflammation 2014; **38**: 886–895.
- Graham D M, Huang L, Robinson K R *et al.* J Cell Sci 2013; **126**: 4602–4613.
- Straub R H. J Mol Med Berl Ger 2014; **92**: 925–937.
- Usuda H *et al.* J Pharmacol Sci 2012; **118**: 266–274.
- Andreev Y A, Vassilevski A A, Kozlov S A. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2012; **6**: 35–45.
- Wilson S R., Bautista D. M. In Itch: Mechanisms and Treatment (eds. Carstens E., Akiyama T., (CRC Press, 2014). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200927/>
- Cho S I *et al.* Acta Derm Venereol 2014; **95**: 20–24.
- Zygmunt P M, Högestätt E D. Handb Exp Pharmacol 2014; **222**: 583–630.
- Atoyan R, Shander D, Botchkareva N V. J Invest Dermatol 2009; **129**: 2312–2315.
- Vellani V *et al.* Mol Pain 2010; **6**: 61.
- McNeil B., Dong X. In Itch: Mechanisms and Treatment (eds. Carstens E., Akiyama T., (CRC Press, 2014). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200929/>
- Wilson S R *et al.* Nat Neurosci 2011; **14**: 595–602.
- Briot A *et al.* J Exp Med 2009; **206**: 1135–1147.
- Mollanazar N K, Smith P K, Yosipovitch G. Clin Rev Allergy Immunol 2015; **49**: 1983–2015.
- Tourdrot B E *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; **34**: 2644–2650.
- Houle S, Papez M D, Ferazzini M *et al.* Br J Pharmacol 2005; **146**: 670–678.
- Asfaha S *et al.* Br J Pharmacol 2007; **150**: 176–185.
- Karanjia R, Spreadbury I, Bautista-Cruz F *et al.* Neurogastroenterol Motil 2009; **21**: 1218–1221.
- Zhao P *et al.* J Biol Chem 2014; **289**: 27215–27234.
- Harvima I. T., Nilsson G., Naukkarinen A. G. Ital Dermatol Venereol 2010; **145**: 195–204.
- D'Andrea M R *et al.* J Histochem Cytochem 1998; **46**: 157–164.
- Kempkes C., Buddenkotte J. *et al.* In Itch: Mechanisms and Treatment (eds. Carstens E., Akiyama T.) (CRC Press, 2014). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200911/>
- Steinhoff M *et al.* Nat Med 2000; **6**: 151–158.
- Russell F A, Veldhoen V E, Tchitchkan D *et al.* J Neurophysiol 2010; **103**: 155–163.
- Mascia F, Mariani V, Giannetti A *et al.* J Allergy Clin Immunol 2002; **109**: 532–538.
- Wang Z *et al.* J Neurosci Res 2013; **91**: 1551–1562.
- Zhu W-J *et al.* Brain Res 2005; **1041**: 205–211.
- Liu B, Zhang C, Qin F. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 2005; **25**: 4835–4843.
- Liu Q., *et al.* Sci Signal 2011; **4**: ra45.
- Roosterman D, Goerge T, Schneider S W *et al.* Physiol Rev 2006; **86**: 1309–1379.
- Rickard A, Portell C, Kell P J *et al.* Am J Physiol Renal Physiol 2005; **288**: F714–F721.
- Ishikawa C, Tsuda T, Konishi H *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009; **53**: 1760–1765.
- Briot A *et al.* J Invest Dermatol 2010; **130**: 2736–2742.
- Shpacovitch V M *et al.* J Invest Dermatol 2002; **118**: 380–385.
- Megyeri M *et al.* J Immunol Baltim Md 2009; **195**: 3409–3416.
- Wang Z *et al.* Neurochem Res 2013; **38**: 1895–1903.
- Chen D, Wang Z, Zhang Z *et al.* Cell Mol Neurobiol 2013; **33**: 337–346.
- Arachiche A, de la Fuente M, Nieman M T. PLoS ONE 2013; **8**: e55740.
- Buddenkotte J *et al.* J Invest Dermatol 2005; **124**: 38–45.
- Enjoji S., Ohama T. & Sato K. J Vet Med Sci Jpn Soc Vet Sci 2014; **76**: 1225–1229.
- Solinski H J, Gudermann T, Breit A. Pharmacol Rev 2014; **66**: 570–597.
- Dong X, Han S, Zylka M J *et al.* Cell 2001; **106**: 619–632.
- Liu Q *et al.* Cell 2009; **139**: 1353–1365.
- Akiyama T, Tominaga M, Takamori K *et al.* J Neurophysiol 2014; **112**: 2283–2289.
- Qu L *et al.* Brain J Neurol 2014; **137**: 1039–1050.
- Han L *et al.* Nat Neurosci 2013; **16**: 174–182.
- Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro M A *et al.* Pharmacol Rev 2014; **66**: 1080–1105.
- Solinski H J *et al.* PLoS ONE 2013; **8**: e58756.
- Spicarova D, Adamek P, Kalynovska N *et al.* Neuropharmacology 2014; **81**: 75–84.
- Kulka M, Sheen C H, Tancowny B P *et al.* Immunology 2008; **123**: 398–410.
- Furio L *et al.* J Exp Med 2014; **211**: 499–513.
- Hovnanian A. Cell Tissue Res 2013; **351**: 289–300.
- Mijouin L *et al.* PLoS ONE 2013; **8**: e78773.
- Lee Y B *et al.* Ann Dermatol 2014; **26**: 221–230.

2. Rôle des TRPs et de leur sensibilisation dans l'INC (Article 2)

L'ensemble des mécanismes d'activation et de sensibilisation de TRPV1 et TRPA1 par des molécules de l'inflammation dans l'induction, l'entretien et l'auto-amplification de l'INC a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus sur le rôle de ces deux canaux dans la régulation des médiateurs de l'inflammation et l'auto-entretien de l'INC ont été repris dans un article de revue soumis et accepté avec des corrections mineures dans le journal **Protein&Cell**.

TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization

Running title: Neurogenic inflammation in the skin

Keywords: sensory nerve; neurogenic skin inflammation; inflammatory gene regulation; pruritus.

Olivier Gouin^{1, 2}, Killian L'Herondelle¹, Nicolas Lebonvallet¹, Christelle Le Gall-Ianotto¹, Mehdi Sakka¹, Virginie Buhé¹, Emmanuelle Plée-Gautier¹, Jean-Luc Carré¹, Luc Lefeuvre², Laurent Misery¹, Raphaele Le Garrec¹

¹ *University of Western Brittany, Laboratory on Interaction Neurons-Keratinocytes (LINK), Brest, 29200 France*

² *Uriage Dermatological Laboratories, Courbevoie, 92400 France*

Corresponding author: Pr Laurent Misery, Department of Dermatology, University Hospital, 29200 Brest, France, Tel: + 33 298 22 33 15, Fax: + 33 298 22 33 82, E-mail: laurent.misery@chu-brest.fr

Abstract

Cutaneous neurogenic inflammation (CNI) is inflammation that is induced (or enhanced) in the skin by the release of neuropeptides from sensory nerve endings. Clinical manifestations are mainly sensory and vascular disorders such as pruritus and erythema. Transient receptor potential vanilloid 1 and ankyrin 1 (TRPV1 and TRPA1, respectively) are non-selective cation channels known to specifically participate in pain and CNI. Both TRPV1 and TRPA1 are co-expressed in a large subset of sensory nerves, where they integrate numerous noxious stimuli. It is now clear that the expression of both channels also extends far beyond the sensory nerves in the skin, occurring also in keratinocytes, mast cells, dendritic cells and endothelial cells. In these non-neuronal cells, TRPV1 and TRPA1 also act as nociceptive sensors and potentiate the inflammatory process. This review discusses the role of TRPV1 and TRPA1 in the modulation of inflammatory genes that leads to or maintains CNI in sensory neurons and non-neuronal skin cells. In addition, this review provides a summary of current research on the intracellular sensitization pathways of both TRP channels by other endogenous inflammatory mediators that promote the self-maintenance of CNI.

1. Introduction

1.1. CNI definition, induction and self-maintenance

Cutaneous neurogenic inflammation (CNI) is the inflammation induced (or enhanced) by an excessive release of neuropeptides such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) and tachykinins (mainly substance P, SP) in the skin from locally or antidromically activated sensory nerve endings (Gouin et al., 2015b; Herbert and Holzer, 2002; Roosterman et al., 2006).

CNI can be induced through the direct activation of receptors on sensory nerve endings by mechanical skin injuries and other exogenous stimuli, such as exposure of the skin to injurious heat or cold, ultraviolet (physical factors), chemical irritants or allergens. Endogenous stimuli, including osmotic or pH changes in the skin, can also initiate CNI (Herbert and Holzer, 2002; Roosterman et al., 2006). The released neuropeptides act on skin cells that express cognate neuropeptide receptors, including microvascular cells and resident mast cells, leading to degranulation, vasodilation and extravasation of plasma proteins and leukocytes. Some clinical manifestations of acute CNI are localized pruritus, redness, heat and edema (Herbert and Holzer, 2002; Roosterman et al., 2006; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013). Moreover, neuropeptides and mast cell-released mediators can act on other neighboring target cells, including keratinocytes, dendritic cells, neutrophils and fibroblasts, leading to the disruption of skin homeostasis, with abnormal skin growth, differentiation and/or immunomodulation (Patricio et al., 2015; Shim et al., 2007; Trevisani et al., 2007; Wilson et al., 2013a). Furthermore, a variety of neurotrophic (e.g. nerve growth factor, NGF) or inflammatory mediators (e.g. proteases, histamine, cytokines, prostanoids) or endocannabinoids (e.g. anandamide) released by skin cells/nerve fibers or chemoattracted cells are able to further activate or sensitize these sensory receptors (Briot et al., 2009; Vellani et al., 2010; Roosterman et al., 2006; Riol-Blanco et al., 2014; Wilson et al., 2013a; Wei et al., 2012). Such positive feedback loops contribute to the enhancement of the inflammatory process and thus to self-maintained CNI (Gouin et al., 2015b). Therefore, CNI appears to be a multi-cellular network with multiple, multi-directional interactions leading to a vicious circle of processes that results in chronic inflammation (Gouin et al., 2015b). Indeed, CNI is frequently involved in chronic inflammatory skin disorders, including

psoriasis, atopic dermatitis (AD) (Kubanov et al., 2015; Smolyannikova et al., 2015), sensitive skin (Costa et al., 2014), rosacea (Kürkçüoğlu and Alaybeyi, 1991; Salem et al., 2013), and hypertrophic scars (Akaishi et al., 2008; Kwak et al., 2014).

1.2. Role of PARs and TRPs

Although the exocytosis of neuropeptides from large dense-core vesicles differs from that of classical neurotransmitters from small clear vesicles, it is also triggered by a rise in the cytosolic Ca^{2+} concentration (Huang and Neher, 1996; Jans et al., 2004; Zupanc, 1996). Two primary pathways lead to increased Ca^{2+} concentration in the cytosol, the Ca^{2+} influx associated with the opening of plasmalemmal Ca^{2+} channels and the Ca^{2+} released from intracellular stores (the endoplasmic reticulum and mitochondria). In addition to voltage-gated Ca^{2+} channels, cutaneous sensory nerves express cationic channels and G protein-coupled receptors (GPCRs), the activation of which can lead directly or indirectly to an increase in cytosolic Ca^{2+} . In addition to the induction of neuropeptide release, an increase in cytosolic Ca^{2+} can also drive the regulation of the expression of several inflammatory genes, such as those encoding neuropeptides, cytokines, growth factors, prostaglandins (PG), and matrix metalloproteinases (MMPs), which have a possible role in chronic cutaneous inflammation.

Interestingly, cationic channels expressed by cutaneous nerve endings include some transient receptor potential (TRP) channels known to be involved in neuropeptide exocytosis and skin disorders that have neurogenic mechanisms. In this review we focus on two of these channels including TRPV1 and TRPA1 (TRP subfamily vanilloid 1 and TRP subfamily ankyrin 1, respectively) (Boillat et al., 2014; Horváth et al., 2015; Wei et al., 2010; Xie, 2009). Other TRP channels has also been found to be involved in CNI such as TRPV3 (Lin et al., 2012) and TRPV4 (Zhao et al. 2014; Rajasekhar et al. 2015; Akiyama et al. 2016; Kim et al. 2016). In addition, the sensory nerves in the skin also express GPCRs, of which the protease-activated receptor (PAR) family in particular is known to be involved in CNI, especially PAR-2 and PAR-4 (Cocks and Moffatt, 2000). Thus, TRPV1, TRPA1, PAR-2 and PAR-4 are associated not only with a rise in the intracellular Ca^{2+} concentration (iCa^{2+}) with the subsequent exocytosis of neuropeptides but also with pro-inflammatory gene expression (Figure 1). Moreover, following the activation of one of these receptors,

intracellular pathways can lead to the sensitization of one of these channels. In addition to their expression by sensory nerves, TRPV1, TRPA1, PAR-2 and PAR-4 are found in resident skin cells or cells recruited during CNI. Thus, they could contribute to the intense and narrow communication within the skin between sensory nerve endings, skin and immune cells. This review discusses the role of TRPV1 and TRPA1 activation or signaling pathways associated with their sensitization in the self-maintenance of CNI through the induction of a pro-inflammatory response in the skin.

2. TRPV1

2.1. A cationic channel with multiple direct roles in CNI induction and self-maintenance

TRPV1 is a nociceptive cationic (mainly Ca^{2+}) channel responsive to high temperature ($>43^\circ\text{C}$) (Boillat et al., 2014). In addition to excessive heat, various exogenous and endogenous triggering factors can directly activate or sensitize TRPV1 (Table 1). TRPV1 was initially described in cutaneous C- and A δ -type sensory nerve endings, where it plays a critical role. High temperature and capsaicin have been demonstrated to activate sensory nerves and induce neurogenic inflammation (Jancsó et al. 1967; Caterina et al. 1997). Indeed, TRPV1 activation by these direct activators allows the entry of Ca^{2+} , leading to the release of neuropeptides, including SP (Andreev et al., 2012) and CGRP (Boillat et al., 2014), that control edema and can induce (or enhance) neurogenic inflammation (Roosterman et al., 2006; Steinhoff et al., 2003b; Szallasi and Blumberg, 1989; Vincent et al., 2013; Zygmunt et al., 1999). Furthermore, endogenous mediators produced or released during CNI (eicosanoids, acidosis, ATP, histamine, bradykinin, NGF) that further sensitize or activate TRPV1 on skin nerve terminals contribute to the self-maintenance of CNI (Roosterman et al., 2006). Moreover, TRPV1 was found to be expressed in skin cells (keratinocytes, dermal mast cells, dendritic cells, sebocytes, dermal blood vessels, hair follicles and sweat glands), where it acts as a pain and chemical sensor (Ständer et al., 2004).

Factors	Pathways of activation	Reference
Exogenous activators of TRPV1 ^a :		
High temperature (>43°C) Protons (pH<5.9)	Direct activation : -Inward current -iCa ²⁺ elevation -Neuropeptide release -Inflammatory mediator release	(Boillat et al. 2014) (Caterina et al. 1997) (Tominaga et al. 1998)
Ultraviolet		(Lee et al. 2009, 2011)
Vanilloids: -olvanil -resiniferatoxin Natural substances: -camphor -piperin -capsaicin		(Caterina et al. 1997) (Szallasi and Blumberg 1989)
Endogenous activators of TRPV1:		
Anandamide	Direct activation : -Inward current -iCa ²⁺ elevation -Neuropeptide release -Inflammatory mediator release	(Smart et al. 2000) (Zygmunt et al. 1999)
AA ^b metabolites: -NADA ^c -ODA ^d Lipoxygenase products: -HPETE ^e -15-HPETE ^f -LTB4 ^g		(Huang et al. 2002) (Hwang et al. 2000)
DAG ^h CAMKII ⁱ		(Jung et al. 2004) (Woo et al. 2008)
PIP2 ^j		(Senning et al. 2014) (Ufret-Vincenty et al. 2015)
Indirect activators/sensitizers of TRPV1:		
Bradykinin Growth factors (e.g. NGF ^k) PGE2 ^l	BK2R ^p (GPCR ^q) RTK ^r EPR ^s (GPCR)	(Chuang et al. 2001) (Vellani et al. 2001) (Zhang et al. 2008)
Proteases	PAR-2 and PAR-4 ^t (GPCR)	(Amadesi et al. 2004, 2006) (Vellani et al. 2010)
Serotonin	5-HTR ^u (GPCR)	(Sugiura et al. 2002)
Histamine	H1R and H4R ^v (GPCR)	(Jian et al. 2016) (Shim et al. 2007)
ATP ^m	P2Y1R ^w (GPCR)	(Numazaki et al. 2002) (Tominaga et al. 2001)
TRPA1 ⁿ	Physical interaction or Ca ²⁺ second messenger	(Anand et al. 2008) (Alpizar et al. 2013) (Spahn et al. 2014)
DAG	Indirectly by PKC ^x activation	(Burgess et al. 1989) (Chuang et al. 2001) (Cesare et al. 1999)
Inhibitors/desensitizers of TRPV1:		
Calcineurin ^o	iCa ²⁺ -dependent dephosphorylation of TRPV1	(Docherty et al. 1996) (Jeske et al. 2006) (Patwardhan et al. 2006)
PIP2	Binding the intracellular leaflet (site: 777–820)	(Senning et al. 2014) (Woo et al. 2008) (Chuang et al. 2001)
TRPA1	Physical interaction or iCa ²⁺ second messenger	(Akopian et al. 2007) (Patil et al. 2010)

Table 1: Endogenous and exogenous agonists involved in TRPV1 and activation, sensitization and inhibition.

^a transient receptor potential vanilloid 1; ^b arachidonic acid; ^c N-arachidonoyl-dopamine ; ^d N-oleoyl dopamine; ^e 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid; ^f 15-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid; ^g leukotrien B4; ^h diacylglycerol; ⁱ Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II; ^j phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; (iCa²⁺) intercellular Ca²⁺; ^k nerve growth factor; ^l prostaglandin E2; ^m adenosine triphosphate; ⁿ transient receptor potential ankyrin 1; ^o protein phosphatase 2B; ^p bradykinin B2 receptor; ^q G protein-coupled receptor; ^r receptor tyrosine kinase; ^s E prostanoid receptor; ^t protease-activated receptor-2 and 4; ^u 5-hydroxytryptamine receptor; ^v histamine receptors 1 and 4; ^w purinergic P2Y1 receptor; ^x protein kinase C.

2.2. TRPV1 sensitization/desensitization by endogenous modulators following intracellular pathway activation

2.2.1. Intracellular pathways of TRPV1 sensitization

The TRPV1 sensitization process is an intracellular mechanism that facilitates the gating of the channel or strengthens the currents evoked during the subsequent activation of TRPV1. The structure of TRPV1 was obtained by high-resolution cryo-electron microscopy (cryo-EM) and revealed multiple intracellular regulatory domains (Liao et al., 2013). Indeed, TRPV1 is a polymodal receptor whose sensitization and endogenous regulatory pathways act via phosphorylation sites for kinases such as protein kinases C and A (PKC and PKA) and Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase II (CAMKII). PKC phosphorylates and sensitizes TRPV1 at the S502 and S800 phosphorylation sites (Bhave et al., 2003; Numazaki et al., 2002). The PKA phosphorylation sites S116, T370, S502 and T144 appear to sensitize TRPV1 and prevent its desensitization upon the repeated application of capsaicin (Amadesi et al., 2006; Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003, 2005). Several studies have identified two specific phosphorylation sites for CAMKII on TRPV1 (S502 and T704) that modulate vanilloid binding. Thus, in human embryonic kidney-derived (HEK293) cells expressing $\Delta 774\text{--}838$ -deleted CaMKII phosphorylation sites (Woo et al., 2008) or S502A/T704I mutants of TRPV1, capsaicin does not evoke a current, which suggests that phosphorylation by CaMKII is required to control the responsiveness of TRPV1 to the ligand (Jung et al., 2004).

Phospholipase C (PLC) activity goes through the decrease of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) level and through the production of DAG (diacylglycerol), both of which are involved in TRPV1 sensitization. Indeed, the correlation between PIP2 and the intracellular sensitization of TRPV1 has been established; both bradykinin and NGF (known to stimulate PLC pathways after binding to their cognate receptors) potentiated TRPV1 activity in a heterologous expression system and in dorsal root ganglion (DRG) neurons (Chuang et al., 2001). The role of PIP2 as a TRPV1 inhibitor or "desensitizer" after its depletion by sequestration or PLC hydrolysis has been subsequently shown to be essential for TRPV1 sensitization (Prescott and Julius, 2003). In addition, the lack of a PIP2 binding site (786–828) increased the strong inward current evoked by a DAG analog and capsaicin in a

$\Delta 774$ –838 deletion mutant of TRPV1 (Woo et al., 2008). However, PIP2 could activate TRPV1 by binding the extracellular leaflet (777–820), while it has an inhibitor effect by binding the intracellular leaflet (682–725) (Senning et al., 2014; Ufret-Vincenty et al., 2015). Interestingly, in addition to its ability to directly activate TRPV1 via a PKC-independent pathway by binding to the capsaicin binding site at Y511; (Woo et al., 2008)), DAG could also contribute to the indirect sensitization of TRPV1 via PKC phosphorylation at the S502 and S801 sites (Burgess et al., 1989; Cesare et al., 1999; Chuang et al., 2001) (Bhave et al., 2003; Numazaki et al., 2002).

Finally, it might be noticed that the prolonged or repeated activation of TRPV1 induces a desensitization or inhibition process. It has been observed that the repeated activation of TRPV1 by chemical stimuli results in its desensitization by a Ca^{2+} -dependent process (Bhave et al., 2002; Chuang et al., 2001; Dai et al., 2004). Protein phosphatase 2B (calcineurin) acts as a desensitizer of TRPV1, as indicated by the inhibition of calcineurin by cyclosporine or CsA-CyP, which have been shown to inhibit the desensitization of TRPV1 induced by capsaicin (Docherty et al., 1996; Mohapatra and Nau, 2005). The cannabinoid WIN 55,212-2 seems to play an anti-inflammatory and analgesic role via the inhibition of TRPV1 by dephosphorylating the T144 and T370 sites in a Ca^{2+} /calcineurin-dependent manner, reducing the release of CGRP (Jeske et al., 2006; Patwardhan et al., 2006). These data show the potential effects of calcineurin inhibitors on TRPV1 desensitization and suggest cannabinoids as new therapeutic drugs for CNI, hyperalgesia, itching and pain.

2.2.2. Inflammatory mediators that use TRPV1 intracellular sensitization pathways

Following tissue damage, endogenously released inflammatory mediators (ATP, bradykinin, serotonin PGs, NGF, chemokines, histamine or proteases) can regulate TRPV1 activity via intracellular pathways associated with their specific GPCR. For example, in transfected HEK293 cells and DRG neurons, ATP increased capsaicin-induced TRPV1 activation via the purinergic receptor P2Y1, which potentiated TRPV1 activity in a PKC-dependent pathway (Numazaki et al., 2002; Tominaga et al., 2001). In the same way, in a Ca^{2+} - and PLC/PKC-dependent manner, bradykinin, serotonin (G protein-coupled 5-HT receptor), PGE_2 (G protein-coupled EP receptors) and NGF enhanced capsaicin-, heat-, proton- and anandamine-evoked currents (Sugiura et al., 2002; Vellani et al., 2001; Wilson et al., 2011; Zhang et al., 2008).

Similarly, the chemokine CCL3 was found to sensitize TRPV1 by increasing the heat-, anandamide- and capsaicin-evoked Ca^{2+} influx through a PLC- and PKC-pathway in HEK293 cells and DRG neurons (Zhang et al., 2005).

Finally, histamine enhanced the capsaicin-mediated inward current, increased the Ca^{2+} level and then induced itching via sensory neurons, and this effect was abolished by TRPV1 antagonists and in TRPV1-deficient mice (Shim et al., 2007). These mechanisms appeared to involve phospholipase A2 (PLA2)-, lipoxygenase (NDGA)- and PLC-dependent pathways, with the subsequent sensitization and activation of TRPV1 (Jian et al., 2016). These studies suggest that TRPV1 is involved in histamine-dependent itching with arachidonic acid metabolites, primarily 12-hydroxyeicosatetraenoic (12-HETE), acting as a central participant (Shim et al., 2007).

Because of their ability to cleave and thus activate specific PARs, endogenous proteases play a specific role in CNI. Both PAR-2 and PAR-4 are known to induce CNI and therefore to be involved in several skin disorders, such as pruritus and AD (Asfaha et al., 2007; Briot et al., 2009; Fu et al., 2014; Vellani et al., 2010). In addition to their ability to induce CNI via the release of SP and CGRP, it has clearly been established that PAR-2 and PAR-4 activation could lead to TRPV1 sensitization. Patch clamp and Ca^{2+} imaging assays in HEK293 cells that co-express TRPV1 and PAR-2 and DRG neurons revealed that PAR-2 activation potentiates TRPV1 via phosphorylation by PKC- and PKA-dependent pathways (Amadesi et al., 2004, 2006; Dai et al., 2004). As a consequence, TRPV1 sensitization by a PAR-2 agonist reduced the temperature threshold for TRPV1 from 42°C to 33°C, leading to thermal hyperalgesia, pain and inflammation (Amadesi et al., 2006, 2006; Dai et al., 2004). In addition, PAR-2 agonists potentiated the capsaicin-evoked CGRP and SP release from sensory neurons and thus enhanced CNI and hyperalgesia (Amadesi et al., 2004; Hoogerwerf et al., 2001). On the other hand, the involvement of PAR-4 activation in TRPV1 sensitization has been poorly studied. One study demonstrated that PAR-4 activation potentiated TRPV1 activation via a PKC-dependent pathway (Patricio et al., 2015; Vellani et al., 2010).

Altogether, mediators released in inflamed skin could contribute to peripheral sensitization, especially via TRPV1 sensitization, thus facilitating pain and itching.

TRPV1 activation and/or sensitization can enhance peripheral inflammatory responses via the expression and release of other inflammatory mediators.

2.3. Pro-inflammatory responses induced by TRPV1 activation

In addition to the clearly established role of TRPV1 in the release of neuropeptides from sensory neurons, its ability to increase the expression of inflammatory genes potentially involved in CNI, such as those for inflammatory cytokines, PGs and MMPs, has been shown in a few studies. The activation of TRPV1 by protons led to up-regulation of the expression of CGRP via CaMKII and CREB activation in DRG neurons. In addition, the proton-mediated induction of inflammatory pain and CGRP expression in DRG neurons was inhibited in TRPV1-deficient mice (Nakanishi et al., 2010). Another study showed that TRPV1 activation by capsaicin induced the PKC pathway-mediated up-regulation of TRPV1 and CGRP expression in acute CNI and increased PAR-4 mRNA and protein levels via a cAMP/PKA signaling pathway in cultured primary DRG neurons (Chen et al., 2013). Thus, it appears that a narrow interactive relationship between PAR-4 and TRPV1 exists in the development of NCI or in nociception from primary afferent neurons (Chen et al., 2013; Gouin et al., 2015b; Russell et al., 2010; Vellani et al., 2010). In addition to neuropeptide release, TRPV1-mediated Ca^{2+} influx in the skin could induce the expression or the release of other pro-inflammatory mediators and affect skin immune cells, contributing to the self-maintenance of CNI and/or cutaneous chronic inflammation.

In addition to TRPV1 activation in the sensory nerves, TRPV1 activation in human epidermal keratinocytes by capsaicin, acidification or ultraviolet (UV) radiation evoked an increase in the iCa^{2+} concentration (Inoue et al., 2002; Lee et al., 2009). In fact, several studies have shown that the exposure of keratinocytes to capsaicin or UV radiation leads to TRPV1-mediated Ca^{2+} influx, followed by the increased expression of cyclo-oxygenase (COX)-2, inflammatory mediators (e.g., interleukin (IL)-1 β , 2, 4, and 8, tumor necrosis factor (TNF)- α , PGE2, and LTB4, as well as several MMPs, including MMP-13, 9, 3, and 2) (Inoue et al., 2002; Jain et al., 2011; Lee et al., 2009, 2011; Southall et al., 2003). In an epithelial airway cell line, TRPV1 activation by capsaicin evoked the expression and release of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) via Ca^{2+} elevation and calcineurin-mediated NFAT activity (Jia et al., 2014). For keratinocytes, no relation between TSLP secretion and TRPV1-

mediated Ca^{2+} influx has been demonstrated, and this association needs to be investigated. Altogether, these mediators released by keratinocytes cause erythema, pain and a UV-induced skin response and thickening (Jain et al., 2011; Lee et al., 2009, 2011). Moreover, they are known to sensitize TRPV1 in nociceptive neurons, with subsequent CGRP release and CNI (Binshtok et al., 2008; Hwang et al., 2000; Oprée and Kress, 2000).

Immune cells present in the skin, such as mononuclear cells, dendritic cells (DCs) and mast cells, also express TRPV1, and TRPV1 activation directly affects the function of these cells (Saunders et al., 2009; Basu and Srivastava, 2005; Ständer et al., 2004). Indeed, activation of TRPV1 in mononuclear cells induced cell death, and this response was reversed by a TRPV1 antagonist (Saunders et al., 2009). Capsaicin promotes DC maturation, which is abrogated in TRPV1 $-/-$ DC cells. In an *in vivo* mouse model, injected capsaicin mediated the maturation and migration of skin DCs to the draining lymph nodes in TRPV1 $+/+$ but not in TRPV1 $-/-$ mice, confirming an important role for this channel in the innate immunity process (Basu and Srivastava, 2005). Nevertheless, the potential inflammatory role of TRPV1 in DCs remains controversial, as evidenced by another study that did not find TRPV1 expression in DCs or the induction of calcium elevation by capsaicin. However, the neuropeptide SP activated DCs by eliciting robust Ca^{2+} elevation, suggesting that DC maturation and migration are dependent on CNI. Taken together, the potential inflammatory role of TRPV1 in DCs remains unclear and needs to be investigated. The involvement of mast cell degranulation during CNI in response to capsaicin is a related process that occurs indirectly via the release of peptide transmitters from sensory neurons (Bunker et al., 1991; Frydas et al., 2013). Nonetheless, TRPV1 activation by capsaicin has evoked Ca^{2+} elevation in numerous mast cell lines. Capsaicin-elicited Ca^{2+} did not induce mast cell degranulation but triggered the release of IL-4 (Bíró et al., 1998), which is known to be involved in AD associated with the recruitment of neutrophils, macrophages, CD3 $+$ lymphocytes, and epidermal dendritic T lymphocytes (Zhao et al., 2016).

TRPV1 is also expressed in endothelial cells and smooth muscle cells, and its activation induces vasorelaxation by releasing nitric oxide (NO) by a Ca^{2+} influx-dependent mechanism (Ching et al., 2011; Himi et al., 2012; Yang et al., 2010a). Endothelium-dependent vasodilatation is in turn dependent on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and TRPV1, as evidenced by the inhibition of capsaicin-evoked dilatation by an eNOS inhibitor (L-NAME) and a TRPV1 antagonist (capsazepine). These results confirmed that endothelial TRPV1 can induce vasodilatation via NO production (Kark et al., 2008; Yang et al., 2010a). In addition to NO production, thermal endothelial-TRPV1 activation stimulated the endothelial cell-derived release of CGRP from endothelial cell lines, which contributed to the attenuation of endothelial cell damage (Luo et al., 2008; Ye et al., 2007). The CGRP receptor expressed on endothelial cells has been shown to have anti-inflammatory effects by inhibiting the production of the chemokines CXCL1, CCL2 and IL-8 (Huang et al., 2011). Taken together, these results indicate that endothelial TRPV1 acts as an anti-inflammatory factor both directly by inducing vasodilation *via* NO production and indirectly by inhibiting leukocyte recruitment *via* CGRP production. In summary, TRPV1 activation mediates a narrow communication between sensory nerve endings, skin non-immune and immune cells, increasing release of inflammatory mediators (mainly cytokines and neuropeptides). These mediators act directly via specific receptors on neighboring cells, inducing the intracellular sensitization of TRPV1 and its activation. Hence, TRPV1 should be considered a central modulator of the self-maintenance of CNI.

3. TRPA1

3.1. *Another cationic channel with multiple direct roles in neurogenic inflammatory dermatitis and pruritus*

TRPA1 is also a nociceptive cationic (mainly Ca^{2+}) thermo-responsive channel that, in contrast to TRPV1, is implicated in cold thermal sensation (i.e., temperatures below 17°C). Besides cold stimuli, a variety of exogenous and endogenous activators or sensitizers of TRPA1 have been identified (Table 2).

Factors	Pathways of activation	References
Exogenous activators of TRPA1^a:		
Cold temperature (<17°C)	Direct activation : -Inward current -iCa ²⁺ elevation -Neuropeptides releases -Inflammatory mediators release	(Bíró and Kovács 2009)
Mustard oil compounds: -AITC ^b -Benzyl isothiocyanate -Phenylethyl isothiocyanate -Isopropyl isothiocyanate -Methyl isothiocyanate Cinnamon compounds: -Cinnamaldehyde Garlic compounds: -Allicin Clove bud oil compounds: -Eugenol THC ^c		(Calixto et al. 2005) (Macpherson et al. 2005) (Chung et al. 2014)
Environmental pollutants: -Acrolein -Formalein		(Bautista et al. 2006) (McNamara et al. 2007)
TRPM8 ^d activators: -Icilin -Menthol		(Story et al. 2003)
Histamine-independent pruritogens: -Chloroquine -BAM8-22 ^e -AEW ^f		(Imamachi et al. 2009) (Mishra and Hoon 2010) (Mishra et al. 2011) (Wilson et al. 2011, 2013a,b)
Endogenous activators of TRPA1:		
ROS ^g NO ^h Lipid oxidation-derived: -PGA2 ⁱ -15dPGJ2 ^j -Δ12-PGJ2 ^k	Direct activation : -Inward current -iCa ²⁺ elevation -Neuropeptides releases -Inflammatory mediators release	(Pertovaara and Koivisto 2011) (Bautista et al. 2006)
Lipid oxidation products: -4-HNE ^l -4-ONE ^m		(Taylor-Clark et al. 2009) (Engel et al. 2011)
DAG ⁿ		(Trevisani et al. 2007) (Bandell et al. 2004) (Jordt et al. 2004)
Indirect activators/sensitizers of TRPA1:		
Bradykinin	BK2R ^l (GPCR ^u)	(Bandell et al. 2004) (Wang et al. 2008a)
Growth factors (e.g. NGF ^o and BDNF ^p)	RTK ^v	(Malin et al. 2011)
Proteases	PAR-2 and PAR-4 ^w (GPCR)	(Dai et al. 2007) (Patricio et al. 2015)
Low iCa ²⁺ concentration	EF-hand Ca ²⁺ -binding domain	(Sura et al. 2012) (Akopian et al. 2007)
Cytokines (e.g. TSLP ^q)	TSLP receptor (RTK)	(Wilson et al. 2013a,b)
TRPV1 ^r	Physical interaction or Ca ²⁺ second messenger	(Honda et al. 2014)
Inhibitors/desensitizers of TRPA1:		
High iCa ²⁺ concentration	EF-hand Ca ²⁺ -binding domain	(Sura et al. 2012) (Wang et al. 2008b)
PIP2 ^s	Direct binding to TRPA1	(Karashima et al. 2008) (Kim et al. 2008)
TRPV1	Physical interaction or Ca ²⁺ second messenger	(Akopian et al. 2007) (Staruschenko et al. 2010) (Salas et al. 2009)

Table 2: Endogenous and exogenous agonists involved in TRPA1 activation, sensitization and inhibition.

^a transient receptor potential ankyrin 1; ^b allyl isothiocyanate; ^c tetrahydrocannabinol; ^d transient receptor potential melastatin 8; ^e bovine adrenal medulla 8-22; ^f acetone, ether and water; ^g reactive oxygen species; ^h nitric oxide; ⁱ prostaglandin A2; ^j 15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2; ^k Δ12-prostaglandin J2; ^l 4-hydroxynonenal; ^m 4-oxo-2-nonenal; ⁿ diacylglycerol; ^o nerve growth factor; ^p brain-derived neurotrophic factor; ^q thymic stromal lymphopoietin; ^r transient receptor potential vanilloide 1; ^s phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; ^t bradykinin B2 receptor; ^u G protein-coupled receptor; ^v receptor tyrosine kinase; ^w protease-activated receptor-2 and 4.

The presumption that TRPA1 is involved in CNI is growing. Indeed, TRPA1 has been found to be co-expressed with TRPV1 and neuropeptides (SP and CGRP) in a subset of nociceptive sensory neurons (Vellani et al., 2010; Story et al., 2003). Low temperature has been demonstrated to activate sensory nerves and induce neurogenic inflammation (Story et al. 2003; Obata et al. 2005). Indeed, TRPA1 activation stimulated (or increased) neuropeptide (SP and CGRP) release from sensory neurons in a Ca^{2+} -dependent manner, with subsequent signs of CNI, such as edema and leukocyte infiltration (Story et al., 2003; Meseguer et al., 2014; Trevisani et al., 2007; Thorne et al., 1991; Silva et al., 2011). In addition, a specific TRPA1 antagonist attenuated the capsaicin (a TRPV1 agonist)-evoked increase of cutaneous blood flow adjacent to an injury site in the plantar skin of rats, strongly suggesting that both TRP channels could cooperate in CNI induction (Wei et al., 2010).

TRPA1 is required for AD and histamine-independent chronic itching. Indeed, in acute oxazolone-induced dermatitis in mouse ears, TRPA1-deficient mice or WT mice treated with the TRPA1 antagonist HC-030031 showed diminished skin inflammation, which was associated with a decrease in ear epidermal thickness, eosin-positive cells, and CD4+ and CD8+ T cells in the ear tissue. TRPA1-deficient mice also diminished SP- and oxazolone-evoked scratching behavior and AD responses, as revealed by a decrease of dermatitis score, including erythema, scaring, excoriation and swelling (Liu et al., 2013). Histamine-independent pruritus evoked by the TRPA1 agonists chloroquine, BAM8–22 or AEW was abrogated in neurons from TRPA1-deficient mice, impairing the scratching behavior response and increasing epidermal thickness (Wilson et al., 2011, 2013b). In addition, the inflammatory cytokine TSLP is highly expressed in skin epithelial cells from AD patients and induces (or enhances) skin inflammation via T cells, DCs and mast cell activation (Moniaga et al., 2013; Ziegler et al., 2013). Within the skin, TSLP also activates sensory neurons via TSLPR, and, subsequently, TRPA1 stimulation via a PLC-mediated pathway, thereby evoking robust itching in mice (Wilson et al., 2013a). To date, there is no evidence that TSLP and TRPA1 can induce CNI by releasing neuropeptides. Similar to TRPV1, TRPA1 is also under the control of an intracellular sensitization process involving several inflammatory mediators, such as growth factors, bradykinins, proteases and cytokines. By its localization in neuronal

and non-neuronal skin cells, TRPA1 potentiates neurogenic skin inflammation by enhancing cellular responses (Inoue et al., 2002; Bautista et al., 2013).

3.2. TRPA1 sensitization/desensitization by endogenous modulators following intracellular pathway activation

In a manner similar to that of TRPV1, TRPA1 activity is controlled by desensitization and sensitization processes. The repeated activation of TRPA1 by chemical stimuli results in the Ca^{2+} - and current-dependent desensitization of TRPA1 (Malin et al., 2011; Story et al., 2003; Wilson and Bautista, 2014). TRPA1 is a polymodal receptor with multiple intracellular ligand binding and phosphorylation sites that are involved in the activation and sensitization of this channel, respectively. Unlike most TRP channels, TRPA1 covalently interacts with many of its agonists through its N-terminal region, which contains cysteine and lysine residues involved in its direct activation (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). Direct mechanisms of TRPA1 activation have been described, although the precise mechanisms of sensitization/desensitization by which the inflammatory mediators potentiate the channel activity remain poorly understood, and no detailed structural data on which to base a working model presently exist. Recent data, using cryo-EM, provided for the first time the structure of TRPA1 and shown several similarities with TRPV1 (Paulsen et al. 2015). It is appeared that the NH2-terminal of TRPA1 has approximately 15 ankyrin repeats with several cysteine and lysine residues crucial for activation by reactive agonists (Hinman et al. 2006; Macpherson et al. 2007). A EF-hand domain implicated in calcium-dependent gating was also found in its NH2 region (Zurborg et al. 2007; Doerner et al. 2007). Other specific domain have also been described such as a PIP2 binding site as well as CAMKII and PKC phosphorylation site (Choi et al. 2014). The transmembrane domain S6 are essential for gating by antagonists and agonists (Chen et al. 2008).

3.2.1. iCa^{2+} potentiates TRPA1 activation

Growing evidence suggests that Ca^{2+} regulates TRPA1 by potentializing and inactivating its activity at low and high intracellular concentrations, respectively (Doerner et al., 2007; Jordt et al., 2004). On the one hand, Ca^{2+} potentiated cinnamaldehyde-, AITC- and carvacrol-evoked currents in HEK293 cells expressing

TRPA1. In addition, an increase in iCa^{2+} also seems to directly act on the activation of TRPA1 by eliciting a current in a PLC-independent manner and serves as a co-agonist with icilin that directly interacts with TRPA1 (Doerner et al., 2007; Wang et al., 2008b; Zurborg et al., 2007). On the other hand, Ca^{2+} could also inactivate TRPA1. Indeed, even though high extracellular Ca^{2+} concentrations could enhance a cinnamaldehyde-evoked current, they could also induce rapid inactivation, which has not been found at low extracellular Ca^{2+} concentrations (Wang et al., 2008b). Hence, Ca^{2+} appears to be a crucial factor for the regulation of TRPA1 activity, suggesting that other TRP channels and GPCRs could modulate TRPA1 activity by mobilizing iCa^{2+} .

3.2.2. Intracellular sensitizers of TRPA1

Several studies suggest that TRP channels may be potentiated by endogenous DAG and IP₃, the products of PIP₂ breakdown, by Ca^{2+} release from internal stores, by PKC activation or by the formation of endogenous lipid oxidation-derived and products in sensory neurons (Mizumura et al., 2009; Wang et al., 2008a). TRPA1-expressing CHO cells were also sensitive to DAG, arachidonic acid and iCa^{2+} (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004). PIP₂ has an inhibitory effect not only on TRPV1 activity (refer to section 2.2.1) but also on TRPA1 activity, since PIP₂ has been shown to inhibit AITC- and mustard oil-evoked currents (Karashima et al., 2008; Kim et al., 2008). Moreover, the reduction of the PIP₂ level at the membrane by polyphosphatase (e.g., PPi), PIP₂ antibody or phenylarsine oxide enhanced the AITC- and mustard oil-evoked currents via TRPA1 sensitization (Karashima et al., 2008; Kim et al., 2008). Taken together, these data suggest that TRPA1 activity could be sensitized by the activation of numerous GPCRs or receptor tyrosine kinases (RTKs) via the cAMP/PKA and PLC/PKC pathways following Ca^{2+} elevation (Andersson et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2008, 2009)

3.2.3. TRPA1 sensitization by inflammatory mediators

Several inflammatory mediators, such as growth factors, bradykinins, proteases, and, more recently, the inflammatory cytokine TSLP, have been found to act indirectly on TRPA1 activity and expression through specific receptor-dependent signaling pathways (Dai et al., 2007; Diogenes et al., 2007; Malin et al., 2011; Wang

et al., 2008a). It has now been clearly established that TRPA1 in sensory neurons mediates the CNI responses to bradykinin (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Jordt et al., 2004; Wang et al., 2008a), NGF and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Malin et al., 2011) by potentiating the activity of the channel and impairing its desensitization after repeated activation. In addition, NGF has been found to up-regulate the expression of TRPA1 mRNA via p38 MAPK activation in trigeminal ganglia and sensory neurons. Taken together, these mediators enhance the activity and prevent the desensitization of TRPA1 and consequently facilitate pain, hyperalgesia and allodynia (Diogenes et al., 2007; Obata et al., 2005). TSLP released from keratinocytes potentiated TRPA1 activity by binding to its specific receptor (TSLPR) on sensory neurons in the skin of AD patients and in mouse models of AD. While TSLP-evoked sensory neuron activation and consequent chronic itching in AD has been established, the role of TSLP-triggered neuropeptide release in neurons and the subsequent CNI remain an open question (Wilson et al., 2013a, 2013b).

While the involvement of endogenous proteases in TRPV1 sensitization via PAR-2 and PAR-4 activation is well established (refer to section 2.2.2), the implication of these proteases in TRPA1 sensitization remains poorly understood. PAR2 activation has been demonstrated to enhance TRPA1 agonist-evoked pain behavior in rats via PLC activation and subsequent PIP_2 hydrolysis (Dai et al., 2007). In addition, PAR-2-evoked mechanical and cold allodynia, as well as heat hyperalgesia, was found to be dependent on the PKA and PKC signaling pathways, which sensitize TRPA1 (Chen et al., 2011). The involvement of PAR-4 in the sensitization of TRPA1 is poorly studied, but a recent finding demonstrated its potential role in pruritus: the dorsal intradermal administration of the PAR-4 agonist peptide AYPGKF-NH₂ elicited intense scratching behavior via a SP release in mice, which was abolished by the TRPV1 and TRPA1 antagonists SB366791 and HC-030031, respectively (Patricio et al., 2015), but not in TRPA1-deficient mice. An opposite pattern in PAR-4-evoked itching via TRPA1 by compensatory mechanisms in TRPA1-deficient mice has been hypothesized (Patricio et al., 2015) (Petrus et al., 2007)). Consequently, PAR-4 activation could sensitize TRPA1 in collaboration with TRPV1 and elicit itching behavior *via* the release of neuropeptides from sensory neurons; however, some points still require clarification, mainly the intracellular pathways underlying the

TRPV1/TRPA1 sensitization via PAR-4 activation (Patricio et al., 2015). Finally, the intracellular pathways for many inflammatory mediators could sensitize TRPA1 in injured skin, contributing to channel activity and impairing the TRPA1 desensitization, thereby enhancing peripheral inflammatory responses via the production of other inflammatory mediators.

3.3. A pro-inflammatory response induced by TRPA1 activation

In addition to its ability to induce the release of neuropeptides from sensory neurons, TRPA1 seems to play an important role in the modulation of numerous genes that could amplify the cutaneous inflammatory process. The involvement of TRPA1 in the regulation of 1843 (2423 probe sets) genes in whole trigeminal ganglia isolated from AEW-treated mice has been established (Wilson et al., 2013b). In this model, TRPA1 activation by AEW highly up- or down-regulated the expression of several cytokines, plasmatic receptors, and ion channels and affected growth regulation, intracellular pathways and immune cell specificity proteins. For example, AEW up-regulated the inflammatory bradykinin receptor (BK2R) by 2-fold and up-regulated several itch receptors such as MRGPR and PAR-2 in the trigeminal ganglia neurons (Wilson et al., 2013b). These three receptors sensitize and open TRPA1. Thus, the up-regulation of itch and inflammatory receptors in sensory neurons strongly indicates a role for TRPA1 in chronic pruritus and CNl via the enhancement of sensory neuron sensitivity to itch and inflammatory mediators.

Growing evidence indicates that TRPA1 acts as an inflammatory regulator. The results of recent studies correlated the activation of TRPA1 with expressional changes in the skin, as associated with cutaneous inflammation, AD and pain that is blocked in TRPA1-deficient mice. Indeed, TRPA1 activation by oxazolone induced chronic dermatitis in mouse ears and concomitant up-regulation of inflammatory cytokines (i.e., IL-1 β , 4, and 6 and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL-2)), neuropeptides (i.e., SP and endothelin (ET-1)), nerve growth factor (NGF) and neurotransmitters (i.e., serotonin) known to induce AD, pruritus and pain and increase nerve fiber density (Liu et al., 2013). Additional studies established the expressional change of 9340 genes linked to itching associated with TRPA1 in skin biopsies from AEW-treated mice, showing that TRPA1 up-regulated the expression of 79 % of itch-related genes known to be involved in the initiation and maintenance

of chronic itching as well as pruriginous skin disorders (e.g., the IL-31 receptor (IL-31RA), aquaporin 3 and IL-33 (Wilson et al., 2013b; Nakahigashi et al., 2011; Nobbe et al., 2012; Olsson et al., 2006; Sonkoly et al., 2006). In these studies, the expressional changes induced by oxazolone or AEW were abrogated in the TRPA1^{-/-} mice and in WT mice treated with TRPA1 antagonists (Liu et al., 2013; Wilson et al., 2013b). These data strongly suggest the involvement of TRPA1 in pruritus.

TRPA1 is also expressed in the basal keratinocytes, where it acts as a pain, thermal and chemical sensor (Atoyan et al., 2009). TRPA1 was found to modulate inflammatory gene expression in keratinocytes by increasing the expression of IL-1 α and β (Atoyan et al., 2009) and cause the secretion of PgE2 (Jain et al., 2011). Both IL-1 and PgE2 are known to be involved in skin inflammation and itching by decreasing the mechanical threshold and the thermal responsiveness of the sensory nerve endings, which could facilitate CNI (Binshtok et al., 2008). In addition, in keratinocytes, TRPA1 activation increases heat shock protein (HSP) 27, which is known to up-regulate the expression of inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the skin during murine allergic contact hypersensitivity (Atoyan et al., 2009; Yusuf et al., 2009). Altogether, these findings indicate that TRPA1 activation contributes to the production of several cytokines from keratinocytes that directly trigger or enhance CNI by acting on neighboring target cells.

In addition to keratinocytes, TRPA1 acts on skin immune cells, but it appears to have an anti-inflammatory role in monocytes/macrophages. The TRPA1 activators cinnamaldehyde and carvacol have been found to inhibit bacterial lipopolysaccharides (LPS)-induced nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-mediated promoter activity and reduce the expression of iNOS, COX2 and TNF- α and subsequent NO production in macrophages (Chao et al., 2008; Romano et al., 2013). Similarly, cinnamaldehyde inhibited bacterial LPS- and lipoteichoic acid (LTA)-mediated IL-1 β , IL-6 and TNF- α release in murine macrophages and human blood monocytes, presumably through ROS production (Chao et al., 2008; Hsu and Wen, 2002; Romano et al., 2013). Furthermore, an increase in TNF- α as well as the induction of both nitric oxide synthases (iNOS) and COX2, which are involved in the formation of NO and PGE2, respectively, are known to act in the pathogenesis of several inflammatory skin diseases, such as AD, psoriasis and pruritus (Ahn et al.,

2016; Kim et al., 2015; Ormerod et al., 1998; Ostadhadi et al., 2015; Sereflican et al., 2016). It would therefore appear that TRPA1 acts as an anti-inflammatory actor in monocytes and macrophages, but these data are controversial (Billeter et al., 2015). The activation of TRPA1 by cinnamaldehyde acts on adaptive immunity by suppressing lymphoproliferation and promoting T-cell maturation, as revealed by T-cell differentiation from CD4 and CD8 double-positive cells to CD4 or CD8 single-positive cells in LPS-treated mouse splenocytes (Koh et al., 1998). These results imply that TRPA1 could enhance inflammation and immunoreactivity by directly acting on lymphocyte differentiation.

TRPA1 activation by AITC has been found to trigger vasodilatation in rat cerebral arteries in an endothelium-dependent mechanism. TRPA1-mediated vasodilation triggers Ca^{2+} influx in rat endothelial arteries through Ca^{2+} -activated potassium channels in endothelial cells and inwardly rectifying potassium channels in arterial myocytes (Earley et al., 2009; Qian et al., 2013). This mechanism suggests that this channel could also act in edema and vasodilatation during CNl, but this hypothesis must be verified. However, another study established that TRPA1 activation by cinnamaldehyde played an anti-inflammatory role by suppressing the attachment of leukocytes to endothelial cells (Liao et al., 2008).

To conclude, TRPA1 activation and sensitization mediate skin inflammation by increasing the release of inflammatory mediators, although their role in immune cells remains to be clarified. In turn, secreted factors mediate the intracellular sensitization of TRPA1, thus facilitating its activation, which in turn contributes to enhancement of the self-maintenance of CNl.

4. Cross-regulation between TRPV1 and TRPA1

In addition to co-expression in a subset of sensory nerves and non-neuronal cells (keratinocytes), a functional interaction between TRPA1 and TRPV1 (cross-sensitization/desensitization) has been established, which suggests the cooperation between these channels to promote inflammatory thermal hyperalgesia, CNl and pain (Akopian et al., 2007; Anand et al., 2008; Aubdool and Brain, 2011; Bautista et al., 2006; Fischer et al., 2014; Patil et al., 2010; Spahn et al., 2014).

This cross-communication between TRPA1 and TRPV1 appears to involve the concentration of cytosolic Ca^{2+} , one of the main sensitizers/desensitizers of TRPA1 and TRPV1 (Doerner et al., 2007; Jordt et al., 2004; Jung et al., 2004; Woo et al., 2008). It has been shown that capsaicin- and mustard oil-evoked currents desensitized each other via iCa^{2+} elevation in TRPV1- and/or TRPA1-expressing CHO cells (Akopian et al., 2007). Another relevant study confirmed the role of the influx of Ca^{2+} via TRPV1 as a second messenger for the desensitization of TRPA1. Indeed, TRPA1 evoked a current in CHO cells expressing TRPA1, and this current was inhibited by the co-expression of TRPV1 (Patil et al., 2010). In addition, TRPA1 and TRPV1 were found to interact by forming a physical and functional complex at the plasma membrane, as revealed by co-IP and FRET assays in TRPA1- and TRPV1-co-expressing CHO cells, as well as in sensory neurons (Akopian et al., 2007; Fischer et al., 2014; Salas et al., 2009; Staruschenko et al., 2010). In these cells, TRPV1 regulated the desensitization of TRPA1, which appeared to be independent of iCa^{2+} (Staruschenko et al., 2010).

On the other hand, evidence has established that the TRPV1 and TRPA1 channels also sensitize each other in a Ca^{2+} -dependent signaling pathway. Indeed, bradykinin and facial capsaicin injections sensitized TRPA1 via TRPV1 in a Ca^{2+} -dependent manner in cultured trigeminal neurons from mice and rats, leading to inflammatory cold hyperalgesia (Bautista et al., 2006; Honda et al., 2014). The opposite pattern was also found: TRPA1 could sensitize TRPV1 to AITC-, cinnamaldehyde- and mustard oil-enhanced heat- and capsaicin-evoked currents and Ca^{2+} elevation in a Ca^{2+} -, cAMP/PKA-, and TRPV1 phosphorylation-dependent manner in sensory neurons and in HEK293 cells co-expressing TRPV1 and TRPA1 (Alpizar et al., 2013; Anand et al., 2008; Spahn et al., 2014).

Altogether, the TRPV1-TRPA1 interaction and cross-communication via the iCa^{2+} concentration could inhibit or enhance the ability to a large variety of exogenous and endogenous activators to cause Ca^{2+} elevation, neuropeptide release and, consequently, CNI.

5. Conclusions and future directions

The TRPV1 and TRPA1 channels are at the core of the inflammatory process that occurs in various cutaneous neurogenic disorders that are pruritic diseases, such as psoriasis, AD, and Netherton syndrome. It is now clear that both TRP channels act far beyond the sensory nerves by potentiating the pathology of numerous skin disorders in non-neuronal skin cells, such as keratinocytes, mast cells, dendritic cells and blood vessels (Figure 1). We still have a great deal to learn about these channels, notably about the change of gene expression in sensory neurons and non-neuronal skin cells, especially in relation to their role in the induction and self-maintenance of CNI (*in vitro* and *in vivo*). A great deal of knowledge about their interaction, their cross-sensitization and their sensitization by inflammatory mediators awaits discovery, especially in relation to the potentiation and the chronicization of skin disorders associated with CNI. Although the molecular mechanisms of TRPV1 and TRPA1 sensitization induced during CNI and itching are still poorly understood, their clinical relevance in pruritus, inflammatory thermal hyperalgesia and pain are indisputable. Targeting one or more of the intracellular signaling pathways of TRP channel sensitization may allow new opportunities for the treatment of skin disorders associated with CNI. Further studies are necessary to test the potential effects of treatment with protein signaling inhibitors in neurogenic inflamed skin. A new and interesting approach could also be to focus on the effect of the iCa^{2+} concentration to mediate TRP desensitization and thus block the self-maintenance of CNI.

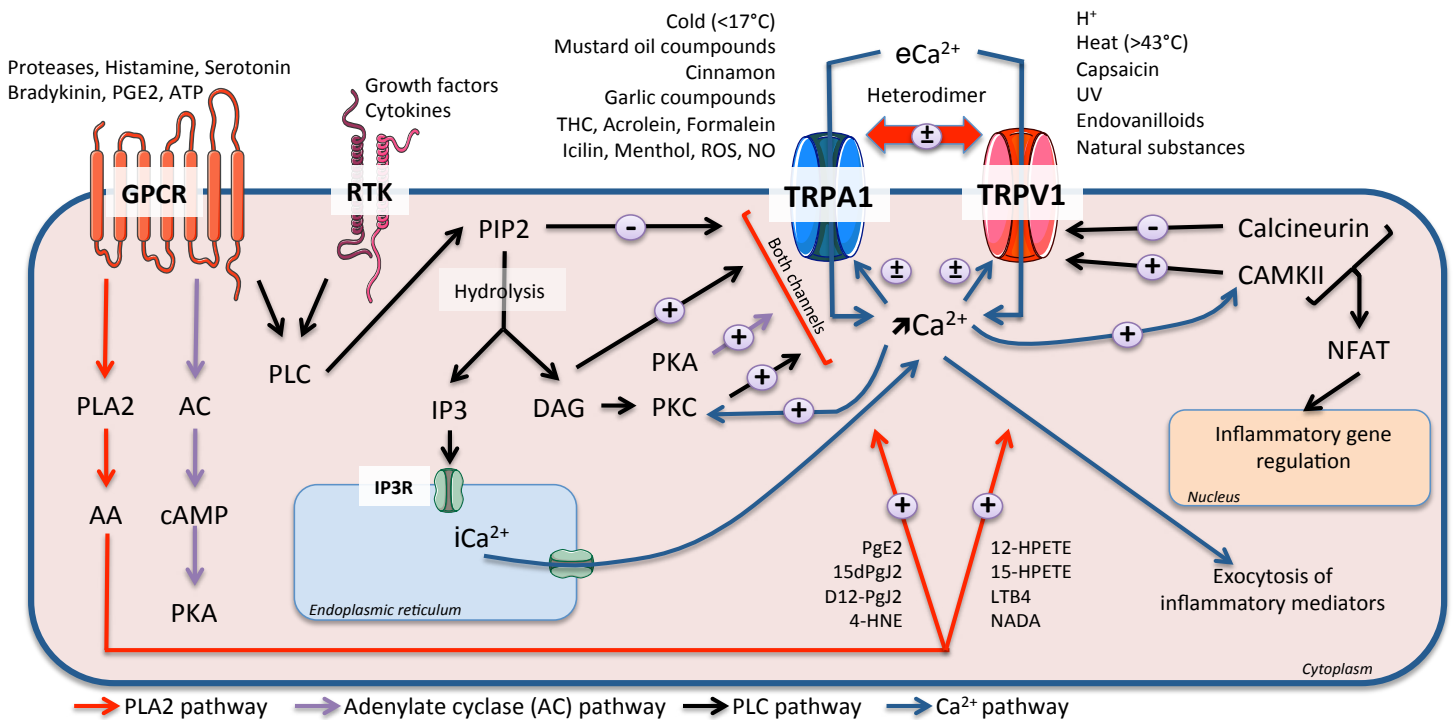


Figure 1: Common intracellular GPCR, RTK and Ca^{2+} pathways regulate via the activation and sensitization of TRPV1 and TRPA1.

The G protein-coupled receptor (GPCR) and receptor tyrosine kinase (RTK) activation stimulate phospholipase C (PLC), which leads to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) hydrolysis and the consequent release of the transient receptor potential (TRP) channels from its inhibitory control, triggering the formation of 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) as well as the influx of Ca^{2+} via TRP vanilloid 1 and ankyrin 1 (TRPV1 and TRPA1). Then, DAG can directly activate both TRP channels, and protein kinase C (PKC) activation by DAG enhances TRP activity, sensitizing both channels. IP3 formation promotes Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum and increases the iCa^{2+} concentration. GPCRs can also activate the phospholipase A2 (PLA2) and adenylate cyclase pathways, which lead to protein kinase A (PKA) stimulation and the formation of arachidonic acid (AA) metabolites and products. PKA acts directly sensitize the TRP channels, while AA metabolites and products directly activate the TRP channels. Both TRPV1 and TRPV1 can directly or indirectly regulate the activity of the other by direct interaction or via the iCa^{2+} concentration, resulting in a cross-sensitization/desensitization process. The elevation of iCa^{2+} triggers the exocytosis of inflammatory mediators and stimulates both Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CAMKII) and calcineurin, which sensitize and desensitize TRPV1, respectively. Both kinases are also involved in the regulation of inflammatory genes via nuclear factor of activated T-cell (NFAT) translocation to the nucleus.

C. Dermatoses associées à l'INC et traitements

1. Dermatoses prurigineuses associées à l'INC et aux récepteurs PARs

L'INC joue un rôle dans plusieurs maladies dermatologiques comme le psoriasis, la DA ou encore le SN.

- **Le psoriasis** est une maladie cutanée inflammatoire chronique dont la prévalence est de 2 à 3% en Europe, sans distinction de sexe. Il se caractérise par un renouvellement anormalement rapide des kératinocytes conduisant à une hyperkératose associée à une augmentation anormale de la couche cornée de l'épiderme et aux caractéristiques cliniques du psoriasis. Ces signes cliniques se manifestent par des plaques rougeâtres épaisses, plus ou moins étendues, recouvertes de squames. Ces lésions se situent le plus souvent au niveau des mains, des coudes, des genoux, du bas du dos, ou sur le visage et le cuir chevelu (Lee et al., 2014; Lowes et al., 2014; Scott et al., 2012). L'origine de cette maladie est multifactorielle, avec trois grands types de facteurs à l'origine des poussées : génétiques, immunitaires et environnementaux (Kempkes et al., 2014). Actuellement, PAR-2 est l'une des principales cibles dans les pathologies cutanées associées à un prurit. Alors que son rôle a clairement été identifié dans d'autres pathologies cutanées inflammatoires, son implication dans le psoriasis n'est pas encore établie et reste à démontrer (Gouin et al., 2015a; Kempkes et al., 2014; Steinhoff et al., 2000, 2003a, 2003b). D'un point de vue biochimique, une dérégulation de l'expression de certaines jonctions communicantes telles qu'une diminution de l'expression de la connexine 43 (Cx43) et une augmentation de l'expression de Cx26 ont été démontrées dans l'épiderme de patients souffrants de psoriasis (Martin et al., 2014; Scott et al., 2012). Ces variations d'expression aboutissent à une hyper-prolifération des kératinocytes associée à la formation de lésions psoriasiques dues à la perte de la granuleuse. Cette dérégulation d'expression des connexines pourrait servir de modèle pour l'étude de l'implication de PAR-2 dans le psoriasis.

- **La DA** est une pathologie inflammatoire touchant préférentiellement les enfants avec une incidence de 10 à 20%, et dans une moindre mesure les adultes avec une incidence de 2 à 5%. Chez le nourrisson, les lésions sont localisées sur les convexités des joues, les membres et le cuir chevelu alors que chez l'enfant plus âgé et l'adulte, les lésions siègent essentiellement sur les plis de flexion des membres. La nature des lésions se caractérise le plus souvent par une xérose (sécheresse cutanée importante) ou par des lésions inflammatoires de type éruption érythémateuse, papuleuse, vésiculeuse et squameuse (Mollanazar et al., 2015; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013) et un prurit évoluant par poussées récidivantes, entrecoupées d'accalmies (Misery, 2011). Des facteurs aggravants tels que des produits irritants, des variations de température, la sudation, des tissus rêches, certains aliments et le stress peuvent augmenter la sévérité des lésions ainsi que la fréquence de survenue des poussées (Karila, 2013). Le récepteur PAR-2 est fortement incriminé dans la DA. En effet, des concentrations élevées de tryptase ont été retrouvées dans des biopsies cutanées de patients atteints de DA alors que celles de l'histamine sont restées inchangées suggérant une voie du prurit indépendante de l'histamine (Ikoma et al., 2006). L'expression de PAR-2 est nettement augmentée sur les fibres nerveuses intra-épidermiques dans l'épiderme de patients atopiques (Frateschi et al., 2011; Lee et al., 2010a). Récemment, une cytokine, la TSLP, a été retrouvée fortement produite par les kératinocytes et les mastocytes au niveau des lésions atopiques. Cette cytokine joue un rôle de premier plan dans le prurit au cours de la DA. L'équipe de Wilson a montré que l'activation du récepteur PAR-2 induisait la production de la TSLP par les kératinocytes dans la DA. Puis, la TSLP agissait sur les terminaisons nerveuses via son récepteur induisant ainsi un prurit dans un contexte d'INC (Misery, 2014b; Wilson and Bautista, 2014; Wilson et al., 2013a).

- **Le SN** est une pathologie cutanée génétique à transmission autosomique récessive, avec une incidence de 1 sur 200000 naissances. Les signes cliniques se manifestent dès la naissance et la sévérité de l'atteinte cutanée est variable d'un patient à l'autre, et dans le temps. D'un point de vue clinique, le SN est une « DA-like » et se caractérise par un érythème, un prurit généralement associé à de petites zones de desquamation blanchâtres, à double collerette, appelées ichtyose circonflexe. Une anomalie de la tige pileaire (*trichorrhexie invaginata*), où le cheveu présente une apparence semblable à des bambous, est également retrouvée chez les patients SN. Le SN se manifeste également par des signes atopiques non cutanés (asthme, allergie alimentaire) ainsi que par une altération de la courbe de croissance, caractérisée par une petite taille à l'âge adulte (Briot et al., 2009; Furio et al., 2014; Hovnanian, 2013; Ishida-Yamamoto et al., 2005). Cette pathologie est due à des mutations du gène *Spink5* (serine protease inhibitor kazal type 5), localisé en 5q31-q32 codant pour l'inhibiteur de protéases à sérine LEKTI (lympho epithelial kazal type inhibitor). L'ensemble de ces mutations entraîne la formation d'un codon stop prématuré empêchant l'expression de LEKTI (Chavanas et al., 2000; Hovnanian, 2013; Mägert et al., 1999). Cette perte d'expression conduit à une activité anormalement élevée des sérine-protéases telles que la tryptase et les kallicréines (Descargues et al., 2005). Ces deux protéases ont pour principales cibles les récepteurs PAR-2 et PAR-4, connus pour être impliqués dans l'inflammation et l'allergie cutanée. Chez les patients SN, l'activation de PAR-2 conduit à la translocation du NF- κ B, puis à l'expression de cytokines inflammatoires : la TSLP, le TNF- α et l'IL-8. De plus, une diminution importante de la TSLP dans l'épiderme a été observée chez des souris *SPINK5*^{-/-} et *PAR-2*^{-/-}, ce qui confirme le rôle important de PAR-2 dans le SN associé à un prurit (Figure 8) (Briot et al., 2009, 2010; Furio et al., 2014; Komatsu et al., 2002). Les souris *Spink5*^{-/-} présentent une perte d'adhérence de la couche cornée due à la dégradation de la desmogléine 1 (une protéine desmosomale) par l'augmentation de l'activité protéolytique des protéases à sérine. Ceci se traduit par un défaut de la barrière cutanée et à la mort des souris par déshydratation, quelques heures après la naissance (Figure 8) (Descargues et al., 2005).

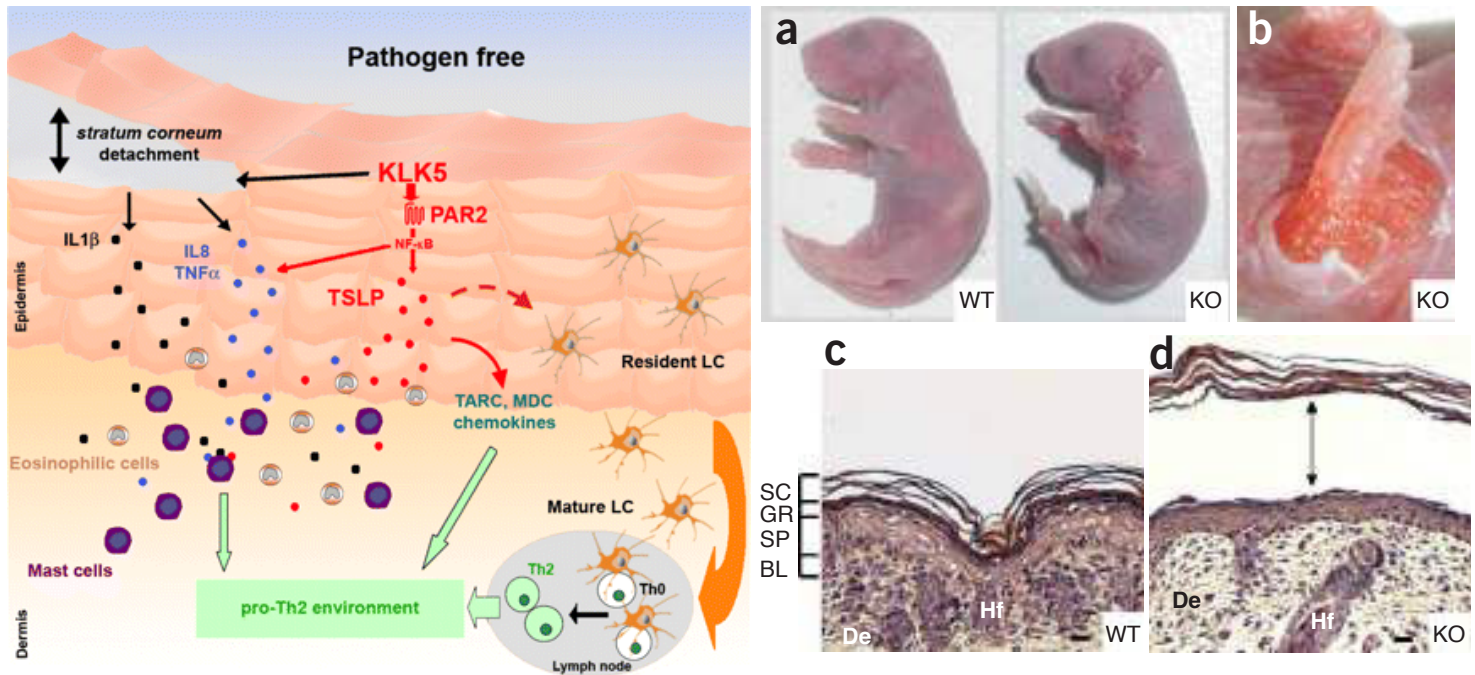


Figure 8. Déclenchement par la KLK5 d'une réaction inflammatoire et d'un microenvironnement proallergique dans le syndrome de Netherton (SN).

Les souris *Spink5*^{-/-} (serine protease inhibitor kazal type 5), sont associées à la perte de l'inhibiteur des protéases, LETKI (lympho epithelial kazal type inhibitor), et à une hyperactivité de la kallicréine 5 (KLK5). La KLK5 active le récepteur à protéase 2 (PAR-2) provoquant dans les kératinocytes une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires telles que la TSLP, l'IL-8 et le TNF-α par des mécanismes dépendants du nuclear factor-κB (NF-κB). L'hyperactivité de la KLK5 dégrade également les protéines desmosomales à l'interface entre la couche granuleuse et cornée. Ceci conduit à un défaut d'adhérence de la couche cornée et à la sécrétion de IL-1β, IL-8, et le TNF-α par les kératinocytes (Briot et al., 2009). L'ensemble des médiateurs inflammatoires induit, par la suite, le recrutement des pro-Th2, la dégranulation des mastocytes et l'activation des cellules de Langerhans. Illustration des anomalies cutanées associées à la délétion du gène *Spink5* dans l'épiderme de souris. (a, b) Illustration des anomalies cutanées et (c, d) coupe histologique en hématoxyline et éosine de la peau de souris sauvage (WT) et *Spink5*^{-/-} (KO) montrant le détachement entre la couche granuleuse (GR) et la couche cornée (SC). BL, couche basale; De, le derme; Hf, follicules pileux; SP, la couche épineuse (Descargues et al., 2005).

2. Traitements des dermatoses prurigineuses associées à l'INC

2.1. Traitements des dermatoses prurigineuses

Le psoriasis, la DA et le SN sont des dermatoses chroniques prurigineuses, dont les poussées peuvent revenir à tout moment, diminuant considérablement la qualité de vie des patients. Le traitement du prurit est déterminé en fonction de la pathologie cutanée d'origine, il est donc crucial d'effectuer une thérapie étiologique symptomatique, compatible avec la dermatose associée au prurit (Misery, 2014a, 2016; Misery and Ständer, 2010). Les traitements pour ces dermatoses prurigineuses inflammatoires sont symptomatiques, ne visant pas à faire disparaître

la maladie, mais à soulager les symptômes et la récurrence des poussées au long cours.

La mesure primaire de lutte contre ces dermatoses prurigineuses est l'utilisation en application topique de crèmes émollientes/hydratantes grasses ayant une base neutre. Ces crèmes favorisent la rémission lors de poussées et préviennent la poussée suivante en diminuant son importance et les démangeaisons qui lui sont associées (Hoare et al., 2000). Elles agissent en apaisant et nourrissant la peau, tout en réduisant l'inflammation et en restaurant la barrière cutanée (Saeki et al., 2016; Williams, 2005).

Des traitements médicamenteux existent et peuvent être administrés par voie topique ou orale. Ils visent à calmer l'inflammation, les démangeaisons ainsi qu'à hydrater la peau asséchée et diminuer l'hyper-prolifération des kératinocytes. Ils sont de nature diverse et variée (Misery, 2014a, 2016; Misery and Ständer, 2010) :

- les dermocorticoïdes,
- les dérivés de la vitamine A et D,
- les immunosuppresseurs et les immunomodulateurs,
- les anti-histaminiques ciblant H1,
- les agonistes du récepteur aux cannabinoïdes et des canaux TRPM8 et TRPV1.

La photothérapie peut également être utilisée pour traiter les dermatoses inflammatoires prurigineuses. Elle permet de ralentir la prolifération des kératinocytes et de diminuer les démangeaisons par exposition de la peau à des rayons ultraviolets (Puvathérapie (UVA) et les UVB à spectre étroit (UVB TL01 à 311 nm)) (Farahnik et al., 2016; Schlager et al., 2016; Singh et al., 2016; Stein Gold, 2016).

Il existe de nombreux traitements pour le psoriasis, la DA et le SN associés à un prurit. Cependant, ils n'ont pour objectif que de ralentir ou de soulager les symptômes liés à ces pathologies. Les effets secondaires encourus suite à l'utilisation de ces traitements ne sont pas des moindres, pouvant même aggraver dans certains cas les dermatoses prurigineuses et, par conséquent, la qualité de vie des patients. La nécessité de comprendre les mécanismes intracellulaires de ces

pathologies est primordiale afin de développer de nouveaux traitements ciblés pouvant amener à la guérison ou à une augmentation de la qualité de vie des patients.

2.2. L'eau thermale d'Uriage et les dermatoses prurigineuses

Médecine alternative vieille de plus de 2000 ans, les eaux thermales connaissent aujourd'hui un nouvel essor dans le traitement de dermatoses prurigineuses inflammatoires. Une eau thermale est définie par l'article R.1322-2 de 2007 du Code de la Santé Publique comme « une eau de source souterraine, naturellement pure, de composition physico-chimique constante et qui contient des minéraux, sels, gaz et boues, susceptibles d'agir efficacement sur la santé ». Par sa surface de contact avec l'eau et sa perméabilité, la peau se prête tout particulièrement à la pratique thermale.

L'eau thermale d'Uriage prend sa source à Uriage les Bains dans l'Isère au pied de la chaîne de Belledonne. La présence de vestiges de Thermes Romains atteste son utilisation depuis l'antiquité. C'est, en 1820 que l'eau d'Uriage est utilisée de nouveau avec la création d'un établissement thermal. En 1838, un interne des hôpitaux de Paris, Jules Vulfranc Gerdy, démontre des vertus thérapeutiques à l'eau d'Uriage dans sa thèse «Maladies de peau soignées par l'eau thermale d'Uriage». Par la suite, l'autorisation d'exploitation de la source est accordée en 1877. L'eau thermale d'Uriage est captée à 80 mètres de profondeur à une température de 27°C. Elle se caractérise par sa très forte composition minérale (11g/l) et son isotonicité, ce qui la distingue de la majorité des eaux thermales et en fait une eau unique. La composition exacte de l'eau thermale est décrite dans le Tableau 2 ci-dessous.

Mean ionic content per liter:

Sulfates	2860 mg	Potassium	45.5 mg
Chlorures	3500 mg	Silicon	42 mg
Sodium	2360 mg	Zinc	160 µg
Bicarbonates	390 mg	Manganese	154 µg
Calcium	600 mg	Copper	75 µg
Magnesium	125 mg	Iron	15 µg
Osmolarity of TWFULB is 275 +/- 40 mOsm.			

Tableau 2. Composition ionique de l'eau thermale d'Uriage

Son effet, lié à sa composition équilibrée, permet à l'eau thermale de soulager, d'améliorer et de traiter visiblement les différentes dermatoses prurigineuses inflammatoires ainsi que des maladies oto-rhino-laryngologiques (ORL) et rhumatologiques. Au niveau dermatologique, Uriage s'est spécialisé dans le soin des peaux sensibles, sèches, de l'eczéma chronique, du psoriasis, des acnés rebelles, des séquelles de brûlures et des cicatrices. D'un point de vue clinique, une amélioration de la qualité de vie des curistes et une diminution significative de la prise de médicaments ont été constatées, respectivement, après 3 semaines de cure et au cours des 6 mois suivant la cure dans la station thermale d'Uriage (Barbier and Ricard, 1951; Clavie, 1961; Guillon and Ricard, 1964). Cette eau réduit significativement les sensations d'inconfort et d'échauffement ainsi que l'érythème et le dessèchement des peaux (Ionescu and Lefeuvre, 2012).

Les cures thermales à Uriage se présentent comme une thérapie douce, d'intérêt général avéré dans le domaine de la dermatologie. Les mécanismes d'action des eaux thermales sont encore mal connus et sont devenus un enjeu majeur pour les établissements thermaux. C'est dans cet objectif que les laboratoires dermatologiques d'Uriage ont développé des travaux de recherche internes, *in vitro* ou *ex vivo*, qui ont permis de démontrer les effets de l'eau thermale d'Uriage sur des pathologies cutanées. L'eau thermale a une action réductrice de l'hyper-éosinophilie sur des cultures d'éosinophiles humains expliquant son activité dans le soin des peaux allergiques (Beauvais et al., 1998). Elle possède également un potentiel cicatrisant observé sur une culture de fibroblastes humains en stimulant la synthèse des protéines « alpha-smooth-muscle-actin » (alpha-SMA) et « Fibrilar-actin » (F-actin), et du collagène, connus pour être indispensables dans le processus de cicatrisation (Couderot-Masuyer et al., 2006). Dans un modèle d'INC en co-culture de neurones sensitifs et de kératinocytes, l'eau thermale d'Uriage diminue la stimulation induite par la capsaïcine (Pereira et al., 2006, 2007). Elle inhibe également la libération d'histamine, à partir de mastocytes, induite par la SP (Joly et al., 2014). L'eau thermale a également des vertus anti-radicalaires, en diminuant la peroxydation lipidique, et anti-oxydantes en augmentant les activités des enzymes anti-oxydantes (Super Oxyde Dismutase (SOD) et Catalase) sur les kératinocytes et fibroblastes humains (Joly et al., 2014). Elle réhydrate et renforce la barrière cutanée en augmentant l'expression de la claudine-4 (jonctions serrées) et de la filaggrine, à

l'origine de constituants du « natural moisturizing factor » (NMF) sur kératinocytes et explants de peau humaine (Joly et al., 2012). Elle agit également sur le microbiote cutané, en diminuant significativement la cytotoxicité et l'adhésion du staphylocoque doré (SD) sur les kératinocytes humains, préalablement rendus virulents par la SP dans un modèle de co-culture de la flore pathogène cutanée en relation avec la DA (Percoco et al., 2013). Sur des explants exposés au SD virulent, elle augmente l'expression des défensines antibactériennes de l'épiderme, la β défensine-2 et -3 (Mijouin et al., 2013).

Bien que les effets de l'eau thermale d'Uriage aient été démontrés dans de nombreux processus liés aux dermatoses prurigineuses inflammatoires, ses effets sur l'inflammation et l'INC restent méconnus. Dans le cadre d'une collaboration avec les laboratoires dermatologiques d'Uriage, nous tenterons d'analyser les effets de l'eau thermale d'Uriage.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

A. Problématique

L'INC est un phénomène présent dans de nombreuses dermatoses prurigineuses inflammatoires comme le psoriasis, la DA et le SN. Les mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires mis en jeu demeurent partiellement connus du fait de la complexité des interactions intercellulaires composant le SNEIC. Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle central des protéases dans ces dermatoses impliquant le récepteur PAR-2, dans une moindre mesure, le récepteur PAR-4. Néanmoins, leur implication dans l'INC reste à clarifier.

Nous nous sommes intéressés aux deux types cellulaires majeurs dans l'INC : les neurones sensoriels et les kératinocytes. Nous avons analysé l'effet de l'activation de PAR-2 de manière séparée sur des cultures primaires de neurones sensoriels issus de GRD de rat et de kératinocytes humains. L'utilisation de modèles unicellulaires dissociés du contexte physiologique, nous paraissait être un choix judicieux pour comprendre le rôle de chaque intervenant car ils ne prennent pas en compte les mécanismes d'inter-régulation entre ces deux types cellulaires. Concernant les kératinocytes, nous avons fait le choix de travailler essentiellement sur des kératinocytes différenciés car certains mécanismes sont déjà connus sur les kératinocytes non différenciés (qui d'ailleurs correspondent peu à la réalité physiologique). De plus, les kératinocytes différenciés représentent la majorité des cellules de l'épiderme, surexpriment PAR-2 (Steinhoff et al., 1999) et sont en contact direct avec les terminaisons nerveuses intra-épidermiques (Talagas and Misery, 2015).

B. Objectifs

L'objectif principal du travail a été d'appréhender le rôle de PAR-2 et PAR-4 dans l'induction ou l'entretien de mécanismes cellulaires et moléculaires liés à l'INC. Le second objectif a été de mettre en évidence des voies inhibitrices ou régulatrices.

Nous avons découpé ce manuscrit en 4 chapitres :

- Mise en place d'un modèle d'étude alternatif à l'utilisation de cultures primaires de neurones sensoriels issus des GRD de rat, en caractérisant une lignée de PC12 connue pour être différenciable en neurone sous l'effet du NGF.

- Réalisation d'un criblage des transcrits prédéfinis potentiellement impliqués dans l'INC et modulés par l'activation de PAR-2 et de PAR-4, sur des cultures primaires de kératinocytes humains différenciés et de neurones sensoriels issus de GRD de rat néonataux, en utilisant les peptides agonistes spécifiques de ces deux récepteurs.

- Etude des effets de l'eau thermale d'Uriage sur la modulation de gènes induite par l'activation PAR-2 dans les kératinocytes humains différenciés.

- Etude des voies calciques intracellulaires de PAR-2 et de son rôle dans la production de molécules inflammatoires préalablement mises en évidence par le criblage dans les kératinocytes humains différenciés.

MATÉRIEL & MÉTHODES

A. Culture cellulaire

1. Conditions de culture

Toutes les manipulations ont été effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. Tous les milieux de culture ont été supplémentés en Normocin® InvivoGen (San Diego, CA USA). La culture des cellules et des tissus a été réalisée à 37°C dans une étuve saturée en humidité dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. L'énumération des cellules et l'évaluation de la mortalité avant encemencement ont été réalisées à l'aide d'un hématimètre de Malassez et du bleu trypan.

2. Milieux et solutions pour la culture cellulaire

Le Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), la Dispase® et le keratinocytes serum-free medium (KSFM) ont été achetés chez Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Le Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), le DMEM Ham's F12 medium (DMEM-F12), la trypsine contenant 1/250 de l'acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) et du sérum de veau fœtal (SVF) ont été achetés chez Lonza (Bâle, SU). Le NGF, l'insuline, le B27, collagénase de type IV, le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), l'EDTA et l'hydrocortisone ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

3. Cultures primaires de kératinocytes humains

3.1. Obtention des kératinocytes

Les prélèvements de peaux humaines provenaient d'abdominoplasties obtenues dans le cadre d'une convention établie entre notre laboratoire et le Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Brest. Les prélèvements ont été anonymisés et une fiche de suivi accompagnait le prélèvement. L'isolement des cellules a été réalisé en condition stérile. Des lambeaux de peau ont été prélevés puis incubés dans un bain de 25 U/mL de Dispase® toute la nuit à 4°C. L'épiderme a été ensuite séparé mécaniquement du derme puis incubé avec de la trypsine-EDTA pendant 45 min. Les débris ont été filtrés puis l'activité de la trypsine a été inhibée par du SVF. Les cellules ont été centrifugées puis resuspendues dans du KSFM.

3.2. Entretien et différenciation des kératinocytes

Les kératinocytes primaires non différenciés ont été entretenus dans du KSFM et le milieu a été changé tous les 2 jours. A 80% de confluence, les kératinocytes ont été décollés par incubation de la trypsine pendant 5 min, puis ils ont été utilisés à la concentration voulue. Afin d'obtenir des cultures primaires de kératinocytes différenciés, les cellules ont été incubées pendant 16 h en présence d'une concentration élevée de Ca^{2+} extracellulaire dans du DMEM contenant 1,8 mM de Ca^{2+} . Dans le manuscrit, le terme de « UhPK » sera utilisé pour les cultures primaires de kératinocytes non différenciés entretenus dans du KSFM et le terme « DhPK » sera utilisé pour les cultures primaires de kératinocytes différenciés dans du DMEM.

4. Cultures primaires de neurones sensoriels de rat

4.1. Obtention des neurones sensoriels issus des GRD

Des rats nouveau-nés âgés de 2 à 5 jours ont été sacrifiés par décapitation. La peau du dos a été enlevée à l'aide d'une pince et de petits ciseaux. Pour atteindre les GRD, la partie haute de la colonne vertébrale a été d'abord éliminée, puis à l'aide de petits ciseaux, la colonne a été séparée en deux longitudinalement. Chaque GRD a été extrait à l'aide d'une pince fine puis aussitôt placé dans du milieu DMEM/F12. Pour dissocier les cellules nerveuses et les cellules gliales du GRD, les ganglions ont été placés pendant 35 min dans de la collagénase de type IV à 200 U/mL. Après une dissociation mécanique, les neurones sensoriels ont étéensemencés dans leur milieu d'entretien.

4.2. Entretien des neurones sensoriels

Les neurones sensoriels ont été entretenus dans du DMEMF-12 (50%) et du DMEM (50%) supplémentés avec 100 ng/mL de NGF, 10 ng/mL de BDNF, 10 ng/mL d'hydrocortisone, 10 $\mu\text{g/mL}$ d'insuline, 50X de B27. Les neurones sensoriels ont été entretenus sur 4 - 5 jours avant d'être traités.

5. Lignée de PC12 de rat

Les cellules de la lignée PC12 proviennent d'un pheochromocytome de la glande surrénale de rat (Lonza, Bâle, SU) qui ont la particularité de se différencier en neurones sous l'influence du NGF. Elles ont été entretenues dans du DMEM-F12 supplémenté avec du SVF (10%) pour assurer leur prolifération. A 80% de confluence, les cellules ont été décollées avec une solution de DPBS contenant 0,7 mM d'EDTA, puis elles ont été utilisées à la concentration voulue. Afin d'induire leur différenciation en neurones, les PC12 ont été incubées sur 5 jours dans du DMEM-F12 supplémenté avec 10 µg/mL d'insuline, 50X de B27, 10 ng/mL d'hydrocortisone et 100 ng/mL de NGF.

6. Application des composés pharmacologiques

6.1. Les agonistes et antagonistes

Les composés ont été directement appliqués à la concentration voulue dans le milieu de culture pour l'ensemble des expériences.

- Les agonistes dilués dans du DPBS étaient les suivants : 100 µM SLIGKV (PAR-2-AP) pour PAR-2 ; 100 µM GYPGQV (PAR-4-AP) pour PAR-4 (tous de Sigma-Aldrich, Saint louis, MO, USA).

- Les agonistes dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) étaient les suivants : 10 µM capsaïcine (Sigma-Aldrich, Saint louis, MO, USA) et 10 µM résiniferatoxine (RTX) (Abcam, Cambridge, UK) pour TRPV1.

- L'ensemble des antagonistes ont été dilués dans du DMSO et étaient les suivants : 1 µM SB366791 (Abcam, Cambridge, UK), 10 µM capsazepine (Abcam, Cambridge, UK) et 1 µM AMG9810 (Sigma-Aldrich, Saint louis, MO, USA) pour le TRPV1 ; 10 µM U73122 pour la PLC (Sigma-Aldrich, Saint louis, MO, USA) ; 2 µM GB83 (Axon Medchem, Groningen, NLD) ; 2 µM thapsigargine (TG) un inhibiteur des pompes « sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase » (SERCA) (Serbilab, Le Mans, FR) ; 10 µM Synta66 pour ORA1 (Glixx Laboratories, Southborough, MA, USA) ; 5 µM Xestopongin C (XestC) pour l'« inositol-3-phosphate receptor » (InsP3R) (Abcam, Cambridge, UK).

Une concentration maximale de 0,05% de DMSO, nécessaire à la dilution finale des antagonistes, a été utilisée comme contrôle afin de déterminer l'impact du solvant sur les cellules au cours des expériences. Les cellules ont été traitées pendant 4 h ou 24 h pour analyser, respectivement, l'expression des ARNm (voir Mat&Met.C.2.) et le niveau de sécrétion (voir Mat&Met.C.5.).

6.2. Transfection des ARN interférents

Les ARN interférents (ARNi) sont de petits ARN se liant à une séquence d'ARNm contribuant au clivage spécifique de ce double brin par les enzymes cellulaires. Ce mécanisme induit la perte de l'expression du gène cible et par conséquent de la protéine correspondante. Les ARNi ont été synthétisés et fournis par Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) pour TRPV1 (NM_080704) et ORAI1 (NM_032790.3) et par Qiagen (Venlo, NLD) pour PAR-2 (NM_005242). Concernant la transfection, 1 μ g de ARNi a été mélangé avec la Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), selon les instructions du fabricant. Le Mix ARNi/Lipofectamine a été dilué dans 500 μ L de milieu de culture puis incubé pendant 48 h dans chaque puit. Pour chaque expérience de transfection de ARNi, un contrôle négatif a été effectué en incubant les cellules avec un "AllStar negative control" (siScramble ; Qiagen, Venlo, NLD) ne pouvant s'hybrider avec aucun des ARNm exprimés par les cellules. A la suite des 48 h d'incubation, l'effet des ARNi sur l'expression des ARNm et protéines a été mesuré respectivement par RT-qPCR (voir Mat&Met.C.2.) et Western Blot (voir Mat&Met.C.3.).

6.3. Utilisation de l'eau thermale d'Uriage

Dans le cadre de la thèse CIFRE, l'objectif a été d'analyser l'effet de l'eau thermale d'Uriage en brumisateur (Laboratoires dermatologiques d'Uriage, Saint-Martin-d'Uriage, FR). Pour ce faire, l'eau thermale a été diluée à 1/2 dans le milieu de différenciation, puis a été appliquée avec le SLIGKV sur les kératinocytes pendant 4 h. L'eau thermale étant isotonique, les cellules ont été incubées dans le milieu dilué à 1/2 avec du sérum physiologique, en contrôle de la dilution du milieu de culture. À 4 h d'incubation, l'effet de l'eau thermale d'Uriage sur l'expression des ARNm a été mesuré par RT-qPCR (voir Mat&Met.C.2.).

7. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules en culture a été mesurée par l'utilisation du sel de tétrazolium (MTT) qui est un substrat chromogène réduit en formazan par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. La quantité de formazan formée a été analysée à partir du kit CellTiter96® AQueous (Promega, Fitchburg, WI, USA) en suivant les instructions du fournisseur. En bref, un volume de 1/5 de MTS a été ajouté par condition. Après incubation de 1 h à 37°C à 5% CO₂, les cellules ont subi une agitation forte de 10-20 s et la lecture de la densité optique (DO) a été réalisée à 490 nm. En contrôle positif de la mort cellulaire, les cellules ont été prétraitées avec une solution de 1X de solution de lyse (Promega, Fitchburg, WI, USA).

B. Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées dans leur milieu d'entretien sur lame de verre compartimentée par un Flexiperm® (Sarstedt, Nümbrecht, DE) et revêtue de Poly-L-Lysine (100 µg/mL). Les cellules ont été fixées et perméabilisées au méthanol froid pendant 30 s puis lavées trois fois (5 min) au DPBS. Les sites non spécifiques ont été saturés 5 min dans une solution de DPBS contenant 5% BSA contenant 1/1000 de Tween 20 (DPBST). Les cellules ont été incubées sur la nuit à 4°C dans une chambre humidifiée avec les anticorps primaires dans du DPBST supplémenté avec 0.5% de BSA (Tableau 3). En contrôle négatif, des anticorps isotypiques non spécifiques ont été utilisés. Après trois lavages, les cellules ont été incubées 1 h 30 à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire couplé à la fluorescein isothiocyanate (FITC) ou couplé au tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) dirigé contre l'anticorps primaire dans du DPBST supplémenté avec 0.5% BSA (Tableau 3). Après trois nouveaux lavages, les cellules ont été colorées avec une solution Molecular Probes (Eugene, OR, USA) contenant du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) et montées entre lame et lamelle. L'analyse de la fluorescence a été réalisée en utilisant un microscope Axiostar plus (Carl Zeiss Meditec, Marly-le-Roi, FR). Les photos ont été prises avec une camera AxioCam (Carl Zeiss Meditec, Marly-le-Roi, FR) et elles ont été analysées avec le logiciel AxioVision (Carl Zeiss Meditec, Marly-le-Roi, FR).

Anticorps primaires (IgG)				Anticorps secondaires (IgG)				
Réactivité	Hôte	Dilution	Fournisseur	Réactivité	Hôte	Fluorochrome	Dilution	Fournisseur
Isotypique	chèvre	1/500	Abcam, Cambridge, UK	IgG-chèvre	âne	FITC	1/500	Santa Cruz, Dallas, TE, USA
Isotypique	lapin	1/500	Abcam, Cambridge, UK	IgG-lapin	chèvre	TRITC	1/500	Aligent Technologies Dako, Santa Clara, CA, USA
Isotypique	souris	1/500	Abcam, Cambridge, UK	IgG-souris	chèvre	TRITC	1/500	Abcam, Cambridge, UK
Brn3A	lapin	1/500	Abcam, Cambridge, UK	IgG-souris	chèvre	FITC	1/500	Abcam, Cambridge, UK
CGRP- β	souris	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
CK14	souris	1/500	Santa Cruz, Dallas, TE, USA					
Involucrine	souris	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
NF200	lapin	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
ORAI1	lapin	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
Pan-NF	lapin	1/500	Biomol International, Exeter, UK					
PAR-2	souris	1/500	Sigma-Aldrich, Saint louis, CA, USA					
PAR-4	souris	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
Périphérine	souris	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
PGP9.5	souris	1/500	Aligent Technologies Dako, Santa Clara, CA, USA					
SP	lapin	1/500	Sigma-Aldrich, Saint louis, USA					
TRPV1	lapin	1/500	Abcam, Cambridge, UK					
TRPV1	chèvre	1/500	Santa Cruz, Dallas, TE, USA					

Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires pour l'immunohistochimie

Brn3A, brain-specific homeobox/POU domain protein 3A ; CGRP- β , calcitonin gene-related peptide ; CK14, cytokeratine 14 ; FITC, fluorescein isothiocyanate ; IgG, immunoglobulines ; NF200, neurofilament 200 ; ORAI1, calcium release-activated calcium channel protein 1 ; Pan-NF, pan-neurofilament ; PAR-2 et PAR-4, protease-activated receptor-2 et -4 ; PGP9.5, protein gene product 9.5 ; SP, substance P ; TRITC, tetra methyl rhodamine iso thio cyanate ; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1.

C. Etudes biochimiques et biomoléculaires

1. Extraction et dosage des ARNs et des protéines

Les cellules cultivées en triplicata ont été lysées dans 1 mL de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) pendant 1 min. Le protocole d'extraction des ARNs et des protéines suivait la procédure donnée par le fournisseur. Brièvement, 200 μ L de chloroforme froid étaient ajoutés pour 1 mL de Tri-Reagent. Après homogénéisation, les échantillons étaient centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse supérieure (contenant les ARN totaux) et la phase organique (contenant les protéines et l'ADN) étaient séparées et transférées dans un nouveau tube.

1.1. Isolation et dosages des ARNs

0,5 mL d'isopropanol a été ajouté à la phase aqueuse contenant les ARN totaux pendant 10 min. Les ARNs précipités étaient centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Par la suite, le culot était lavé avec 1 mL d'éthanol à 75% et centrifugé à 12000 g pendant 5 min à 4°C. Après séchage pendant 10 min, les culots obtenus ont été dissous dans 10 µL d'eau RNase-free. Les ARNs extraits ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nm. La contamination protéique a été mesurée à 280 nm. La pureté des échantillons d'ARNs est mesurée par le rapport des deux DO mesurées à 260 et 280 nm (DO 260/280). Cette valeur doit idéalement se situer entre 1,5 et 2. La DO à 260 nm permet de calculer la concentration d'ARN, étant donné qu'une unité de DO correspond à 40 µg/mL d'ARN.

1.2. Isolation et dosages des protéines

1,5 mL d'isopropanol ont été ajoutés à la phase organique. Après une incubation pendant 10 min à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été enlevé et le culot de protéines a été lavé trois fois avec une solution de guanidine hydrochloride (0,3 M dans de l'éthanol 95%). Pour chaque lavage, 1 mL a été ajouté, laissé pendant 20 min à température ambiante puis centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. Le culot a été rincé dans 2 mL d'éthanol 100% pendant 20 min à température ambiante puis centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. Le culot a été mis à sécher à l'air, puis dissous dans 1% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS).

La quantité protéique de chaque échantillon a été évaluée à l'aide du réactif de DC™ Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Une gamme d'étalonnage protéique a été réalisée avec de d'albumine de sérum bovin (« bovine Sera Albumin » (BSA)) par dilution en cascade au 1/1,5 (de 1,5 à 0 mg/mL). 10 µL de gamme ou d'échantillon ont été mélangés à 25 µL de réactif S dilué au 1/50 dans le réactif A puis incubés pendant 15 min avec 200 µL de réactif B avant lecture de la DO à 750 nm. La gamme n'était utilisée que si le coefficient de distribution des points autour de la droite était supérieur à 0,985. La densité optique des échantillons, dilués au 1/10, a été comparée à celle de la gamme.

2. Réverse transcription et PCR en temps réel

2.1. Synthèse de l'ADN complémentaire

Les ARNs totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) avec le kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). L'enzyme Reverse Transcriptase permet de transcrire l'ARN simple brin en ADNc. 1 µg d'ARN total a été prélevé de l'échantillon et le volume ajusté à 20 µL avec de l'eau RNase-free. 20 µL de volume de réaction (mix) ont été ajoutés.

La composition du mix est la suivante : 12,2 µL d'eau RNase-free, 2 µL de tampon de réaction 10X, 2 µL de random primers 10X, 1,8 µL de dNTP 25X (mélange équimolaire de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µL de reverse transcriptase multiscribe (50 U/µl)

Les échantillons, de 40 µL, ont ensuite été mis à incuber pendant 10 min à 25°C puis à 37°C pendant 2 h. Cette étape a été réalisée avec un bloc chauffant « TECHNE TC-4000 ». Les ADNc résultants ont été ensuite stockés à - 20°C jusqu'à utilisation.

2.2. qPCR

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) ou PCR en temps réel reprend le même principe que la PCR classique, c'est-à-dire le cycle de dénaturation, d'hybridation puis d'extension. Une sonde fluorescente SYBR Green intercalant des acides nucléiques permet la quantification en temps réel de l'amplicon formé à chaque cycle par mesure de la quantité de fluorescence émise. Ensuite, chaque gène d'intérêt sera rapporté à un gène de référence, ici l'actine, qui est non régulée dans les traitements utilisés afin de normaliser les résultats. La qPCR a été réalisée avec le système d'Applied Biosystems (Waltham, MA, USA), StepOne™ Real-Time PCR system. Pour chaque réaction, 5 µL d'ADNc de l'échantillon ont été ajoutés à 15 µL de Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) contenant 10 µM d'amorces du gène d'intérêt (Tableau 4 et 5). Les amorces ont été obtenues à partir du logiciel Primer 3 pour un produit de PCR allant de 100 à 200 pb et ont également été confirmées sur Blast. Un témoin négatif contenant tous les composants à l'exception de l'ADNc a été réalisé pour chaque gène d'intérêt. Les amorces ont été achetées chez Eurogentec (Seraing, Liège, BEL).

La composition du mix est la suivante : 10 µL de Master Mix SYBR Green, 0,2 µL d'oligonucléotides sens, 0,2 µL d'oligonucléotides antisens, 4,6 µL d'eau RNase-free

Les étapes d'amplification étaient les suivantes :

- dénaturation initiale de 10 min à 95°C
- 40 cycles comme suit : 15 s à 95°C puis 1 min à 60°C

Amorces rats		
Gènes	Amorces Sens	Amorces Antisens
Actine	GAG-ACC-TTC-AAC-ACC-CCA-GC	ATG-TCA-CGC-ACG-ATT-TCC-CT
BDNF	GGC-CCA-ACG-AAG-AAA-AC	AGC-ATC-ACC-CGG-GAA-GTG-T
CGRP-α	CCT-TTC-CTG-GTT-GTC-AGC-ATC-TT	CAG-TAG-GCG-AGC-TTC-TTC-TTC-AC
EGF	CCC-GTG-TTC-TTC-TGA-GTT-CC	TGT-AAC-CGT-GGC-TTC-CTT-CT
FGF-β	GCG-ACC-CAC-ACG-TCA-AAC-TA	TCC-CTT-GAT-AGA-CAC-AAC-TCC-TC
GRP	CCC-GTG-TTC-TTC-TGA-GTT-CC	TGT-AAC-CGT-GGC-TTC-CTT-CT
IL-6	CTT-CCC-TAC-TTC-ACA-AGT-CC	GAC-CAC-AGT-GAG-GAA-TGT-CC
NGF	ATG-GTA-CAA-TCT-CCT-TCA-AC	GGC-TGT-GGT-CTT-ATC-TCC
NPY	TGG-CCA-GAT-ACT-ACT-CCG-CT	ATG-GAA-GGG-TCT-TCA-AGC-CT
NT3	AGC-ATC-ACC-CGG-GAA-GTG-T	TCC-CGA-GAG-CCC-AAT-CAC-AA
PAR-2	CTG-CAA-CCG-GAC-CGT-GAA-TGC	GAG-CAG-TAC-ATA-TTG-CCG-TAG
PAR-4	GGA-ATG-CCA-GAC-GCC-CAG-CAT-C	GGT-GAG-GCG-TTG-ACC-ACG-CA
Sema3A	CTG-CTC-CGA-CTT-GCA-GCA-TC	CGC-CTC-TGA-AAT-TGC-CAA-TAT-ACC
SP	ACC-AAA-TCA-AGG-AGG-CAA-TG	AGC-CTT-TAA-CAG-GGC-CAC-TT
TGF-β	GCT-GCT-GAC-CCC-CAC-TGA-T	GCC-ACT-GCC-GGA-CAA-CTC
TSLP	TCC-TGA-AAA-TCG-ACC-ACC-AT	GAT-TGT-GGC-TTT-CCT-GCA-TT
VIP	CAC-TCA-TTG-GCA-AAC-GAA-TCA	TTC-TTC-ACA-GCC-ATT-TGC-TTT-C

Tableau 4. Amorces rats pour la qPCR

BDNF, brain-derived neurotrophic factor ; CGRP-α, calcitonin gene-related peptide-α ; EGF, epidermal growth factor ; FGF-β, fibroblast growth factor-β ; GRP, gastrin-releasing peptide ; IL-6, interleukine-6 ; NGF, nerve growth factor ; NT3, neutrophine 3 ; PAR-2 et PAR-4, protease-activated receptor-2 et -4 ; Sema3A, sémaphorine 3A ; SP, substance P ; TGF-β, transforming growth factor-β ; TSLP, thymic stromal lymphopoietin ; VIP, vasoactive intestinal peptide.

Amorces Humaines		
Gènes	Amorces Sens	Amorces Antisens
Actine	GAG-ACC-TTC-AAC-ACC-CCA-GC	ATG-TCA-CGC-ACG-ATT-TCC-CT
BDNF	AAA-CAT-CCG-AGG-ACA-AGG-TG	AGA-AGA-GGA-GGC-TCC-AAA-GG
CGRP-β	TGA-AGC-AGG-AGC-AGG-AGA-CAC-A	CGA-AGT-TGC-TCT-TCA-CCA-TGC-C
CXCL1	AGG-CAG-GGG-AAT-GTA-TGT-GC	GCC-CCT-TTG-TTC-TAA-GCC-AGA
CXCL2	TGT-GAC-GGC-AGG-GAA-ATG-TA	TCT-GCT-CTA-ACA-CAG-AGG-GAA-AC
Cx26	CCC-GAC-GCA-GAG-CAA-ACC	GGA-CGG-TGA-GCC-AGA-TCT-TT
Cx43	TAC-CAA-ACA-GCA-GCG-GAG-TT	TGG-GCA-CCA-CTC-TTT-TGC-TT
E-cad	GTA-ACG-GAT-CCA-GCA-GTG-AA	CCC-AGG-CGT-AGA-CCA-AGA-AA
EGF	CTT-GTC-ATG-CTG-CTC-CTC-CTG	TGC-GAC-TCC-TCA-CAT-CTC-TGC
FGF-β	AGA-GCG-ACC-CTC-ACA-TCA-AG	TCG-TTT-CAG-TGC-CAC-ATA-C
GRP	TCA-GGC-TCC-CTC-TCT-CAG-AA	CGT-GCT-GAC-CAA-GAT-GTA-CC
IL-1β	ACC-AAA-CCT-CTT-CGA-GGC-AC	AGC-CAT-CAT-TTC-ACT-GGC-GA
IL-8	AGG-GTT-GCC-AGA-TGC-ATT-AC	AGC-AGA-CTA-GGG-TTG-CCA-GA
IL-31	GAT-GAT-GTA-CAG-AAA-ATA-GTC-GAG-GAA-TT	CTT-CTC-TTC-CTC-CAC-ATC-TTT-CAA A
MMP9	TTC-CAA-ACC-TTT-GAG-GGC-GA	CTG-TAC-ACG-CGA-GTG-AAG-GT
MMP24	CCG-TGA-AGG-CAT-TGA-CAC-AG	TGC-TGA-TGA-AGG-CTC-CTT-GG
NGF	ATA-CAG-GCG-GAA-CCA-CAC-CTC	TGC-TCC-TGT-GAG-TCC-TGT-TG
NT3	CGG-AGC-ATA-AGA-GTC-ACC	CCT-GGC-TTC-CTT-ACA-TCG
NT4	GCT-GAT-AAC-GCT-GAG-GAA-G	CAC-ATA-GGA-CTG-CTT-GGC
ORAI1	AGG-TGA-TGA-GCC-TCA-ACG-AG	CTG-ATC-ATG-AGC-GCA-AAC-AG
PAR-2	TGC-TAG-CAG-CCT-CTC-TCT-CC	CCA-GTG-AGG-ACA-GAT-GCA-GA
PAR-4	GGG-TCC-CTT-CCC-CCA-CTT	GAC-AGT-TGT-AAC-AAC-CCT-ATT-TCC-AAA
Sema3A	ACC-ACC-CAA-TCA-GGA-CAG-AG	TGG-CAC-TGA-GCA-AAT-CAG-AC
TGF-β	AAG-GAC-CTC-GGC-TGG-AAG-TG	CCC-GGG-TTA-TGC-TGG-TTG-TA
TNF-α	AGA-ACT-CAC-TGG-GGC-CTA-CA	GCT-CCG-TGT-CTC-AAG-GAA-GT
TRPV1	CAA-CAA-GAT-CGC-ACA-GGA-GA	TCC-TTG-CCA-TCA-GGT-GTG-TA
TSLP	CCA-GAA-AGC-TCT-GGA-GCA-TCA	ACC-CAA-TTC-CAC-CCC-AGT-TT

Tableau 5. Amorces humaines pour la qPCR

BDNF, brain-derived neurotrophic factor ; CGRP-β, calcitonin gene-related peptide-β ; CXCL1 et -2, chemokine (C-X-C motif) ligand 1 et 2 ; Cx26 et -43, connexine 26 et 43 ; EGF, epidermal growth factor ; FGF-β, fibroblast growth factor-β ; GRP, gastrin-releasing peptide ; IL-1β, -8 et -31, interleukine-1β, -6, -8 et -31 ; MMP9 et -24, métalloprotéinase matricielle 9 et 24 ; NGF, nerve growth factor ; NT3 et -4, neutrophine 3 et -4 ; ORAI1, calcium release-activated calcium channel protein 1 ; PAR-2 et PAR-4, protease-activated receptor-2 et -4 ; Sema3A, sémaphorine 3A ; TGF-β, transforming growth factor-β ; TNF-α, tumor necrosis factor-α ; TRPV1, transient receptor potential vanilloïde 1 ; TSLP, thymic stromal lymphopoietin.

2.3. Analyse des résultats de PCR

Chaque réaction d'amplification a été réalisée en duplicata. La spécificité de chaque amplification a été contrôlée par l'ajout d'une courbe de fusion en fin de cycle de qPCR donnant la température de dénaturation spécifique de chaque amplicon. La moyenne des « threshold cycles » ou Ct de chaque duplicata a été utilisée pour évaluer l'expression relative de l'ARNm de chaque gène. Le Ct est le cycle seuil où la fluorescence émise par le SYBR Green intercalé dans l'ADN amplifié est supérieure au bruit de fond de l'échantillon. Le ΔCt de chaque gène a été obtenu après soustraction du Ct de l'actine au Ct du gène d'intérêt. Le $\Delta\Delta Ct$ a été obtenu après normalisation des échantillons traités par les échantillons non traités selon le calcul suivant : $\Delta Ct \text{ traité} - \Delta Ct \text{ non traité}$. L'expression relative des ARNm pour chaque échantillon a été obtenue selon le calcul suivant : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ qui est la méthode de référence pour la quantification des ARNm (Bustin et al. 2009). L'ensemble des calculs a été réalisé automatiquement par l'appareil de qPCR StepOne™ Real-Time PCR Software et contrôlé manuellement.

3. Western Blot

3.1. Dénaturation et migration des protéines

Les protéines extraites ont été dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 min dans du tampon de charge 10X (4% de SDS, 0,1% de bleu de bromophénol, 100 mM de TrisHCl, 15% de glycérol, 15% de beta mercapto-éthanol, pH 8,4). Elles ont par la suite été séparées par migration dans un gel de poly-acrylamide contenant un gel de concentration et un gel de séparation. Le gel de concentration 4% est constitué de 3 mL d'eau distillée, 1,3 mL de tampon II (TrisHCl 1 M), SDS 0,4%, pH 6,8), 500 μ L d'acrylamide-bis à 40%, 10 μ L de Temed, 50 μ L de persulfate d'ammonium (APS) à 10%. Le gel de séparation à 10% de poly-acrylamide est constitué de 3,46 mL d'eau distillée, 2 mL de Tampon I (TrisHCl 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,6), 1,875 mL d'acrylamide-bis à 40%, 15 μ L de Temed, 75 μ L d'APS à 10%. 100 μ g de protéines ont été déposés dans les puits du gel de concentration, ainsi que 5 μ L d'un marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) afin d'identifier facilement les protéines d'intérêts. La migration a été réalisée dans du tampon de migration

constitué de 3 g de TrisHCl, 2 g de SDS, 14,4 g de glycine dans 1 L d'eau à 35 mA/gel jusqu'à la sortie du tampon de charge.

3.2. Transfert

La membrane PVDF (Millipore, Bellerica, MA, USA) a été activée pendant 1 min dans du méthanol puis lavée 3 fois pendant 1 min avant utilisation. Les protéines contenues dans le gel ont été transférées sur la membrane PVDF pendant 1 h 30 à 100 V constant et 4°C dans le tampon de transfert constitué de 3 g de Tris et de 14,4 g de glycine dans 200 mL de méthanol et 800 mL d'eau. L'efficacité du transfert a été visualisée par coloration de la membrane avec du rouge ponceau (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) pendant 5 min. La membrane était rincée à l'eau distillée jusqu'à élimination complète du rouge ponceau.

3.3. Hybridation de la membrane

Afin d'éviter les fixations non spécifiques, la membrane « Polyvinylidene fluoride » (PVDF) a été saturée dans du tampon DPBST contenant 5% de lait écrémé toute la nuit à 4°C. Par la suite, la membrane a été incubée sur 1 h 30 à température ambiante avec les solutions d'anticorps primaires contenant l'anticorps de lapin dirigé contre ORA11 (1/1000 ; Abcam, Cambridge, UK) ou l'actine (1/5000 ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluées dans du DPBS à 5% de lait écrémé.

La membrane a été lavée 3 fois 15 min sous agitation forte dans du DPBST. Elle a été ensuite incubée pendant 1 h 30 en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la « Horse radish peroxydase » (HRP) (1/5000 ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) dilué dans du DPBST avant 3 nouveaux lavages au DPBST. Les protéines ont été révélées après incubation du réactif ECL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) avec l'HRP de l'anticorps secondaire. La chimio-luminescence a été mesurée par l'appareil ChemiSmart 5100 (PeQLab Biothecnologie GmbH, Erlangen, DE).

3.4. Quantification relative des protéines

La quantification a été obtenue après analyse de l'intensité des bandes par le logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Son expression a été

normalisée par rapport au gène de ménage (l'actine) et rapportée par rapport à la condition contrôle.

4. Analyse de l'activité NF- κ B

Afin d'analyser l'activité transcriptionnelle endogène du NF- κ B, les cellules ont été transfectées avec un vecteur rapporteur couplé à la Luciférase, pNF- κ B-Tluc16-DD (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Brièvement, 0,5 μ g d'ADN a été mélangé à de la Lipofectamine® 3000 et du réactif P3000™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), selon les instructions du fournisseur, puis le mix a été déposé dans 200 μ L de milieu de culture pendant 48 h. Les cellules ont été traitées avec les agonistes et antagonistes désirés sur les 24 h permettant l'expression de la Luciférase. L'activité luciférase a été révélée par incubation pendant 10 min du réactif du kit TurboLuc™ One-Step Glow Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), selon les instructions du fournisseur. La luminescence a été mesurée en utilisant le lecteur de microplaques Flex-Station-3 et de son logiciel Soft Max Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

5. Dosage des cytokines inflammatoire

Les concentrations de TSLP (DY1398-05), TNF- α (DY210-05), IL-1 β (DY201-05) humains sécrétées dans les milieux des DhPK ont été déterminées à l'aide de kits commerciaux DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) selon les instructions. Les plaques de dosage ont été traitées sur la nuit avec une 100 μ L de solution Capture à 800 ng/mL. Le lendemain, la plaque a été lavée 3 fois avec 200 μ L de 1X de solution de lavage. La plaque a été saturée avec 300 μ L de 1X de solution de dilution sur 1 h avant 3 nouveaux lavages. 100 μ L de Gamme TSLP ou d'échantillon ont été incubés en triplicata pendant 2 h. La gamme a été obtenue à partir de la solution standard à 100 ng/mL, suivie d'une dilution en cascade au 1/2 (TSLP de 2000 à 31,3 pg/mL ; TNF- α : de 1000 à 15,6 pg/mL ; IL-1 β de 250 à 3,91 pg/mL). Après 3 lavages, les anticorps dirigés contre la TSLP, le TNF- α et l'IL-1 β ont été incubés pendant 2 h. Après 3 nouveaux lavages, 100 μ L de solution contenant 1X de streptavidine-HRP ont été incubés dans le noir pendant 20 min. Par la suite, 100 μ L d'une solution substrat A + B (v/v) ont été

ajoutés après 3 nouveaux lavages. Pour finir, la réaction a été stoppée avec 50 μL d'une solution stop et la DO a été mesurée à 450 nm.

D. L'imagerie calcique

1. Principe

L'imagerie dynamique du calcium cytosolique a été réalisée par fluorescence ratiométrique de la sonde « Fura 2-acetoxymethyl ester » (AM). Le Fura 2 est une sonde calcique ($K_d = 0,14 \mu\text{M}$) qui présente à la fois une partie fluorophore de type styblène lui conférant son caractère fluorescent et une structure tétracarboxylée lui permettant de lier un ion Ca^{2+} . Le groupement AM permet son passage à travers la membrane plasmique conférant à la sonde Fura 2 une caractéristique hydrophobe. Une fois la bicouche lipidique traversée, les estérases du cytoplasme procèdent à une désestérification du Fura 2-AM qui retrouve sa forme Fura 2. La sonde reste donc piégée dans le cytoplasme où elle pourra se lier les ions Ca^{2+} . La sonde Fura 2 est une sonde double excitation/mono émission : deux longueurs d'ondes d'excitation dépendantes de la concentration du calcium, 340 nm (forme liée du calcium) et 380 nm (forme libre du calcium) et une longueur d'émission 510 nm. La mesure du rapport de fluorescences F_{340} / F_{380} à 510 nm permet de calculer en mode ratiométrique la concentration en Ca^{2+} intracellulaire libre. Ceci en fait une sonde de premier choix pour l'étude des variations de Ca^{2+} intracellulaire, puisqu'elle permet une mesure quantitative du Ca^{2+} intracellulaire libre, indépendamment de la quantité de sonde chargée dans les cellules.

2. Procédure expérimentale

Les cellules en culture sur des lamelles traitées de 18 mm ont été lavées 3 fois dans du tampon d'imagerie contenant (en mM) 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 Hepes, 10 glucose et 1,8 Ca^{2+} . Par la suite, elles ont été incubées dans du tampon d'imagerie supplémenté de 2 μM de Fura 2-AM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) et de 2 μM d'Acide pluronique (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) pendant 45 min (37°C, 5% CO_2). Après 3 nouveaux lavages, les lamelles ont été introduites dans une chambre de perfusion de 500 μL de type RC25F (Warner Instruments, Hamden, CT, USA). Les échantillons sont ensuite placés sur le poste d'imagerie constitué d'un

microscope à Olympus IX71 (Olympus Corporation, Tokyo, JAP) équipé d'un monochromateur Polychrome V (TILL Photonics Media, Pittsfield, MA, USA) permettant l'excitation de sonde Fura 2 à 340 et 380 nm. Le signal d'émission de la sonde suite à l'excitation qu'il subit est dirigé vers d'une caméra 14-bit CDD (EXi Blue Fluorescence Microscopy Camera ; Qimaging, Surrey, BC, CAN). Les lamelles ont été placées dans 500 μ L de tampon d'imagerie, contenant (1,8 mM) ou non (0 mM) du Ca^{2+} , et la re-perfusion avec du tampon d'imagerie contenant 1,8 mM de Ca^{2+} a été réalisée avec un injecteur. L'acquisition des variations du Ca^{2+} cytosoliques a été effectuée toutes les 5 s et obtenue grâce au logiciel Metafluor 6.3 (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Les résultats présentés sont la moyenne des valeurs observées sur au moins 45-50 cellules correspondant à l'analyse minimale de 3 lamelles issues de 3 cultures différentes pour chaque condition.

E. Analyse statistique

L'ensemble des résultats obtenu a été analysé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc, Ca, USA) et la normalité a été vérifiée pour chaque expérience. Les résultats ont été traités statistiquement en fonction de la normalité par ANOVA de type « one-way » ou par le test de Mann-Whitney. Les valeurs représentées dans le manuscrit correspondent à la moyenne des variations $\pm$ erreur-type de la moyenne (SEM) et les différences significatives sont représentées par les symboles : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Chapitre I. Caractérisation des PC12 comme modèle alternatif à l'utilisation des neurones sensoriels issus des GRD de rat

A. Introduction

Actuellement, le principal modèle neuronal d'étude de l'INC est la culture primaire de neurones sensoriels issus de GRD de rat. L'utilisation d'un tel modèle engendre de nombreuses contraintes. La première est liée à la reproduction des animaux, nécessitant un rythme soutenu de naissance. La seconde se rapporte à la difficulté de reproductibilité des expériences à partir de cultures primaires. Une autre contrainte s'établit sur le plan éthique du fait de l'utilisation d'animaux pour les tests de cosmétiques.

L'utilisation d'une lignée cellulaire neuronale permettrait de pallier à l'ensemble de ces contraintes. C'est dans cette optique que les PC12, une lignée cellulaire de phéochromocytome de rat pouvant être différenciée par le NGF en neurones, ont été choisies comme modèle de substitution pour étudier les mécanismes cellulaires à l'origine de l'INC. Dans la littérature, les PC12 ont souvent été utilisées pour l'étude des voies de signalisation neuronales et des voies neurosécrétoires des neurones (Qu et al., 1998). Les PC12 expriment également des canaux Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , leur conférant un potentiel activable (Martin and Grishanin, 2003; Shafer and Atchison, 1991; Westerink and Ewing, 2008).

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer l'expression de marqueurs neuronaux dans les PC12 différenciées avec le NGF. Les neurones expriment des marqueurs neuroendocriniens, le PGP9.5, et des marqueurs neuronaux, les NF (Bae et al., 2015; Lawson et al., 1984; Trowern et al., 1996). Nous utiliserons ces deux marqueurs pour caractériser nos PC12 différenciées comme neurones. De nombreux marqueurs sont utilisés pour caractériser les neurones sensoriels. La périphérine et le « brain-specific homeobox/POU domain protein 3A » (Brn3A) sont des marqueurs des fibres de type A δ ou C (Bae et al., 2015; Ferri et al., 1990; Ninkina et al., 1993). Les neuropeptides (SP et le CGRP- α) sont les principaux marqueurs utilisés pour identifier le potentiel neurosécrétoire des neurones sensoriels périphériques (Bae et al., 2015). Dans l'objectif de caractériser les PC12 comme modèle alternatif aux neurones sensoriels issus de GRD de rat, il sera nécessaire de retrouver l'ensemble des marqueurs des neurones sensoriels périphériques avec des fibres de type A δ ou C. Les neurones sensoriels expriment également des récepteurs de l'INC et du prurit tels que TRPV1 et PAR-2. Nous

tenterons d'une part de confirmer la présence de TRPV1 (Someya et al., 2004) et d'explorer celle de PAR-2 dans les PC12 différenciées avec le NGF. D'autre part, nous tenterons de confirmer la fonctionnalité de notre modèle en activant TRPV1 et PAR-2.

B. Résultats

1. Caractérisation des PC12 comme neurones

Dans la littérature, il a été clairement démontré que les PC12 peuvent être différenciées en neurones sous l'influence du NGF (Greene and Tischler, 1976). Afin de confirmer le phénotype neuronal des PC12, des immuno-marquages de marqueurs neuronaux tels que PGP9.5 (Trowern et al., 1996) et les neurofilaments (PanNF) (Lee and Page, 1984) ont été réalisés (Figure 9). Un marquage positif des neurofilaments au PanNF et PGP9.5 a permis de confirmer que les PC12 se différencient en neurones, en présence de NGF.

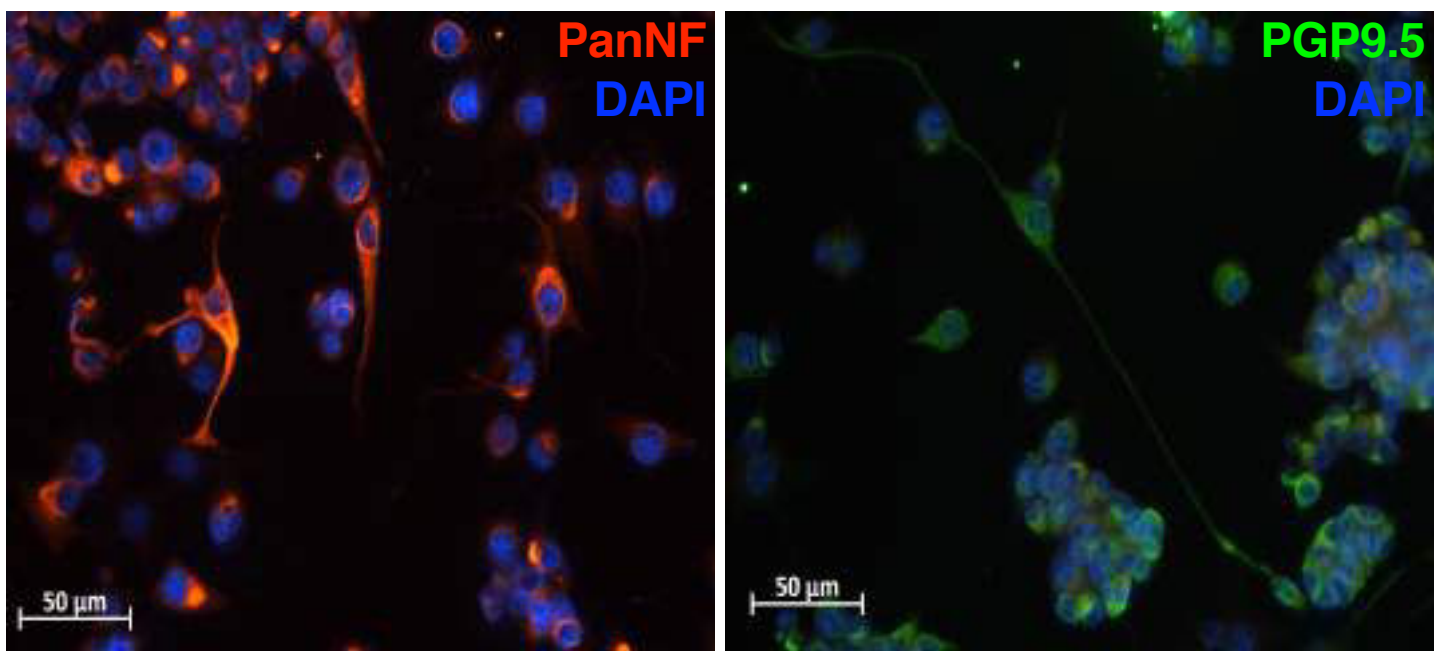


Figure 9. Analyse de la présence des marqueurs des neurones dans les PC12.

Images fusionnées obtenues par immunofluorescence de marqueurs neuroendocriniens tels que les neurofilaments (PanNF) et la PGP9.5 dans les PC12 différenciées en neurones par le NGF. Les noyaux ont été colorés en bleu par le DAPI. Le PanNF a été révélé en rouge par un anticorps secondaire couplé au TRITC. Le PGP9.5 a été révélé en vert par un anticorps secondaire couplé à la FITC. Ces images sont représentatives de n = 3 expériences indépendantes.

2. Les PC12, des neurones périphériques associés aux fibres de type A δ et C

Afin de valider si les PC12 se différencient en neurones périphériques de type A δ et C, nous avons réalisé un immunomarquage de la périphérine (Portier et al., 1983) et du Brn3A (Valderrama and Misra, 2008). Nous avons constaté que les PC12 exprimaient ces deux marqueurs confirmant leur caractéristique sensorielle. Le potentiel neurosécrétoire des PC12, a été confirmé par un marquage positif des PC12 avec la SP et le CGRP (Figure 10).

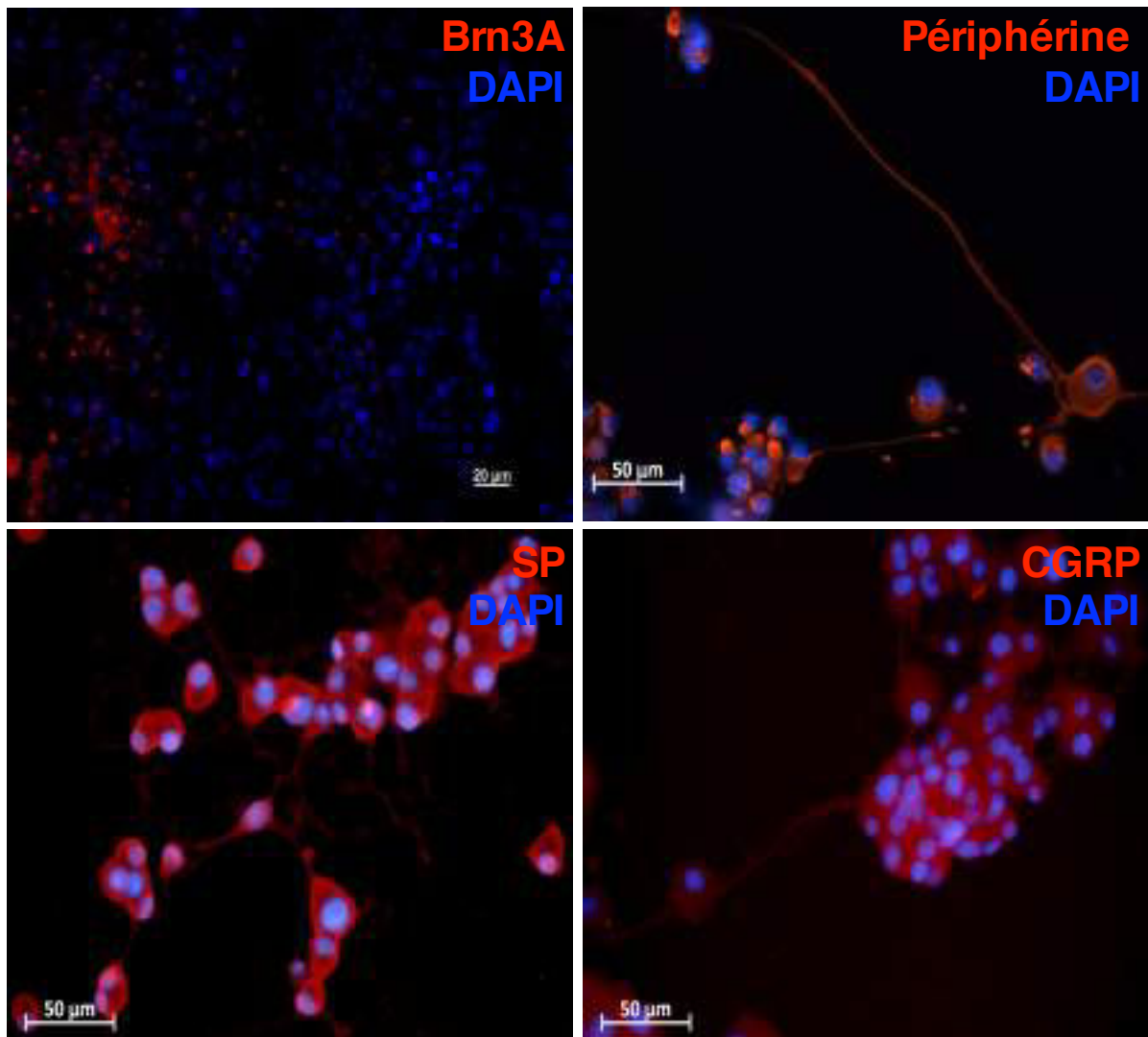


Figure 10. Analyse de la présence des marqueurs des neurones périphériques dans les PC12. Images fusionnées obtenues par immunofluorescence de marqueurs des neurones périphériques incluant la périphérine, le Brn3A, la SP et le CGRP dans les PC12 différenciées en neurones par le NGF. Les noyaux ont été colorés en bleu au DAPI. L'ensemble des marqueurs a été révélé en rouge par un anticorps secondaire couplé au TRITC. Ces images sont représentatives de $n = 3$ expériences indépendantes.

3. Détection de récepteurs de l'INC dans les PC12

Afin de compléter la caractérisation de ce modèle, un immunomarquage des récepteurs TRPV1 et PAR-2 a été réalisé. Ces deux récepteurs ont été démontrés pour être impliqués dans l'INC (Horváth et al., 2015; Steinhoff et al., 2000). Leur expression est connue dans les neurones sensoriels et leur activation induit la sécrétion de neuropeptides par des mécanismes dépendants du Ca^{2+} (Jessell et al., 1978; Nguyen et al., 2003; Reed et al., 2003; Su et al., 2005). Nous avons d'une part confirmé la présence de TRPV1 dans les PC12 différenciées avec le NGF. D'autre part, nous avons détecté pour la première fois la présence de PAR-2 dans ces cellules (Figure 11). Malgré la présence de ces récepteurs à la surface des PC12, il reste à déterminer leur fonctionnalité.

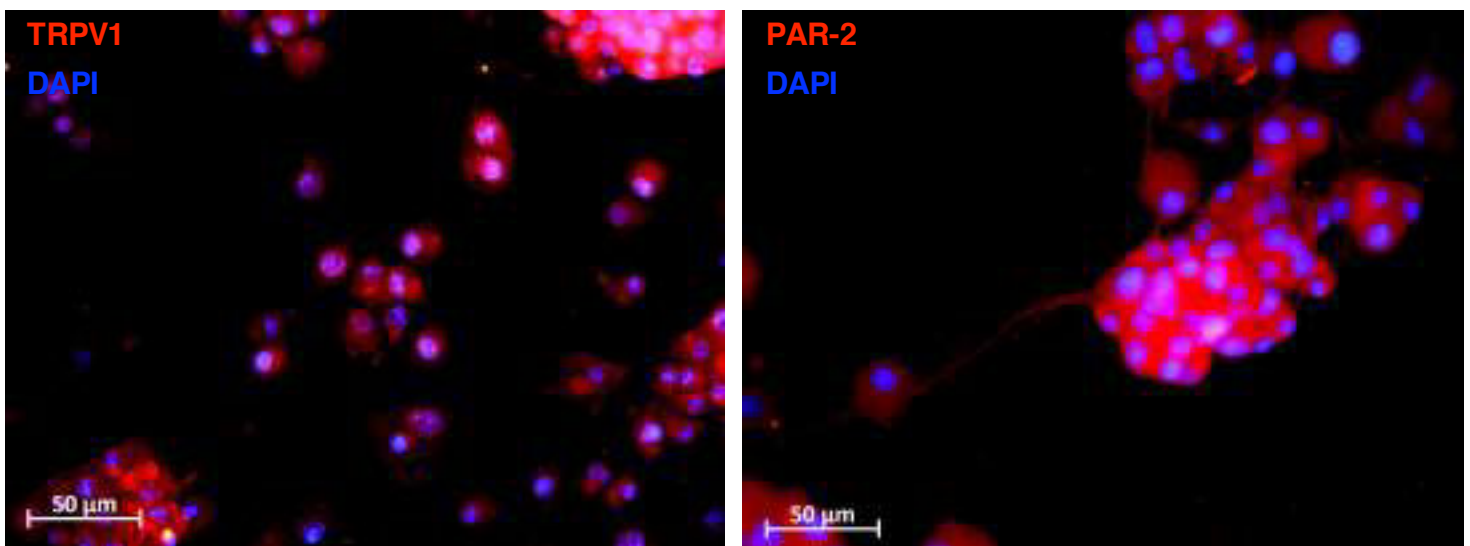


Figure 11. Détection de TRPV1 et PAR-2 dans les PC12

Images fusionnées obtenues par immunofluorescence de récepteurs de l'INC dont le TRPV1 et le PAR-2 dans les PC12 différenciées en neurones par le NGF. Les noyaux ont été colorés en bleu au DAPI. L'ensemble des protéines a été révélé en rouge par un anticorps secondaire couplé au TRITC. Ces images sont représentatives de n = 3 expériences indépendantes.

4. Réponse calcique des PC12 aux médiateurs de l'INC

L'activation de TRPV1 et PAR-2 déclenche une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les neurones sensoriels, événement initiateur de l'exocytose. Nous avons analysé la fonctionnalité des récepteurs cités précédemment en imagerie calcique dans les PC12 différenciées avec le NGF (Jessell et al., 1978; Nguyen et al., 2003; Reed et al., 2003; Su et al., 2005). L'activation de PAR-2 par son peptide agoniste, le SLIGKV à 100 μM , ne déclenchait aucune augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. De la même manière, la capsaïcine à 10 μM , un agoniste de TRPV1, n'avait aucun effet sur les variations du Ca^{2+} intracellulaire (Figure 12). Nous avons contrôlé l'efficacité de nos agonistes sur des kératinocytes, cellules connues pour induire une réponse calcique en réponse à ces deux agonistes (Denda et al., 2001; Steinhoff et al., 1999). La capsaïcine à 10 μM et le SLIGKV à 100 μM induisaient une augmentation du calcium intracellulaire dans les kératinocytes, confirmant la fonctionnalité de nos agonistes et l'incapacité des PC12 à répondre à ces deux types d'agonistes (Figure 12).

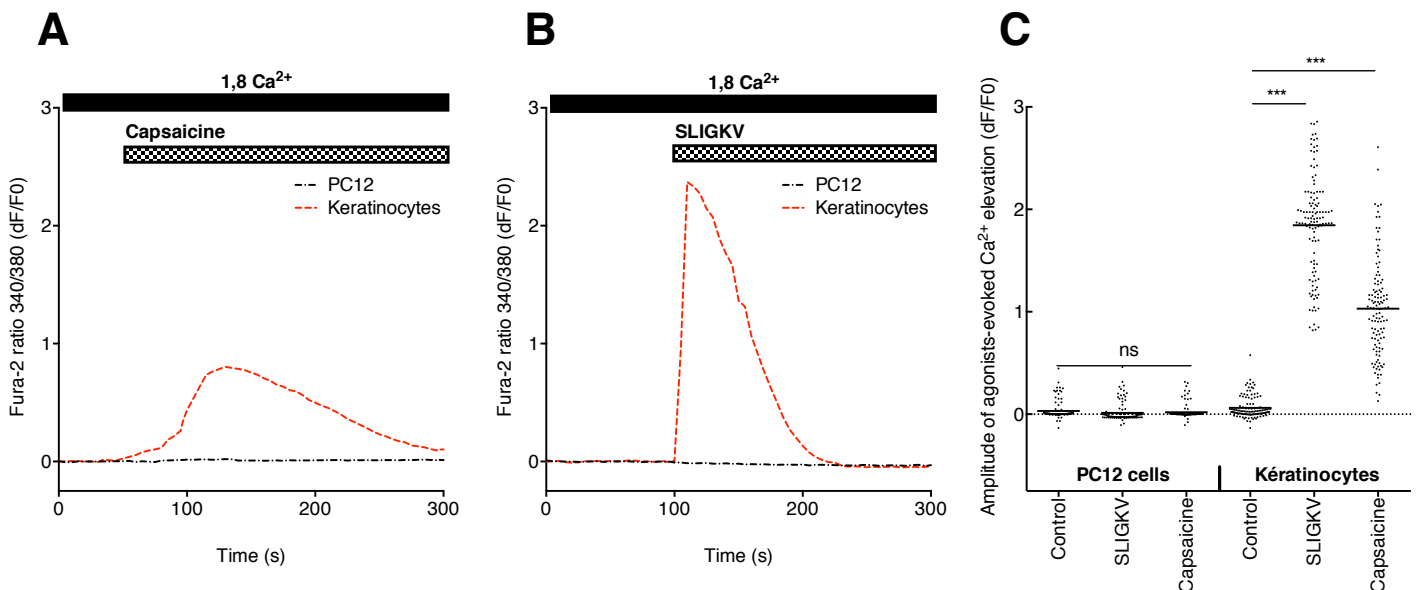


Figure 12. Réponses calciques des PC12 différenciées en neurones aux agonistes de PAR-2 et TRPV1.

Tracés représentatifs de la réponse moyenne calcique, en condition 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire, induite par **A.** 10 μM de capsaïcine l'agoniste de TRPV1 et **B.** 100 μM de SLIGKV le peptide agoniste de PAR-2 dans les PC12 différenciées en neurones par le NGF et les UhPK. **C.** Amplitude maximale de réponse calcique induite par 100 μM de SLIGKV ou 10 μM capsaïcine dans les PC12 différenciés en neurones par le NGF et les kératinocytes en condition 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire. Les graphiques représentent les valeurs moyennes $\pm$ SEM de n = 3 expériences indépendantes ; N = 45-55 cellules par expérience. La significativité a été analysée par le test de ANOVA one-way : * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01 ; *** = p < 0,001 ; ns = non significatif.

C. Discussion

1. Caractérisation comme neurones sensoriels

Les cellules de la lignée PC12 proviennent d'un pheochromocytome de la glande surrénale de rat et sont différenciables en neurones sous l'influence du NGF (Greene and Tischler, 1976). Elles sont déjà utilisées comme modèle d'étude de la croissance des neurites dans des explants de peaux réinnervées (Lebonvallet et al., 2013), de la sécrétion neuronale et neuroendocrinienne (Martin and Grishanin, 2003) ainsi que des effets de substances neurotoxiques (Shafer and Atchison, 1991). Nous avons caractérisé les PC12 pour savoir si elles avaient un phénotype de neurones sensoriels périphériques.

Dans un premier temps, nous avons confirmé le phénotype neuronal des PC12 différenciées par le marquage des neurofilaments (PanNF) et PGP9.5 (Bae et al., 2015; Lee and Page, 1984; Trowern et al., 1996) (Figure 9). Nous avons également confirmé qu'elles exprimaient certains marqueurs des neurones sensoriels périphériques : la périphérine et le Brn3A (Ferri et al., 1990; Ninkina et al., 1993; Portier et al., 1983; Valderrama and Misra, 2008). La périphérine indique également l'appartenance de ces neurones aux fibres nerveuses de type A δ et C (Bae et al., 2015; Ferri et al., 1990). L'absence de marquage du NF200 confirme l'absence de fibres nerveuses de type A β (données non montrées) (Bae et al., 2015; Perry et al., 1991). La présence de SP et de CGRP valide que les PC12 ont des caractéristiques de neurones périphériques avec un potentiel neurosécrétoire (Bae et al., 2015; Lindsay et al., 1989) (Figure 10). Cette caractéristique neurosécrétoire a déjà été montrée dans la littérature par la détection de catécholamines (Ahnert-Hilger et al., 1987). Les PC12 pourraient donc avoir un potentiel neurosécrétoire proche de celui des terminaisons nerveuses intra-épidermiques de type A δ ou C (Lindsay et al., 1989), ce qui pourrait convenir comme modèle de l'INC.

L'exocytose des neuropeptides est un événement initié par l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Ahnert-Hilger et al., 1987; Huang and Neher, 1996). Une grande variété de molécules, *via* leurs récepteurs et canaux calciques, peut déclencher une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire dans les neurones sensoriels. C'est le cas de la capsaïcine et de la tryptase qui activent respectivement TRPV1 et PAR-2 et

stimulent la sécrétion de neuropeptides par des mécanismes dépendants du Ca^{2+} (Jessell et al., 1978; Nguyen et al., 2003; Reed et al., 2003; Su et al., 2005). Nous avons confirmé la présence de TRPV1 (Someya et al., 2004) et détecté pour la première fois celle de PAR-2 dans les PC12 différenciées (Figure 11). Ceci suggère que les PC12, via l'activation de ces deux récepteurs, sont en mesure de déclencher une réponse calcique et de sécréter des neuropeptides.

Ces résultats préliminaires ont permis de montrer que les PC12 différenciées expriment des marqueurs neuronaux, qui plus est, des marqueurs du système nerveux périphérique, à savoir la périphérine et le Brn3A. De plus, la présence de neuropeptides dont la SP et le CGRP, connus pour leur rôle prédominant dans l'INC, confirme leur potentiel neurosécrétoire (Gouin et al., 2015b; Steinhoff et al., 2003a). La détection des récepteurs (TRPV1 et PAR-2) spécifiques de l'INC et du prurit confirment que ces cellules pourraient être activables et donc être utilisées dans notre modèle (Boillat et al., 2014; Ma, 2002; Roosterman et al., 2006; Stefansson et al., 2008). L'ensemble de ces premiers résultats positionne les PC12 comme candidats neuronaux idéals dans l'étude de l'INC. Ces résultats ne peuvent pas valider, à eux seuls, les PC12 comme modèle de neurones sensoriels. Il reste à définir la fonctionnalité des récepteurs dont l'expression a été validée par immunocytochimie dans notre modèle.

2. Etude de la fonctionnalité de PAR-2 et TRPV1 dans les PC12

Nous avons procédé à des expériences d'imagerie calcique en connaissance de la signalisation consécutive à l'activation de ces récepteurs (Amadesi et al., 2004; Cholewinski et al., 1993; Dai et al., 2007). L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire étant un pré-requis pour la libération de neuropeptides impliqués dans l'INC, nous avons étudié la capacité des PC12 à induire des variations calciques suite à l'activation de TRPV1 et PAR-2. Nous avons montré que les agonistes de TRPV1 (capsaïcine) et de PAR-2 (SLIGKV) n'ont aucun effet sur le Ca^{2+} intracellulaire dans les PC12, alors qu'ils provoquent une augmentation dans les kératinocytes. Nous avons conclu que les agonistes sont fonctionnels et donc que TRPV1 ou PAR-2 pourraient être altérés dans les PC12. L'équipe de Someya a montré que les PC12 sont difficilement activables par la capsaïcine et ils ont conclu que les voies de signalisation pourraient être altérées ou que le canal TRPV1 serait moins sensible à

la capsaïcine dans ces cellules (Someya et al., 2004). L'absence de variation calcique suite à l'activation de PAR-2 pourrait s'expliquer, d'une part, par une faible expression de PAR-2 et d'autre part, que la signalisation calcique à l'origine de l'activation de PAR-2 est dépendante, en aval de l'ouverture de TRPV1 (Chen et al., 2015; Dai et al., 2007; Lee et al., 2010a). Nos résultats rejoignent ceux de la littérature sur la difficulté d'activation des PC12, remettant en cause la pertinence de notre modèle pour étudier les mécanismes moléculaires de l'INC. Ces travaux seront repris ultérieurement au sein du laboratoire, où nous tenterons de transfecter de manière stable les PC12 avec un plasmide d'expression de TRPV1 et/ou de PAR-2 afin de développer un modèle neuronal fonctionnel de l'INC.

D. Conclusion et perspectives

Nous avons montré que les PC12 différenciées par le NGF expriment certains marqueurs neuronaux tels que le PGP9.5 et les neurofilaments (PanNF). La détection du Brn3A et de la périphérine les apparente aux neurones sensoriels périphériques associés aux fibres nerveuses de type A δ et C. La présence de neuropeptides suggère un potentiel neurosécrétoire intéressant pour étudier les mécanismes cellulaires de l'INC. Nous avons également mis en avant la présence de TRPV1 et PAR2, deux récepteurs bien connus dans la physiopathologie de l'INC, dont l'activation conduit à la libération de neuropeptides *via* des mécanismes dépendants du Ca²⁺ intracellulaire. Cependant, l'étude de la fonctionnalité en imagerie calcique des PC12 différenciées, suite à l'activation de TRPV1 et PAR-2, n'a pas été concluante. Ces données suggèrent que nos récepteurs n'étaient pas fonctionnels ou que les voies de signalisation intracellulaire dans les PC12 sont altérées. Nous avons arrêté temporairement ce projet suite à des difficultés rencontrées dans la transfection des plasmides d'expression de TRPV1. Il serait néanmoins intéressant de transfecter de manière stable les PC12 avec des vecteurs d'expression de TRPV1 et PAR-2, afin de répondre à la problématique sur leur fonctionnalité. Si ce modèle s'avère fonctionnel après la transfection, nous analyserons le niveau de sécrétion de neuropeptides suite à l'activation de TRPV1 et de PAR-2 comparativement aux neurones sensoriels issus des GRD de rat.

Chapitre II. Criblage de l'expression de gènes régulés par l'activation de PAR-2 et PAR-4 dans les GRD et les DhPK

A. Introduction

Les protéases sont des acteurs majeurs dans le développement pathologique de certaines dermatoses prurigineuses comme le psoriasis la DA et le NS (Briot et al., 2009; Kempkes et al., 2014; Steinhoff et al., 2000, 2003b; Tsujii et al., 2008). Ces protéases participent activement à l'inflammation en stimulant les PARs, dont PAR-2 et PAR-4, qui sont exprimés par les deux composantes majeures de l'INC, que sont les neurones sensoriels et les kératinocytes (Cocks and Moffatt, 2000; Guenther and Melzig, 2015; Zhao et al., 2014b). Ce sont des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) de type « one shot » dont leur activation par clivage déclenche leur internalisation et dégradation. Leur activation induit également l'expression de gènes potentiellement impliqués dans l'INC par des mécanismes dépendants de NFAT/NF- κ B et du Ca^{2+} (Asfaha et al., 2007; Lee et al., 2010a). Bien que certains travaux aient mis en évidence le rôle de PAR-2 dans la sécrétion de neuropeptides par les neurones sensoriels, son rôle dans l'entretien de l'INC par l'expression d'autres médiateurs de l'inflammation reste à déterminer. Le rôle de PAR-4 dans l'INC reste encore largement discuté, mais des études portant sur les kallikréines dans le NS nous laissent supposer sa possible implication (Briot et al., 2009; Furio et al., 2014; Oikonomopoulou et al., 2006). Dans les kératinocytes basaux non différenciés, l'activation de PAR-2 déclenche la libération de la cytokine TSLP qui agit directement sur les neurones sensoriels induisant l'INC et le prurit (Wilson and Bautista, 2014; Wilson et al., 2013a, 2013b). Cependant, les kératinocytes basaux sont minoritairement représentés dans l'épiderme et semblent avoir des voies calciques différentes des kératinocytes différenciés (Bikle and Mauro, 2014; Vandenberghe et al., 2013). De plus, PAR-2 est surexprimé dans les couches suprabasales de l'épiderme (Mascia et al., 2002; Steinhoff et al., 1999) et les données concernant les kératinocytes différenciés sont quasi-inexistantes. Avec l'objectif de comprendre le rôle de PAR-2 dans l'épiderme, nous nous sommes intéressés aux kératinocytes différenciés et à leur implication dans l'INC.

Nous avons étudié le rôle de ces deux PARs dans le développement et l'entretien de l'INC à partir de cultures primaires de neurones sensoriels issus des GRD de rat et de kératinocytes humains différenciés (DhPK). Pour ce faire, nous avons analysé l'impact de l'activation de PAR-2 et PAR-4, par leurs peptides agonistes respectifs,

en réalisant un criblage de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation dans ces deux types cellulaires. Nous avons choisi de nous focaliser sur 5 grandes classes de médiateurs (neuropeptides, neurotrophines, cytokines, facteurs de croissance et MMPs) ainsi qu'aux jonctions cellulaires.

Les neuropeptides exercent une fonction neuromodulatrice et sont impliqués dans des réactions cutanées normales ou pathologiques. Ils sont principalement sécrétés par les neurones sensoriels et sont de nature variée. Nous avons focalisé notre travail sur 4 d'entre eux : le CGRP- α , le GRP, la SP et le VIP. Ils sont impliqués dans plusieurs réactions inflammatoires ayant une part neurogène telles que la cicatrisation, la douleur et le prurit (Akiyama et al., 2014; Birklein and Schmelz, 2008; Chéret et al., 2013; Dallos et al., 2006; Kubanov et al., 2015; Muñoz and Coveñas, 2014; Smolyannikova et al., 2015; Wallengren, 1997). Ils sont également fortement incriminés dans certaines dermatoses prurigineuses inflammatoires où ils agissent sur des processus cellulaires tels que la la prolifération des cellules endothéliales et des kératinocytes ainsi que sur des processus tissulaires comme la vasodilatation (Ansel et al., 1990; Chu et al., 2000; Dallos et al., 2006; Haegerstrand et al., 1990; Paus et al., 1995; Wallengren, 1997), la dégranulation des mastocytes (Dallos et al., 2006; Kulka et al., 2008; Wallengren, 1997), le recrutement des neutrophiles (Perianin et al., 1989; Richter et al., 1992; Sung et al., 1992; Zimmerman et al., 1992) et l'activation des LT (Payan et al., 1983). Le GRP est suspecté de participer à l'INC associée ou non à un prurit. Son rôle dans le prurit non histaminergique reste néanmoins indéterminé et nécessite qu'on s'y intéresse (Weber, 2015).

Les neurotrophines sont des protéines de natures diverses et variées incluant le NGF, la NT3 et le BDNF (Chéret et al., 2013; Roosterman et al., 2006). Ce sont des facteurs essentiels à la survie et la différenciation des neurones du système nerveux périphérique (Montaño et al., 2010). Elles participent également au maintien de l'homéostasie cutanée ainsi qu'à l'organisation et au renouvellement de l'épiderme, ce qui peut avoir des conséquences indirectes sur l'INC (Chéret et al., 2013; Lebonvallet et al., 2010, 2013; Roosterman et al., 2006). A l'inverse, la Sema3A est un facteur de répulsion des nerfs provoquant la rétractation des cônes de croissance des neurones (Tang et al., 2004; Tominaga and Takamori, 2014;

Tominaga et al., 2008). L'innervation épidermique est finement régulée par la balance NGF/Sema3A. Une dérégulation de cette balance est retrouvée dans des dermatoses prurigineuses inflammatoires, et plus particulièrement la DA (Tominaga and Takamori, 2014). Chez les patients souffrants de DA, le niveau de Sema3A est fortement diminué dans l'épiderme (Tominaga and Takamori, 2014; Tominaga et al., 2008) alors que celui du NGF est augmenté, contribuant à une forte innervation de l'épiderme (Ikoma et al., 2006; Tominaga and Takamori, 2014).

Les facteurs de croissance sont des molécules importantes pour le maintien de l'homéostasie cutanée et de la fonction de barrière. Nous nous sommes focalisés sur certains d'entre eux : l'EGF, le FGF et le TGF- β . Ces trois facteurs sont impliqués dans les grandes fonctions de la peau comme la prolifération, la régénération ou encore la cicatrisation (Chéret et al., 2013; Cohen, 1993; Mascia et al., 2003; Roosterman et al., 2006). L'EGF joue un rôle dans des dermatoses prurigineuses inflammatoires incluant le psoriasis et la DA. En effet, l'inhibition ou la diminution de l'expression de l'EGFR est corrélée au développement ou l'exacerbation du psoriasis et de la DA avec une aggravation des lésions via la production de CXCL2, -5 et -6 et -10 par les kératinocytes (Mascia et al., 2003; Sääf et al., 2012; Zorzou et al., 2004). Le FGF et le TGF- β ont tout d'abord été localisés dans la couche basale de l'épiderme autour de zones de cicatrisation associées à des démangeaisons (Bikfalvi et al., 1997; Serini and Gabbiani, 1999). Ils sont tous deux libérés par les kératinocytes et régulent les processus de remodelage de la MEC, de prolifération et de migration des kératinocytes, des fibroblastes et des macrophages (Frank et al., 1996; Moroguchi et al., 2004; Nanney et al., 1996; Singer and Clark, 1999; Toriseva and Kähäri, 2009; Xie et al., 2008; Yang et al., 1999). Des souris déficientes FGFR-/- développent les signes cliniques de ces dermatoses prurigineuses avec une perte de la fonction barrière, une inflammation cutanée et une hyperprolifération des kératinocytes (Meyer et al., 2011; Sulcova et al., 2015; Yang et al., 2010b). Chez des patients ayant un psoriasis, la surexpression du FGF stimule l'hyperprolifération des kératinocytes et les signes cliniques de cette pathologie (Finch et al., 1997; Kovacs et al., 2005; Yao et al., 2014). Une dérégulation du FGF pourrait être associée à la diminution de la fonction barrière observée dans le psoriasis, DA ou encore le NS. Des souris surexprimant le TGF- β , au niveau de l'épiderme basal, développent un phénotype cutané qui regroupe

l'ensemble des caractéristiques de l'inflammation et du psoriasis (Li et al., 2004; Shull et al., 1992).

Les cytokines sont de petites molécules principalement impliquées dans les réponses immunitaires déclenchées par les cellules non-neuronales. Il nous paraissait possible que les neurones sensoriels puissent également sécréter des cytokines pour renforcer l'inflammation cutanée. C'est dans cet objectif que nous avons regardé le niveau d'expression de deux d'entre elles dans les neurones sensoriels, l'IL-6 et la TSLP, qui sont connues pour être augmentées et impliquées dans des dermatoses prurigineuses inflammatoires incluant le psoriasis et la DA (Briot et al., 2010; Wilson et al., 2013a). Dans les UhPK, PAR-2 est impliqué dans la production et la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 α , -1 β , -6 et -8, la TSLP, le TNF- α , la CXCL-1 et -8, la MMP-1, -2, -3 et -9 et le GM-CSF (Briot et al., 2010; Kubanov et al., 2015; Lee et al., 2010b, 2010b; Takei-Taniguchi et al., 2012; Wakita et al., 1997; Wilson et al., 2013a). De plus, la corrélation entre l'augmentation de l'IL-31 et la sévérité de la DA a été démontrée chez l'enfant (Kato et al., 2014; Siniewicz-Luzeńczyk et al., 2013). Nous avons focalisé le criblage dans les DhPK sur certaines cytokines : CXCL1 et -2, IL-1 β , -8 et -31, TNF- α et TSLP.

Les MMPs sont des enzymes protéolytiques sécrétées ou membranaires qui régulent un grand nombre de processus biologiques par clivage de diverses protéines circulantes, membranaires ou extracellulaires. Elles interviennent notamment dans le remodelage tissulaire lors de la cicatrisation, la signalisation intercellulaire, l'inflammation et l'angiogénèse (Egeblad and Werb, 2002; Kerkelä and Saarialho-Kere, 2003; Sternlicht and Werb, 2001)

Les jonctions cellulaires de types adhérentes (E-cad) et communicantes (Cx26 et Cx43) kératinocytaires sont indispensables au maintien de l'intégrité et de l'imperméabilité de l'épiderme. Certaines dermatoses prurigineuses inflammatoires sont associées à une dérégulation de ces jonctions conduisant à une perméabilité accrue et une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme semblables à celles observées dans le psoriasis. L'expression des jonctions communicantes et adhérentes sont dérégulées avec une augmentation de l'expression de la Cx26 et une diminution de celles de la Cx43 et la E-cad (Labarthe et al., 1998; Li et al., 2008). La dérégulation de ces jonctions provoque l'hyper-prolifération des

kératinocytes, la formation de plaques psoriasiques et des lésions associées à la perte de la couche granuleuse (Li et al., 2008; Martin et al., 2014; Scott et al., 2012). Ces jonctions nous paraissaient être de bonnes cibles pour un modèle de la dérégulation et de la perte de la stabilité de la barrière épidermique dans le psoriasis. Bien que PAR-2 soit connu pour être impliqué dans de nombreuses dermatoses prurigineuses, dont le psoriasis, son rôle dans l'homéostasie de la barrière cutanée reste méconnu (Briot et al., 2010; Furio et al., 2014; Gouin et al., 2015a; Lee et al., 2010a; Steinhoff et al., 2000; Takei-Taniguchi et al., 2012; Tanaka et al., 2011). C'est dans cet objectif que nous nous sommes intéressé au rôle de PAR-2 sur l'expression de la Cx26, de la Cx43 et de la E-cad.

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats du criblage des gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans nos deux types cellulaires.

B. Résultats

1. Expression de PAR-2 et PAR-4 dans les GRD et les DhPK

Dans le contexte de l'INC, nous nous sommes intéressés au rôle de PAR-2 et PAR-4 au niveau des deux composantes cellulaires majeures que sont les neurones sensoriels et les DhPK. Comme le montre la Figure 13, nous avons confirmé la présence de ces deux PARs en réalisant des expériences d'immunofluorescence sur les neurones sensoriels de rat. Ces résultats ont été confirmés en RT-qPCR pour PAR-2 ($22,2 \pm 0,3$ Ct ; Actine $19,9 \pm 0,3$ Ct ; $n = 3$) et pour PAR-4 ($24,7 \pm 0,5$ Ct ; Actine $19,9 \pm 0,3$ Ct ; $n = 3$). Pour les DhPK, nous avons confirmé l'expression génique et protéique de PAR-2 dans les DhPK ($22,8 \pm 0,4$ Ct ; Actine $21,1 \pm 0,3$ Ct ; $n = 3$), alors que celle de PAR-4 restait indétectable avec ces deux techniques (> 40 Ct ; Actine $21,1 \pm 0,3$ Ct ; $n = 3$).

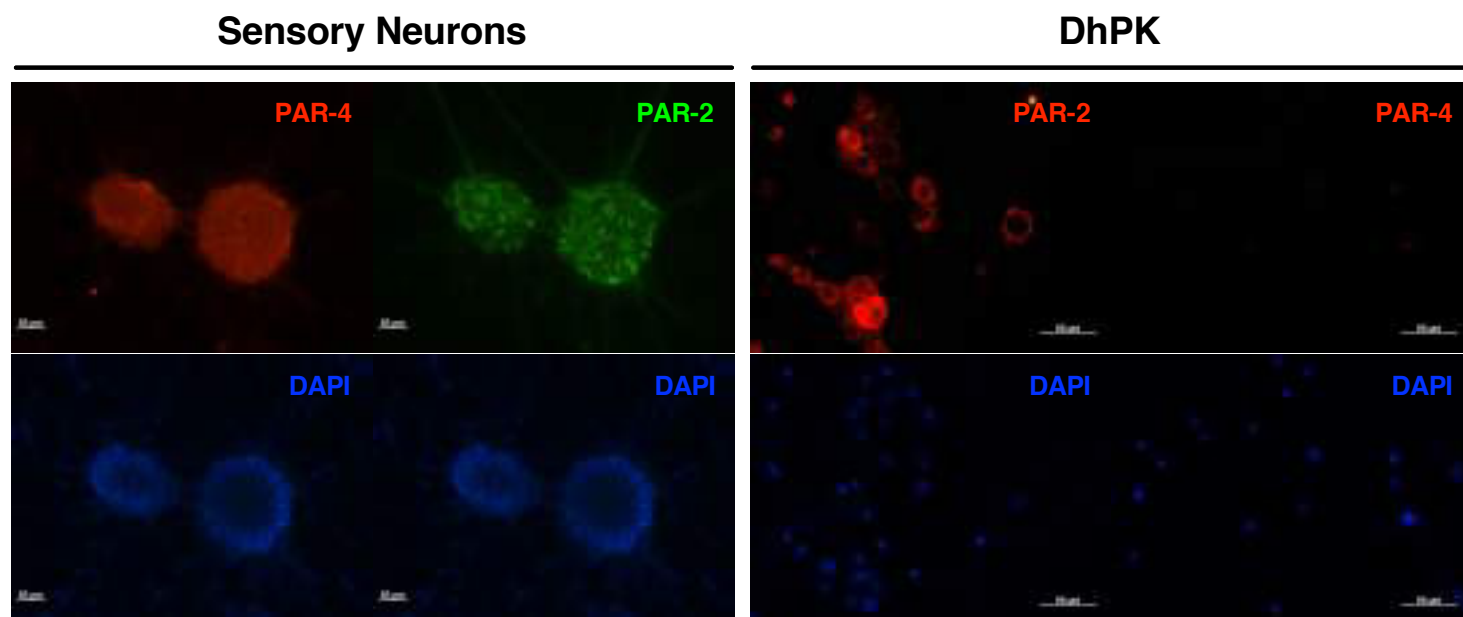


Figure 13. Détection de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels de rat et les DhPK.

Images obtenues par immunofluorescence de PAR-2 et PAR-4 dans des cultures primaires de neurones sensoriels de rat issus des GRD et de DhPK. Les noyaux ont été colorés en bleu au DAPI. PAR-2 et PAR-4 ont été révélés en rouge par un anticorps secondaire couplé au TRITC. PAR-2 a été révélé en vert par un anticorps secondaire couplé au FITC. Ces images sont représentatives de $n = 3$ expériences indépendantes.

2. Criblage des gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels

Suite à la détection de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels de rat et les DhPK, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'activation de PAR-2 et PAR-4 sur l'expression de gènes impliqués dans l'INC. Nous avons passé au crible les transcrits de 13 gènes cibles impliqués dans l'inflammation comprenant des facteurs de croissance (EGF, FGF et TGF- β), des cytokines (IL-6 et TSLP), neurotrophines (BDNF, NT3, NGF, Sema3A) et des neuropeptides (CGRP- α , GRP, SP et VIP). Les variations de ces transcrits dans les neurones sensoriels de rat ont été analysées par RT-qPCR après 4 h de traitement avec 100 μ M des peptides agonistes de PAR-2 (SLIGKV) et de PAR-4 (GYPGQV), combinés ou seuls (Figure 14). Des contrôles négatifs à 100 μ M ayant la séquence inverse des peptides agonistes de PAR-2 (VKGILS) et de PAR-4 (VQGPYG) ont également été effectués.

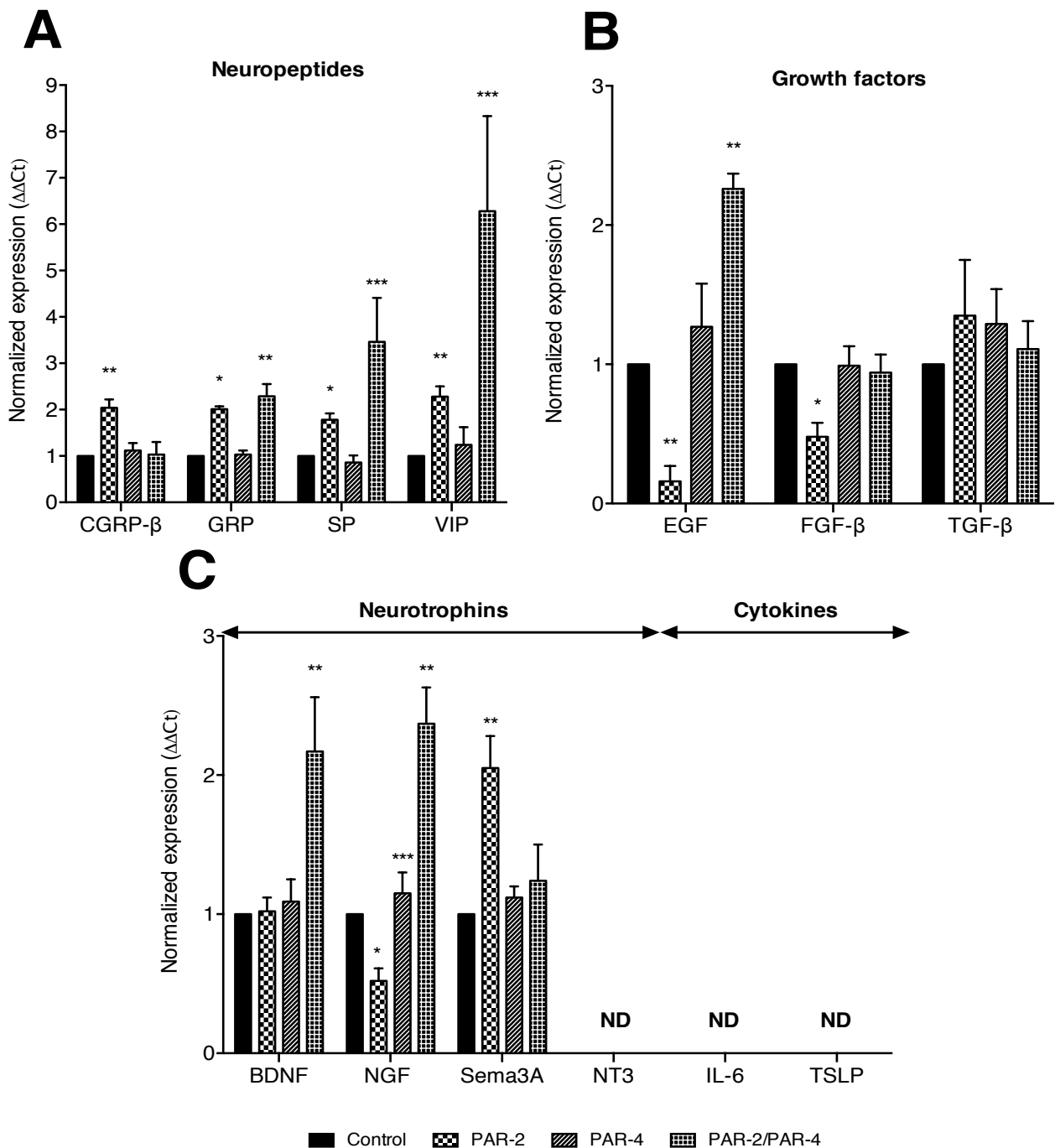


Figure 14. Criblage des gènes modulés par l'activation de PAR-2 et PAR-4 sur les neurones sensoriels de rat *in vitro*.

Graphiques représentant l'expression relative des gènes **A.** des neuropeptides, **B.** des facteurs de croissance, **C.** des neurotrophines et cytokines selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$ suite à l'incubation à 100 μM de SLIGKV et GYPGQV les peptides agonistes des PAR-2 et -4, combinés ou seuls, dans des cultures primaires de neurones sensoriels issus de GRD de rat. Les gènes d'intérêts étaient les suivants : BDNF, CGRP- α , EGF, FGF, NGF et Sema3A, $n = 4$; GRP, VIP et SP, $n = 3$; IL-6, NT3, TGF- β , et TSLP, $n = 2$. Les graphiques représentent les valeurs moyennes $\pm$ SEM de n expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test de Mann-Whitney : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ND = non détecté.

Nous avons confirmé que les contrôles négatifs, combinés ou seuls, n'induisaient pas de variations d'expressions en comparaison avec la condition contrôle non traitée (Annexe, Figure 22). Comme le montre la figure 14, 3 de nos gènes d'intérêts n'ont pas été détectés dans la condition contrôle et traitée par les agonistes de PAR-2 et PAR-4 : l'IL-6, la NT3 et la TSLP. Le peptide agoniste de PAR-2 (SLIGKV) régulait l'expression de 8 de nos 13 gènes d'intérêts comparativement à la condition contrôle. L'activation de PAR-2 diminuait de moitié ou plus l'expression de 3 gènes qui codent les facteurs de croissance (EGF, FGF et NGF). Il augmentait également de 2-fois l'expression des gènes des neuropeptides (CGRP- α , GRP, SP et le VIP) et de la Sema3A. Le peptide agoniste de PAR-4 (GYPGQV) n'impactait pas l'expression de 13 gènes d'intérêts en comparaison avec la condition contrôle. L'activation simultanée de PAR-2 et PAR-4 (SLIGKV + GYPGQV) modulait l'expression de 6 gènes d'intérêts comparativement aux contrôles. En parallèle, cette activation simultanée augmentait à minima de 2-fois l'expression du BDNF, de l'EGF, du GRP, du NGF, de la SP et du VIP. Cette double activation s'opposait aux résultats de l'activation unique du récepteur PAR-2.

3. Criblage des gènes modulés par PAR-2 dans les DhPK

Nous avons préalablement montré que les DhPK n'expriment pas PAR-4. Nous avons uniquement analysé l'impact de l'activation de PAR-2 sur l'expression de 21 gènes d'intérêts impliqués dans l'inflammation tels que des facteurs de croissance (EGF, FGF et TGF- β), des cytokines (CXCL-1 et -2, IL-1 β , -8 et -31, TNF- α et TSLP), des neurotrophines (BDNF, NGF, NT3 et Sema3A), des neuropeptides (CGRP- β , GRP), des jonctions intercellulaires (Cx26, Cx43 et E-cad) et de MMPs (MMP9 et -24). Les variations des transcrits d'intérêts dans les DhPK ont été analysées par RT-qPCR après 4 h de traitement avec 100 μ M du peptide agoniste de PAR-2 (SLIGKV) (Figure 15). Un contrôle négatif du peptide agoniste de PAR-2 a été effectué en utilisant 100 μ M de sa séquence inverse (VKGILS).

Tout d'abord, nous avons confirmé que le peptide contrôle (VKGILS) n'avait pas d'effet sur l'expression de 21 gènes d'intérêts en comparaison avec la condition non traitée (Annexe, Figure 23). Un de nos gènes d'intérêts (GRP) n'a pas été détecté dans la condition contrôle. Le peptide agoniste de PAR-2 (SLIGKV) modulait l'expression de 17 gènes d'intérêts comparativement à la condition contrôle. Comme

montré dans la figure 15, l'activation de PAR-2 diminuait de moitié l'expression de 4 gènes d'intérêts incluant 2 des facteurs de croissance (EGF et FGF), une cytokine (NGF) ainsi qu'une jonction communicante (Cx43). Il augmentait également à minima de 2-fois l'expression de 13 gènes d'intérêts incluant un neuropeptide (CGRP- β), des cytokines (CXCL1 et -2, IL-1 β , -8 et -31, Sema3A, TNF- α et TSLP), des jonctions intercellulaires (Cx26 et E-cad) et les MMPs (MMP9 et -24).

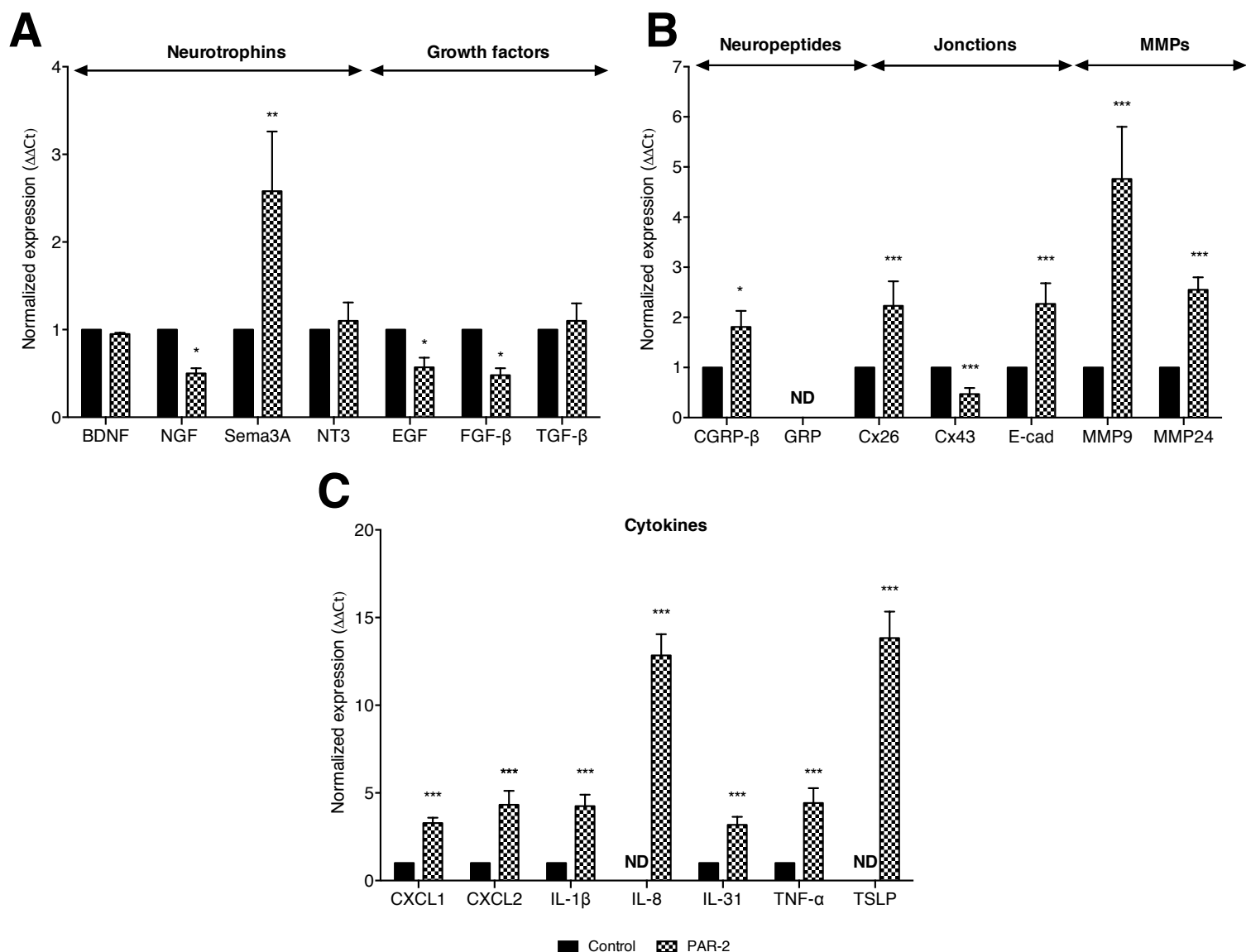


Figure 15. Criblage des gènes modulés par l'activation de PAR-2 dans les DhPK *in vitro*.

Graphiques représentant l'expression relative des gènes **A.** des neurotrophines, des facteurs de croissance, **B.** des neuropeptides, des jonctions, des MMPs et **C.** des cytokines selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$ suite à l'incubation de 100 μM de SLIGKV le peptide agoniste de PAR-2 dans les DhPK. Les gènes d'intérêts étaient les suivants : BDNF, EGF, FGF, TGF- β , CGRP- β , GRP, IL-8, IL-31, NGF, NT3 et Sema3A, $n = 3$; CXCL1, CXCL2, IL-1 β , TNF- α , TSLP, MMP9 et MMP24, $n = 6$; Cx26, Cx43 et E-cad, $n = 9$. Les graphiques représentent les valeurs moyennes $\pm$ SEM de n expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test de Mann-Whitney : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ND = non détecté.

C. Discussion

1. Détection de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels et les DhPK

Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence de ces deux récepteurs dans nos cultures primaires de neurones sensoriels issus de GRD de rat et de DhPK. Nous avons confirmé par immunomarquage et RTqPCR les résultats de la littérature, qui ont montré la présence de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels (Amadesi et al., 2006; Asfaha et al., 2007; Steinhoff et al., 2000; Vellani et al., 2010). Alors que la présence de PAR-2 a été confirmée dans les DhPK, celle de PAR-4 restait indétectable au niveau des ARNm et de la protéine, étant en accord avec d'autres travaux (Mascia et al., 2002; Steinhoff et al., 1999) (Figure 13).

2. Criblage des gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels

Bien que le rôle de PAR-2 dans la sécrétion de neuropeptides à partir des neurones sensoriels soit clairement établi, celui de PAR-4 reste encore méconnu (Chen et al., 2015; Fu et al., 2014; Liang et al., 2016; Obreja et al., 2006; Steinhoff et al., 2000; Vellani et al., 2010). Des études portant sur l'hyperactivité des kallicréines dans des souris SN, laissent suggérer un potentiel rôle de PAR-4 dans des processus inflammatoires puisque les kallicréines peuvent activer simultanément PAR-2 et PAR-4 (Furio et al., 2014; Hovnanian, 2013).

L'implication de PAR-2 et PAR-4 sur la régulation de l'expression de médiateurs de l'INC n'a pas fait l'objet de travaux approfondis. C'est dans cette optique que nous avons réalisé un criblage de gènes impliqués dans l'INC pouvant être régulés par l'activation de ces deux récepteurs. Pour cela, nous avons analysé l'expression de médiateurs de l'inflammation suite à l'activation de PAR-2 et PAR-4 par leurs peptides agonistes (SLIGKV et GYPGQV, respectivement), combinés ou seuls, dans les neurones sensoriels de rat (Figure 14). Nous avons choisi de nous focaliser sur 4 grandes classes de médiateurs : les neuropeptides, neurotrophines, les cytokines et les facteurs de croissance.

2.1. Les neuropeptides

Nous avons montré que l'expression de la SP, du CGRP- α , du VIP et du GRP était régulée à la hausse par l'activation de PAR-2 (SLIGKV) dans les neurones sensoriels de rat (Figure 14 A). D'une part, PAR-2 pourrait contribuer au développement/renforcement d'une inflammation de type neurogénique par la sécrétion de neuropeptides (Birklein and Schmelz, 2008; Herbert and Holzer, 2002). D'autre part, l'activation de PAR-2 pourrait être corrélée au développement pathogénique du psoriasis par une hyperprolifération des kératinocytaires et par le recrutement des neutrophiles, sous l'effet de la SP et du CGRP (Perianin et al., 1989; Richter et al., 1992; Sung et al., 1992; Zimmerman et al., 1992). L'agoniste peptide de PAR-4 (GYPGQV) n'avait aucun effet sur l'expression de nos neuropeptides. Il semblerait donc que l'activation seule de PAR-4 n'implique pas la production de neuropeptides de l'INC.

De manière intéressante, l'augmentation de l'expression de la SP, du VIP et du GRP induite par PAR-2 était renforcée par GYPGQV alors que celle du CGRP- α était diminuée. Ces données tendent à supporter une activité co-modulatrice de PAR-4 et PAR-2 en renforçant la production de neuropeptides.

Ces données démontrent pour la première fois que PAR-2 est un acteur majeur de la modulation de l'expression des neuropeptides dans les neurones sensoriels pouvant induire, entretenir et amplifier l'INC. PAR-4 semble être un modulateur de l'activité transcriptomique de PAR-2 en amplifiant la production de neuropeptides.

2.2. Les neurotrophines

L'activation de PAR-2 et PAR-4 n'avait pas d'impact sur l'expression du BDNF dans les neurones sensoriels de rat. Or, le BDNF est régulé à la hausse dans l'épiderme de patients souffrant de psoriasis et de DA (Fantini et al., 1995; Raap et al., 2005; Roosterman et al., 2006; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013). L'activation de PAR-2 et PAR-4 ne semble pas avoir d'effets sur la production de cette neurotrophine. Cependant, nous sommes dans un modèle *in vitro* ne permettant de définir un rôle précis de PAR-2 et PAR-4 dans la surexpression du BDNF comme constaté chez les patients atteints de psoriasis et DA.

Nous nous sommes également intéressés à la balance NGF/Sema3A, qui régule finement l'innervation cutanée. Nous avons montré que le déséquilibre NGF/Sema3A induit par PAR-2 dans notre modèle était à l'inverse de celui observé chez les patients DA et serait en faveur d'une diminution de la densité de l'innervation cutanée (Kamo et al., 2011; Tominaga and Takamori, 2014). Ces résultats pourraient néanmoins être reliés aux prurits associés à une diminution de la densité de l'innervation tels que le lichen amyloïde (Maddison et al., 2008), le prurigo nodulaire (Schuhknecht et al., 2011), l'eczéma nummulaire (Maddison et al., 2011), les chéloïdes (Tey et al., 2012) ou encore dans les peaux sensibles associées à une diminution de certaines fibres CGRP positives (Buhé et al., 2016). De nouveau, PAR-4 ne semblait pas impacter l'expression du NGF et de la Sema3A suggérant que son activation seule n'influence pas la balance NGF/Sema3A et donc l'innervation cutanée.

L'activation simultanée de PAR-2 et PAR-4 induisait une forte augmentation de l'expression du BDNF et serait compatible avec des dermatoses prurigineuses inflammatoires comme le psoriasis et la DA (Fantini et al., 1995; Raap et al., 2005; Roosterman et al., 2006; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013). La balance NGF/Sema3A était également impactée par la double activation de PAR-2 et PAR-4, qui serait en faveur d'une forte innervation de l'épiderme et d'une hyperprolifération des kératinocytes comme retrouvée dans la DA (Figure 14 C). Lors d'une co-activation des PARs, il semblerait que PAR-4 agisse comme un modulateur de l'activité de PAR-2 en inhibant la production de Sema3A et en favorisant celle du NGF.

2.3. Les facteurs de croissance

Nous avons montré que l'expression de l'EGF et du FGF était fortement diminuée par l'activation de PAR-2 alors que celle du TGF- β restait inchangée. De plus, l'activation de PAR-4 ne semblait pas impacter ces gènes. Par la diminution de l'EGF et du FGF, PAR-2 serait en faveur de la perte de la fonction barrière et de la production de chémokines par les kératinocytes. L'activation de PAR-2 pourrait conduire à l'exacerbation du psoriasis et au développement pathogénique de la DA (Meyer et al., 2011; Sulcova et al., 2015; Yang et al., 2010b).

L'activation en simultanée de PAR-2 et PAR-4 induisait l'augmentation de l'expression de l'EGF alors que celle du FGF et du TGF- β restait inchangée (Figure 14 B). Cette double activation pourrait également contribuer au développement des dermatoses prurigineuses favorisant l'hyperprolifération des cellules épithéliales (Finch et al., 1997; Kovacs et al., 2005; Yao et al., 2014). De plus, PAR-4 semblait de nouveau être un modulateur de l'activité de PAR-2 en augmentant l'expression de l'EGF et en inhibant celle du FGF, induite par PAR-2.

2.4. Les cytokines

L'expression de l'IL-6 et de la TSLP n'a pas été détectée dans nos cultures de neurones sensoriels activées ou non par le SLIGKV, le GYPGQV ou la combinaison des deux (Figure 14 C). PAR-2 et PAR-4 pourraient ne pas être impliqués dans la production de cytokines de l'inflammation où les neurones sensoriels ne seraient pas aptes à en synthétiser.

2.5. Conclusion sur le rôle de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels

Nous avons montré que l'activation de PAR-2, dans les neurones sensoriels, participe à l'inflammation neurogène par l'augmentation de la synthèse de neuropeptides tels que la SP, le VIP et le GRP. Cet effet pro-inflammatoire de PAR-2 est également retrouvé avec nos données obtenues pour les facteurs de croissance. En effet, l'activation de PAR-2 diminuait l'expression du NGF et du FGF ce qui pourrait conduire à la perte de la fonction barrière ainsi qu'à la production de chimokines par les kératinocytes. Étonnamment les résultats obtenus concernant les neurotrophines et la balance NGF/Sema3A sont plutôt en faveur d'une logique anti-inflammatoire et d'une diminution de l'innervation ce qui est contraire aux résultats de la littérature obtenues sur des modèles *in vivo et in vitro* de psoriasis et de DA. Ces différents résultats, à première vue contradictoires, pourraient s'expliquer de plusieurs manières :

- 1) La diminution de neurotrophines pourrait être liée à des mécanismes d'auto-régulations limitant la croissance neuronale et par conséquent ses effets sur l'épiderme ;

2) La temporalité d'analyse des données est différente entre *in vivo* et *in vitro*. En *in vivo*, le processus inflammatoire est déjà bien engagé avec une chronicité effective et une régulation altérée, alors qu'en *in vitro*, nous regardons l'induction du phénomène avec des mécanismes régulateurs potentiellement encore présents.

3) Le type de modèle utilisé (2D et monocellulaire), qui ne prend pas en compte les interactions neurones-kératinocytes qui sont connus pour réguler finement l'innervation épidermique. Un tel modèle pourrait avoir des effets négatifs sur la croissance neuronale comparativement à la physiopathologie DA observée sur des biopsies de peau de patients. Nous envisagerons ces expériences sur des co-cultures neurones-kératinocytes ainsi que sur explants de peau réinnervés pour nous rapprocher au plus des conditions physiologiques.

L'activation simultanée de PAR-2 et PAR-4 sur les neurones sensoriels, nous a servi de modèle d'étude des kallikréines qui sont connues activer simultanément ces deux récepteurs. Pour la première fois, nous avons montré que l'activation simultanée de ces deux récepteurs avait des effets synergiques ou inhibiteurs sur l'expression des neuropeptides, des neutrophines et des facteurs de croissance. L'activation de PAR-4 agirait comme un amplificateur de l'activité de PAR-2, en augmentant l'expression des neuropeptides comme la SP, le GRP et du VIP, en faveur de l'exacerbation de l'INC. PAR-4 aurait également des effets inhibiteurs de l'activité de PAR-2, en bloquant son effet sur les variations du CGRP, du FGF et de la Sema3A. Pour finir, il contrebalançait les effets de PAR-2, en favorisant l'augmentation d'expression du EGF et du NGF.

Ces effets inhibiteurs et de contre-balance de PAR-4 sur l'activité de PAR-2 pourraient servir de modèle d'étude de certaines kallikréines qui ciblent simultanément ces deux PARs. La double activation de PAR-2 et PAR-4 semblait être en faveur d'un processus inflammatoire par la dérégulation de la balance NGF/Sema3A associée à une forte innervation cutanée dans la DA. Globalement, nous pouvons dire que la double activation PAR-2/PAR-4 augmente la transcription de gènes de neuropeptides (CGRP β , SP, VIP) et de facteurs de croissance (FGF, EGF) qui sont connus pour être surexprimés et impliqués dans l'INC associée à certaines dermatoses.

Nous avons montré pour la première fois que l'activation PAR-2 dans les neurones sensoriels n'est pas uniquement liée à la sécrétion de neuropeptides mais également à la régulation de l'expression de neuropeptides, neutrophines et facteurs de croissance. Le rôle de PAR-4 semblait moins évident dans la régulation d'expression de gènes impliqués. De manière totalement inattendue, nous avons montré une co-régulation d'inhibition ou d'amplification entre PAR-2 et PAR-4. L'ensemble de ces éléments apporte un regard nouveau sur la chronicité des événements dans les dermatoses inflammatoires mais également sur les rôles joués pour chaque récepteur.

3. Criblage des gènes modulés par PAR-2 dans les DhPK

L'épiderme est en contact direct avec l'environnement extérieur et répond continuellement aux stimuli extérieurs assurant son rôle de barrière cutanée. Précédemment, nous avons montré par immunofluorescence que le récepteur PAR-4 n'était pas exprimé dans les DhPK (Figure 13). Nous avons focalisé notre recherche sur le rôle du récepteur PAR-2 qui est impliqué dans la modulation de certaines fonctions des kératinocytes. Son activation déclenche une réorganisation du cytosquelette, une réaction inflammatoire et une hyper-prolifération des kératinocytes, déstabilisant la barrière cutanée et facilitant l'entrée d'éléments exogènes (Braunstein et al., 1994; Ishikawa et al., 2009; Lee et al., 2010b; Santulli et al., 1995; Steinhoff et al., 1999; Takei-Taniguchi et al., 2012). Bien que de nombreux travaux ont démontré l'implication de PAR-2 sur la modulation de gènes impliqués dans l'inflammation des DhPK, aucune étude ne s'est intéressée à son rôle dans les DhPK. C'est dans cette optique que nous avons analysé la régulation de gènes impliqués dans l'INC, suite à l'activation de PAR-2 par son agoniste peptide (SLIGKV) dans les DhPK (Figure 15). Nous avons choisi de nous focaliser sur 6 grandes classes de médiateurs (cytokines, MMPs, neuropeptides, neurotrophines et facteurs de croissance) ainsi que sur les jonctions cellulaires.

3.1. Les cytokines

Nous avons montré que PAR-2 induisait dans les DhPK une hausse de l'expression de cytokines inflammatoires : l'IL-1 β , -8 et -31, le TNF- α , la TSLP et la CXCL-1 et -2 (Figure 15 C). L'augmentation de l'expression du TNF- α et de l'IL-1 β pourrait sensibiliser des neurones sensoriels *via* leur récepteur spécifique, conduisant à la sécrétion de neuropeptides et donc à l'INC (Binshtok et al., 2008; Gong et al., 2015; Inoue et al., 1999; Morioka et al., 2002; Oprée and Kress, 2000; Samad et al., 2001; Zhang et al., 2011). L'augmentation de la TSLP dans les DhPK pourrait être mise en parallèle avec celle observée dans les travaux de l'équipe de Wilson. Dans ces travaux, la production de TSLP par les UhPK déclenchait un prurit en stimulant les neurones sensoriels *via* la fixation à son récepteur (Wilson et al., 2013a), mais il n'est pas démontré que la TSLP peut déclencher une inflammation neurogène (Briot et al., 2010; Misery, 2014b; Ziegler et al., 2013). Il serait donc intéressant d'analyser le niveau de sécrétion de SP et CGRP par les neurones sensoriels suite à leur par la TSLP. Les CXCL sont des chimokines et constituent une superfamille de cytokines chimiotactiques produite après stimulation par des signaux de danger. Elles régulent l'activation, la différenciation ainsi que la migration des cellules immunitaires (cellules phagocytaires, cellules T, éosinophiles) (De Filippo et al., 2013; Ryser et al., 2014; Takei-Taniguchi et al., 2012). L'augmentation de la CXCL1 et -2 pourrait contribuer au déclenchement ou l'amplification de la réponse inflammatoire. Nos résultats peuvent être mis en parallèle de ceux de la littérature et confirment le rôle majeur de PAR-2 dans l'inflammation associée à certaines dermatoses prurigineuses *via* la production de médiateurs inflammatoires à partir des DhPK.

3.2. Les MMPs

L'activation de PAR-2 augmentait également l'expression de MMPs : une soluble, la MMP-9, et une membranaire, la MMP-24 (Figure 15 B). La synthèse de la plupart des MMPs est négligeable dans le tissu conjonctif cutané. En revanche, des quantités importantes en sont retrouvées dans la MEC au cours des lésions, de l'inflammation, la cicatrisation ou des diffusions métastatiques de cellules cancéreuses (Altrichter et al., 2009; Caley et al., 2015; Egeblad and Werb, 2002; Lee et al., 2010b, 2009; Sternlicht and Werb, 2001). L'activation de PAR-2 dans les

DhPK permettrait, *via* la surexpression des MMPs, de dégrader la MEC et de favoriser la migration des kératinocytes et la réponse inflammatoire.

3.3. Les neuropeptides

Les kératinocytes sécrètent également des neuropeptides dont l'isoforme β du CGRP est le principal représentant. Le CGRP- β est favorisé, par des voies autocrines/paracrines, la prolifération des kératinocytes et la production de cytokines kératinocytaires (Hou et al., 2011). Nous avons montré que l'activation de PAR-2 augmentait l'expression du CGRP- β dans les DhPK (Figure 15 B). Ces données novatrices suggèrent que PAR-2 pourrait induire ou renforcer une réponse inflammatoire à partir des DhPK via une action autocrine du CGRP- β .

3.4. Les neurotrophines

Les neurotrophines sont impliquées dans la survie et la différenciation des neurones du système nerveux périphérique (Oakley et al., 2000). Elles peuvent être également sécrétées par les kératinocytes (Ikoma et al., 2006; Oakley et al., 2000; Roosterman et al., 2006). Dans les DhPK, l'expression de la NT3, NT4 et du BDNF n'était pas modulée par PAR-2. En revanche, nous avons montré que PAR-2 déséquilibrait la balance NGF/Sema3A dans les DhPK, avec une diminution de l'expression du NGF et une augmentation de l'expression de la Sema3A (Figure 15 A). Ce déséquilibre de la balance serait donc en faveur d'une diminution de la densité de l'innervation cutanée, à l'inverse de celle observée chez les patients souffrants de DA (Kamo et al., 2011; Tominaga and Takamori, 2014). Le déséquilibre de la balance NGF/Sema3A dans les DhPK pourrait être relié aux prurits associés à une diminution de la densité de l'innervation (Buhé et al., 2016; Maddison et al., 2008, 2011; Schuhknecht et al., 2011; Tey et al., 2012). Cependant, le lien avec PAR-2 dans ces pathologies resterait à démontrer.

3.5. Les jonctions

Nous avons mis en évidence que l'activation de PAR-2 augmentait l'expression de la Cx26 et de la E-cad alors qu'elle diminuait celle de la Cx43 dans DhPK (Figure 15 B). Nos résultats sont à mettre en parallèle avec ceux de la littérature, confortant que

PAR-2 pourrait entraîner une hyperkératose et le détachement de la couche granuleuse dans le psoriasis par la dérégulation des jonctions communicantes (Labarthe et al., 1998; Martin et al., 2014; Scott et al., 2012). Les résultats obtenus pour la E-cad étaient à l'inverse de ceux attendus de la littérature (Figure 15 B) qui montraient une diminution de l'expression de la E-cad chez des patients souffrants de psoriasis (Li et al., 2008). L'augmentation de l'expression de la E-cad obtenue pourrait induire une augmentation des adhérences intercellulaires associée à l'hyperkératose ou une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme.

3.6. Les facteurs de croissance

L'activation de PAR-2 dans les DhPK diminuait l'expression de l'EGF (Figure 15 A). Cette diminution pourrait être mis en parallèle de l'inhibition de l'EGFR dans les kératinocytes qui contribuerait au développement ou à l'exacerbation du psoriasis et de la DA. Afin de compléter notre modèle et vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser également l'expression de l'EGFR dans les DhPK. Une dérégulation à la hausse ou à la baisse du FGF est associée à la perte de la fonction barrière, l'inflammation cutanée et l'hyperprolifération des kératinocytes (Finch et al., 1997; Meyer et al., 2011; Sulcova et al., 2015; Yang et al., 2010b). Dans nos travaux, nous avons mis en évidence que l'activation de PAR-2 dans les DhPK induisait une diminution de l'expression du FGF alors que l'expression du TGF- β restait inchangée. Cette diminution d'expression du FGF et l'absence de variation du TGF- β suite à l'activation de PAR-2 pourrait contribuer à un processus de cicatrisation altéré ainsi qu'à des dermatoses prurigineuses probablement dues à la perte de la fonction barrière et l'hyperprolifération des kératinocytes.

3.7. Conclusion sur PAR-2 dans les DhPK

De manière globale, l'activation de PAR-2 dans les DhPK conduit à l'expression de médiateurs de l'inflammation incluant essentiellement des cytokines inflammatoires et des MMPs. Ces deux classes de molécules, retrouvées fortement augmentées dans de nombreuses dermatoses prurigineuses, permettent le recrutement des cellules de l'immunité et le remodelage de la MEC. PAR-2 contribuerait donc activement au développement de ces dermatoses *via* de la production de cytokines et de MMPs issues des DhPK.

PAR-2 impacterait également la fonction barrière de l'épiderme en dérégulant les jonctions communicantes telles que la Cx26 et Cx43 qui sont des marqueurs du psoriasis où elles sont associées à une hyperkératose et au décollement de la granuleuse. Les résultats obtenus avec la jonction adhérente, E-cad, sont en contradiction avec ceux de la littérature. Ceci peut s'expliquer par le fait que nos résultats sont obtenus à partir de conditions *in vitro* dans un modèle où nous sommes les initiateurs du phénomène, tandis qu'*in vivo* le psoriasis est déjà en place. L'activation de PAR-2 dans les DhPK contribuait également à la diminution de l'expression de facteurs croissance comme l'EGF et le FGF, qui sont également connus pour être diminués dans les dermatoses prurigineuses. L'activation de PAR-2 pourrait contribuer à la perte de la fonction barrière et à l'entrée de nouveaux agents pathogènes, aggravant et exacerbant les dermatoses.

De manière intéressante, PAR-2 dérégulait la balance NGF/Sema3A en faveur d'une diminution de l'innervation intra-épidermique. Ces résultats sont en opposition avec ceux de l'équipe de Tominaga qui montraient une balance NGF/Sema3 en faveur d'une augmentation de l'innervation intra-épidermique dans la DA (Tominaga et al., 2008). Nos résultats pourraient néanmoins être reliés aux prurits associés à une diminution des fibres intra-épidermiques (Buhé et al., 2016; Maddison et al., 2008, 2011; Schuhknecht et al., 2011; Tey et al., 2012).

D. Corrélation des résultats du criblage de PAR-2 dans les neurones sensoriels et les DhPK

Étant donnée leur localisation dans l'épiderme, les neurones sensoriels et les DhPK peuvent donc être activées en même temps par les protéases dans un contexte d'inflammation. Jusqu'à maintenant, nous avons analysé les résultats du criblage de l'activation de PAR-2, dans ces deux types cellulaires en séparé. Or, les fibres intra-épidermiques traversent l'épiderme et terminent dans la couche granuleuse où ils communiquent directement avec les kératinocytes différenciés (Gouin et al., 2015b; Talagas and Misery, 2015). Dans cette partie, nous mettrons en corrélation les résultats du criblage de PAR-2 dans les cultures primaires de neurones sensoriels de rat et les DhPK. Cette comparaison permettra de savoir si les modifications transcriptionnelles induites par PAR-2 dans ces deux types cellulaires vont dans le même sens ou s'opposent.

L'activation de PAR-2 augmentait, autant l'expression de neuropeptides dans les neurones sensoriels (SP, GRP, VIP et CGRP- α), que dans les DhPK (CGRP- β). Cette augmentation globale de neuropeptides dans l'environnement lésionnel conduirait au développement et à l'entretien de l'INC. Dans les DhPK, l'activation de PAR-2 était également responsable de la production de cytokines inflammatoires et de MMPs. Par cette production, PAR-2 pourrait déclencher ou entretenir des mécanismes inflammatoires retrouvés dans le psoriasis ou la DA.

La diminution de l'expression de l'EGF et du FGF dans les neurones sensoriels a été retrouvée dans les DhPK. Ces données démontrent une action synergique de PAR-2 sur ces deux types cellulaires. L'activation de PAR-2 pourrait être responsable du développement et de l'exacerbation de dermatoses prurigineuses en induisant la perte de la fonction barrière et l'hyperprolifération des kératinocytes. Ces résultats peuvent également être en lien avec la dérégulation des Cx26 et Cx43 retrouvée lors de l'activation de PAR-2 dans les DhPK. En effet, l'augmentation de Cx26 et la diminution de la Cx43 pourraient être utilisées comme marqueur du développement du psoriasis associé à la perte de la fonction barrière.

La balance NGF/Sema3A était dérégulée dans les neurones sensoriels et les DhPK suite à l'activation de PAR-2, avec une augmentation de l'expression de la Sema3A et une diminution de celle du NGF. Cette dérégulation de la balance serait en faveur d'une diminution de la densité des terminaisons intra-épidermiques. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux de la littérature qui montraient une expression inverse de la balance NGF/Sema3A, conduisant à une augmentation de l'innervation dans de nombreuses dermatoses prurigineuses.

Nos résultats préliminaires sur le criblage des gènes modulés par PAR-2 semblent être cohérent entre les neurones sensoriels et les DhPK. Ces modulations d'expression induites par PAR-2 seraient en faveur de la déstabilisation de la barrière cutanée et du développement de l'INC observés dans le psoriasis et la DA. PAR-2 favoriserait également la diminution des fibres intra-épidermiques, ce qui est à l'inverse de la DA ou du psoriasis. Ceci pourrait s'expliquer par :

- notre modèle d'étude unicellulaire : afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'activation de PAR-2 sur la balance NGF/Sema3A dans des co-cultures hétérologues de neurones sensoriels de rat et de DhPK ou sur

des modèles d'explants de peau humaine réinervés par des neurones sensoriels de rat. Ce système hétérologue serait indispensable, car il nous permettrait d'analyser les variations d'expression induites par PAR-2 dans les deux types cellulaires.

- l'utilisation d'un modèle *in vitro* où nous sommes initiateur du processus inflammatoire, alors qu'*in vivo*, le processus inflammatoire des dermatoses est déjà bien engagé avec des systèmes régulateurs altérés. Il serait intéressant de réaliser des cultures sur des temps plus longs ou d'utiliser des cellules issues de patients pathologiques afin de conforter les résultats du criblage de PAR-2.

Afin de compléter les résultats du criblage sur les neurones sensoriels et les DhPK, il serait nécessaire d'analyser si les variations des transcrits observées sont retrouvées au niveau des protéines correspondantes. Dans un second temps, il serait intéressant d'analyser l'impact au niveau biologique de ces modulations en analysant des expériences de croissance neuronale, ou de prolifération des kératinocytes dans un modèle d'épiderme reconstruit. Comme les activations de PAR-2 et PAR-2/PAR-4 donnent des résultats intéressants sur nos 2 types cellulaires, il serait également judicieux de réaliser une étude plus large de la modulation des transcrits en utilisant des puces à ARN.

Chapitre III. Effets de l'eau thermale d'Uriage sur les gènes modulés par PAR-2 dans les DhPK

A. Introduction

Depuis l'Antiquité, les sources d'eaux thermales sont connues pour posséder des effets bénéfiques sur certains troubles cutanés et ORL (Clavie, 1961; Lee et al., 2014).

Par sa concentration en sels minéraux, la présence de calcium, de magnésium et sa teneur en silicium, l'eau thermale d'Uriage assure l'hydratation et la protection de la peau, mais aussi l'apaisement des peaux sensibles en renforçant son film hydrolipidique. Sa teneur en sels minéraux lui confère également une propriété naturellement isotonique, tel un sérum physiologique. Par cette propriété isotonique, elle n'altère en rien l'activité des cellules et respecte l'homéostasie de la peau.

Les mécanismes d'action de l'eau thermale d'Uriage sont encore mal connus et sont devenus un enjeu majeur pour les laboratoires dermatologiques d'Uriage. C'est dans cet objectif qu'ils ont développé, en partenariat avec notre laboratoire, des travaux de recherche basés sur des tests *in vitro*. Le but de ces tests était de comprendre les bienfaits de l'eau thermale d'Uriage en se basant sur la physiopathologie de dermatoses prurigineuses inflammatoires, dans lesquelles PAR-2 est un acteur majeur.

Or, nous avons préalablement montré que PAR-2 induisait une modulation de nombreux gènes incluant des cytokines, des MMPs et des jonctions communicantes dans les DhPK (Figure 15). C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'effet de l'eau thermale d'Uriage sur certains gènes qui ont été préalablement modulés par PAR-2 tels que les Cx26 et -43, les CXCL1 et -2, le TNF- α , IL-1 β , la TSLP et la MMP9.

B. Résultats

Les DhPK ont été traités ou non avec 100 μ M du peptide agoniste de PAR-2 (SLIGKV) dans le milieu de culture dilué au 1/2 dans de l'eau thermale d'Uriage. En contrôle de la dilution de l'eau thermale d'Uriage, le milieu de culture a été dilué au 1/2 dans du sérum physiologique ayant une composition isotonique comme l'eau thermale d'Uriage.

Avec pour objectif de déterminer l'impact de l'eau thermale d'Uriage sur la viabilité des DhPK, un test MTT a été réalisé après 4 h d'incubation correspondant au temps d'incubation pour la RT-qPCR. Comme le montre la figure 16, la dilution au 1/2 avec l'eau thermale d'Uriage ou le sérum physiologique n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire, en comparaison avec la condition contrôle (milieu non dilué). En contrôle positif de la viabilité cellulaire, les cellules ont été lysées avec 1X de tampon de lyse montrant une forte diminution de 80% de la viabilité cellulaire.

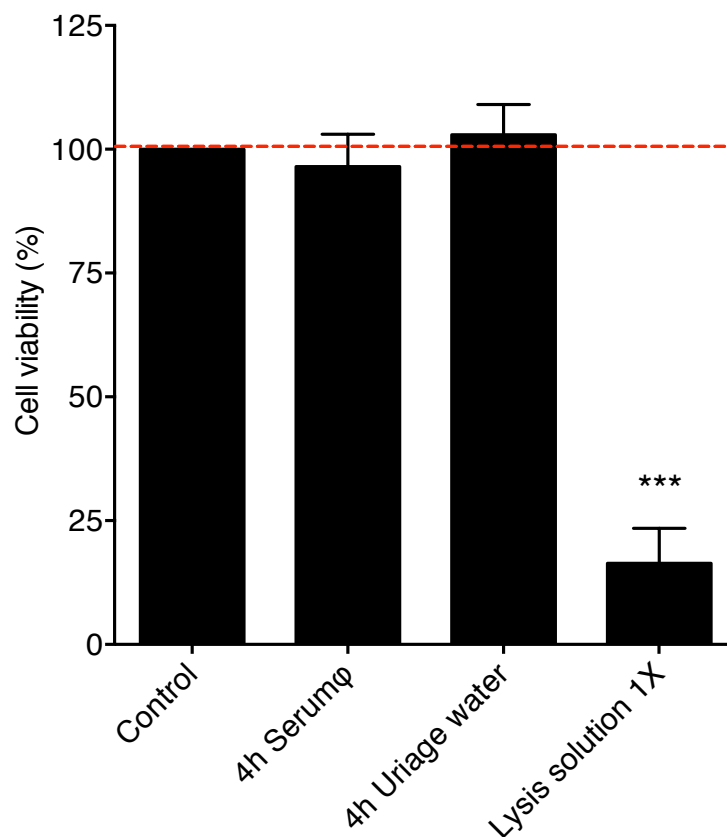


Figure 16. Effet de l'eau thermale d'Uriage sur viabilité cellulaire des DhPK.

Graphique représentant la viabilité cellulaire des DhPK en réponse à la dilution du milieu de culture au 1/2 avec l'eau thermale d'Uriage (Uriage water) ou le sérum physiologique (Sérum φ) après 4 h d'incubation. Le tampon de lyse à 1X a été utilisé en contrôle positif. Le graphique représente les valeurs moyennes $\pm$ SEM de $n = 3$ expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test de Mann-Whitney : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = non significatif.

Nous avons tout d'abord constaté que la dilution du milieu au 1/2, avec l'eau thermale d'Uriage ou avec le sérum physiologique, n'avait pas d'influence sur la modulation de l'expression de nos 8 gènes d'intérêts. Dans la condition sérum physiologique, le SLIGKV modulait de manière similaire l'expression de nos 8 gènes d'intérêts observée durant le criblage (Figure 17). Il augmentait l'expression de la Cx26, des

CXCL1 et -2, du TNF- α , de l'IL-1 β , de la TSLP et de la MMP9, alors qu'il diminuait celle de la Cx43. Dans la condition avec l'eau thermique d'Uriage traitée avec le SLIGKV, les variations d'expression de nos 8 gènes semblaient être très faibles ou absentes en comparaison avec la condition sérum physiologique traitée par le SLIGKV (Figure 17).

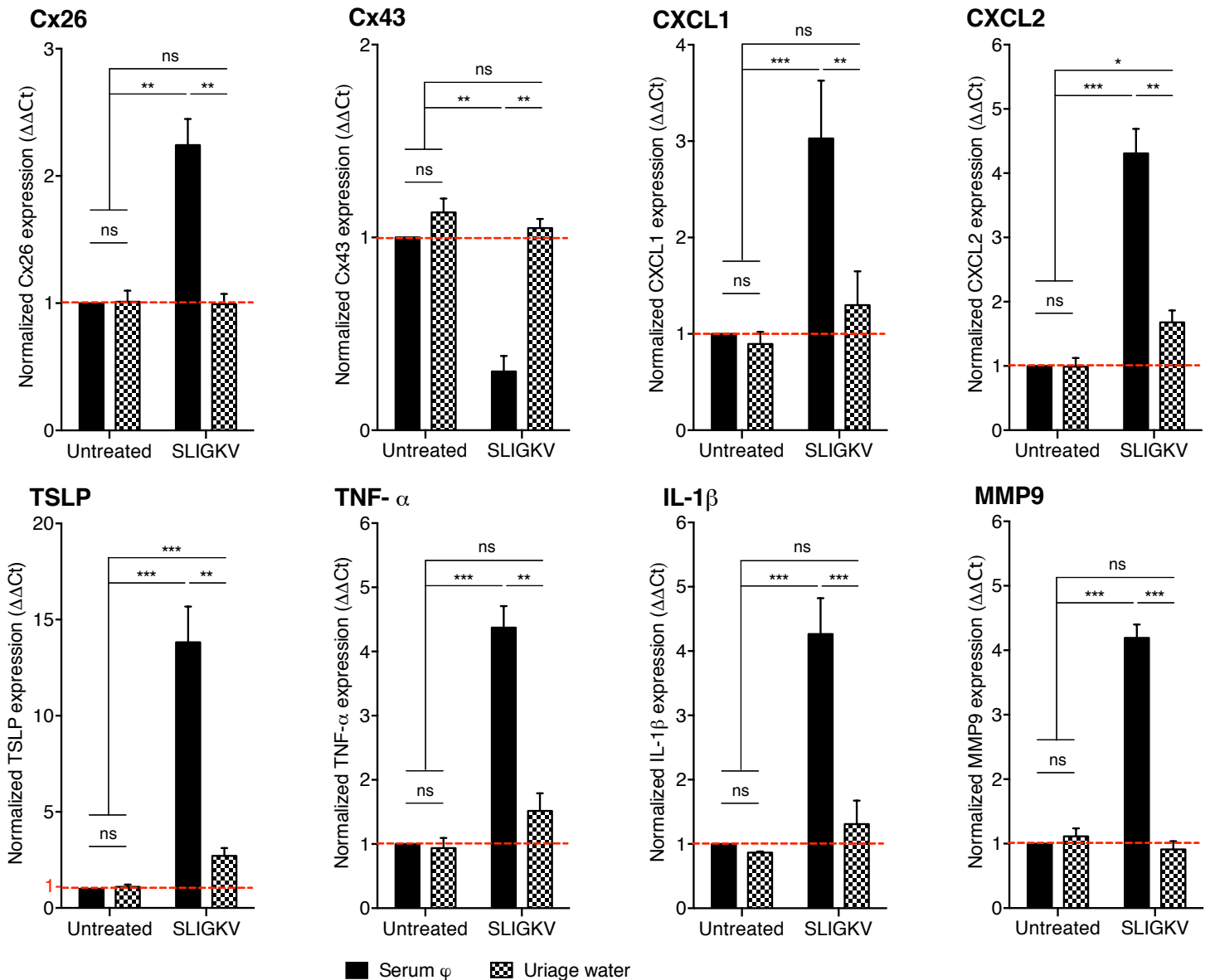


Figure 17. Effets de l'eau thermique d'Uriage sur la modulation de l'expression de la Cx26 et -43, les CXCL1 et -2, le TNF- α , IL-1 β , la TSLP et la MMP9 induite par PAR-2 dans des DhPK.

Graphiques représentant l'expression relative de 8 gènes d'intérêts selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$ suite à l'incubation sur 4 h de 100 μM du SLIGKV, le peptide agoniste de PAR-2, sur les DhPK dans le milieu de culture dilué au 1/2 avec l'eau thermique Uriage (Uriage water) ou avec du sérum physiologique (Sérum ϕ). Le graphique représente les valeurs moyennes $\pm$ SEM de $n = 3$ expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test ANOVA one-way : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = non significatif.

C. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons analysé les bienfaits de l'eau thermale d'Uriage sur la modulation des jonctions communicantes (Cx26 et -43), des cytokines (CXCL1 et -2, TNF- α , IL-1 β , TSLP) et une MMP (MMP9) induite par PAR-2 dans DhPK (Figure 15 et 17).

Dans un premier temps, nous avons montré que l'eau thermale d'Uriage n'avait pas d'impact sur la viabilité des DhPK et sur l'expression de nos gènes d'intérêts en comparaison avec le sérum physiologique (Figure 16). Ces résultats valident que l'eau thermale, par sa composition en sels minéraux lui confère un caractère isotonique, n'altérant en rien l'activité des cellules et respecte parfaitement la peau (Joly et al., 2012). Ceci a également permis de confirmer que les variations observées dans les DhPK provenaient bien de l'effet de l'eau thermale d'Uriage et non d'un effet cytotoxique ou de l'impact de la dilution du milieu de culture après 4 h d'incubation.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que les variations d'expression précédemment induites par PAR-2, dans le milieu dilué ou non avec du sérum physiologique, n'étaient pas retrouvées dans la condition avec l'eau thermale d'Uriage (Figure 17). En effet, l'augmentation de l'expression des transcrits induits par PAR-2, pour les gènes des Cx26 et -43, des CXCL1 et -2, du TNF- α , de l'IL-1 β , de la TSLP et de la MMP9, était fortement diminuée dans les DhPK traités avec l'eau thermale d'Uriage (Figure 15 et 17).

Les résultats sur les Cx26 et Cx43 peuvent être en mis en parallèle avec ceux de l'équipe du Dr Joly dans lesquels l'eau thermale d'Uriage renforce et réhydrate la barrière cutanée en augmentant l'expression de jonctions (Joly et al., 2012). La dérégulation des Cx26 et Cx43 induite par PAR-2 pourrait également être en lien une hyperkératose et le détachement de la granuleuse dans le psoriasis (Labarthe et al., 1998; Martin et al., 2014; Scott et al., 2012). Ceci suggère que l'eau thermale d'Uriage pourrait être une bonne alternative aux traitements conventionnels du psoriasis en rétablissant un niveau d'expression normal des jonctions communicantes. Il serait également bon de diriger nos recherche sur la filaggrine qui est impliquée dans la différenciation terminale des kératinocytes dans la couche

granuleuse et donc dans la fonction barrière de l'épiderme. Sa mutation est facteur de risque important dans la DA avec la perte de la fonction barrière associée au décollement et à une diminution de l'hydratation de la couche granuleuse (Cabanillas and Novak, 2016; Seguchi et al., 1996). Nous vérifierons, d'une part, si l'activation de PAR-2 diminue l'expression de la filaggrine et, d'autre part, l'impact de l'eau thermale sur son expression. Cette même filaggrine est sécrétée et clivée en petits acides aminés que sont les NMF. Pour finir, nous vérifierons l'impact de l'activation de PAR-2 sur l'hydratation de la barrière cutanée en regardant les variations du NMF (Kezic et al., 2009; Rawlings and Harding, 2004). Si ce dernier est diminué par l'activation de PAR-2, nous tenterons de voir si l'eau thermale d'Uriage peut favoriser sa production, rejoignant ainsi les travaux de l'équipe du Dr Joly (Joly et al., 2012).

Le TNF- α et l'IL-1 β sont des molécules inflammatoires et sensibilisatrices des neurones sensoriels qui stimulent la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires et de neuropeptides, déclenchant par conséquent l'INC et un prurit (Binshtok et al., 2008; Gong et al., 2015; Inoue et al., 1999; Morioka et al., 2002; Oprée and Kress, 2000; Samad et al., 2001; Zhang et al., 2011). De plus, l'augmentation de la sécrétion de TSLP par les DhPK déclenche une DA associée à un prurit chez la souris en stimulant les neurones sensoriels (Wilson et al., 2013a). Or, nous avons montré que l'eau thermale d'Uriage bloquait l'augmentation de l'expression de ces trois cytokines. L'eau thermale d'Uriage pourrait agir comme un anti-inflammatoire et anti-pruritique en réduisant la production de ces 3 cytokines inflammatoires. Cet effet anti-inflammatoire de l'eau thermale d'Uriage est également retrouvé sur les CXCL. L'eau thermale d'Uriage bloquait l'augmentation de l'expression de la CXCL1 et -2 induite par PAR-2. Cette eau thermale pourrait exercer sa fonction anti-inflammatoire par la diminution des CXCL en bloquant l'activation, la différenciation ainsi que la migration des cellules immunitaires (De Filippo et al., 2013; Ryser et al., 2014; Takei-Taniguchi et al., 2012).

La MMP9 est un acteur majeur du remodelage de la MEC lors de la cicatrisation, la signalisation inter-cellulaire, l'inflammation et l'angiogénèse (Egeblad and Werb, 2002; Kerkelä and Saarialho-Kere, 2003; Sternlicht and Werb, 2001). En bloquant l'effet de PAR-2 sur l'augmentation de la MMP9, l'eau thermale d'Uriage pourrait

favoriser la cicatrisation tout en diminuant l'inflammation cutanée, complétant des résultats préliminaires sur le potentiel cicatrisant de l'eau thermale (Couderot-Masuyer et al., 2006).

D. Conclusion et perspectives

En somme, nos résultats ont montré pour la première fois que l'eau thermale d'Uriage pourrait avoir des vertus préventives ou curatives pour certaines dermatoses inflammatoires prurigineuses en bloquant les effets de PAR-2 sur la régulation d'expression des jonctions communicantes (Cx26 et -43), des cytokines (CXCL1 et -2, TNF- α , IL-1 β , TSLP) et des MMPs (MMP9) dans les DhPK. Envisager l'eau thermale comme une alternative aux traitements topiques (émollients et corticoïdes), médicamenteux et à la photothérapie permettrait de limiter les effets secondaires ainsi que les risques d'aggravation des dermatoses inflammatoires prurigineuses.

L'effet de l'eau thermale d'Uriage nécessiterait d'être approfondi en analysant le niveau de sécrétion des protéines correspondantes à nos gènes cibles induits par PAR-2. Nous tenterons d'analyser les effets de l'eau thermale d'Uriage sur les variations calciques induites par l'activation de PAR-2 en imagerie calcique afin de comprendre ces mécanismes intracellulaires. Nous compléterons les effets de l'eau thermale d'Uriage sur le renforcement et l'hydratation de la barrière cutanée en se focalisant sur la régulation de l'expression de la filaggrine et du NMF suite à l'activation de PAR-2.

Chapitre IV. Rôle inflammatoire et voies de signalisation de PAR-2 dans les DhPK

A. Introduction

L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique initie l'exocytose de médiateurs inflammatoires et est perçue comme un second messager intracellulaire dans les kératinocytes basaux. Les voies intracellulaires de PAR-2 dans ces cellules passent par des mécanismes dépendants de l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique. L'activation de PAR-2 déclenche la déplétion des réserves calciques qui stimule la protéine « Stromal interaction molecule 1 » (STIM1), un capteur de la déplétion. STIM1 active le canal calcique ORAI1, ce qui déclenche un influx de Ca^{2+} nommé « Store-operated calcium entry » (SOCE) (Bikle and Mauro, 2014; Jairaman et al., 2015; Vandenberghe et al., 2013; Wilson et al., 2013a). L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique provoque la translocation nucléaire de facteurs de transcription : le « nuclear factor of activated T-cells » (NFAT) et NF- κ B. Ces deux derniers sont directement impliqués dans la synthèse de médiateurs de l'inflammation, dont la TSLP qui est connue pour activer les neurones sensoriels et induire un prurit (Misery, 2014b; Wilson et al., 2013b; Ziegler et al., 2013).

Actuellement, seuls les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont incriminés dans l'induction de l'INC et du prurit. Cependant, ces kératinocytes basaux sont minoritaires dans l'épiderme. De plus, l'expression de PAR-2 est augmentée (Mascia et al., 2002; Steinhoff et al., 1999) alors que celle de STIM1/ORAI1 est diminuée dans les couches supérieures de l'épiderme (Bikle and Mauro, 2014; Vandenberghe et al., 2013). Ces résultats suggèrent que l'activation de PAR-2 peut conduire à des mécanismes cellulaires différents entre les kératinocytes différenciés et les non différenciés. Nous avons préalablement montré que l'activation de PAR-2 dans les DhPK modulait l'expression de certains gènes connus pour être incriminés dans l'INC (Figure 15). Nous avons donc étudié les voies calciques de PAR-2 ainsi que leur impact sur la modulation de l'expression et de la sécrétion de la TSLP, l'IL-1 β et le TNF- α , préalablement modulés dans le Chapitre II.

Ce chapitre est rédigé en anglais car il va faire l'objet d'un article scientifique qui sera soumis très prochainement. Les dernières parties de ce chapitre, correspondant aux expériences complémentaires de l'article 3 et à la conclusion, sont rédigées en français.

**B. Rôle pivot de InsP3R et TRPV1 dans la réponse inflammatoire
induite par PAR-2 dans les DhPK (Article 3)**

Le rôle inflammatoire et les voies de signalisation de PAR-2 dans les DhPK ont fait l'objet d'une étude approfondie dans notre laboratoire et les résultats vont bientôt être soumis.

Pivotal role of both TRPV1 and InsP3R in PAR-2-elicited Ca^{2+} stores depletion, NF- κ B activity and consequently inflammatory mediator production in differentiated human primary keratinocytes

Olivier Gouin^{1, 2}, Killian L'Herondelle¹, Olivier Mignen³, Christelle Le Gall-Ianotto¹, Paul Buscaglia³, Réginald Phillippe³, Virginie Buhé¹, Raphael Leischiera¹, Mehdi Sakka¹, Jean-Luc Carré¹, Raphael Le Garrec¹, Luc Lefeuvre², Nicolas Lebonvallet¹, Laurent Misery¹.

¹ University of Western Brittany, Laboratory of Neurosciences of Brest, Brest, France ; ² Uriage Dermatological Laboratories, Courbevoie, France ; ³ University of Western Brittany, Channelopathies and Ca^{2+} signaling, INSERM U1078, Brest, France.

Abstract

The activation of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) in basal keratinocytes stimulates inflammation through a Ca^{2+} -dependent production of mediators such as interleukine (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and thymic stromal lymphopoietin (TSLP). In this study, we investigated the PAR-2 calcium signalling and consequently the inflammatory mediators' production in differentiated human primary keratinocytes (DhPK). Stimulation with the PAR-2 activating peptides SLIGKV promoted Ca^{2+} stores depletion in both undifferentiated human primary keratinocytes (UhPK) and DhPK. SLIGKV-evoked Ca^{2+} stores did not trigger store operated Ca^{2+} entry (SOCE) through ORA1 in DhPK compared to UhPK suggesting an another Ca^{2+} channel release. Inhibition of phospholipase C (PLC) and concomitant inhibition of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inositol trisphosphate receptor (InsP3R) in DhPK abrogated SLIGKV-evoked Ca^{2+} store depletion, NF- κ B activity and inflammatory mediators production such as IL-1 β , TNF- α and TSLP. Here, we demonstrated that PLC and both InsP3R and TRPV1 channels regulated PAR-2-evoked Ca^{2+} release and consequently inflammatory mediator production that could contribute to skin inflammation from DhPK. Taken together, a key role of both InsP3R and TRPV1 in Ca^{2+} internal stores in PAR-2-evoked Ca^{2+} release and consequently skin inflammation in DhPK might give clues to understand the pathological role of DhPK in skin disorder such as atopic dermatitis (AD), Netherton syndrome (NS) and psoriasis, in which PAR-2 is known to be involved.

Key Words: PAR-2, keratinocyte, SOCE, TRPV1, InsP3R

1. Introduction

The epidermis is mainly composed of keratinocytes (around 80%), which form the first line of our body's defence against environmental hazards (Bos, 1997). Skin injuries or diseases, as well as epidermal barrier dysfunctions, frequently induce the release of proteases and a wide range of inflammatory mediators from keratinocytes (Nickoloff and Naidu, 1994; Schechter et al., 1998; Theoharides et al., 2012).

The proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) belongs to the seven-transmembrane G protein-coupled receptors (GPCR) and is activated by serine-proteases, especially in inflammatory and pruritic skin disorders such as psoriasis, atopic dermatitis (AD) and Netherton syndrome (NS) (Liu et al., 2011; Namazi, 2005; Steinhoff et al., 2003b, 2005). In the epidermis, PAR-2 is localized on keratinocytes in the suprabasal layers: *stratum spinulosum* and *granulosum* (Kempkes et al., 2014; Macfarlane et al., 2005; Steinhoff et al., 1999). PAR-2 have a crucial role in keratinocyte-mediated inflammation by stimulating the production of pro-inflammatory mediators including cytokines (interleukine (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and thymic stromal lymphopoietin (TSLP)), chemokines C-X-C motif ligand (CXCL)-1, -2 and -8) and several matrix metalloproteinase ((MMP)-1, -2, -3 and -9) (Gouin et al., 2015; Lee et al., 2010; Steinhoff et al., 2003, 2005; Takei-Taniguchi et al., 2012; Wilson et al., 2013a, 2013b).

The involvement of keratinocytic PAR-2-evoked Ca²⁺ dependant mechanisms in the induction and regulation of cutaneous inflammation is now well established. Indeed, PAR-2 activation mediates the mobilization of Ca²⁺ by phospholipase C (PLC) and then inositol 1, 4, 5-triphosphate (InsP3)-mediated Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum through the InsP3 receptor channel (InsP3R) (Macfarlane et al., 2005; Wilson et al., 2013a, 2013b). Furthermore, in keratinocyte, Ca²⁺ behaves as second messenger that controls genetic programme through nuclear factor activated T-cells (NFAT) as well as nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (Buddenkotte et al., 2005; Hogan et al.; Jans et al., 2004; Macfarlane et al., 2005; Wilson et al., 2013a, 2013b). Thus, PAR-2-elicited Ca²⁺ signalling could consequently trigger inflammatory genes expression in relation to numerous skin disorders.

Keratinocytes are considered as a non-excitable cells and the store operated Ca^{2+} entry (SOCE) are the main source of Ca^{2+} mobilization (Bikle and Mauro, 2014; Castro et al., 2009; Parekh and Putney, 2005; Vandenberghe et al., 2013; Wilson et al., 2013a). SOCEs go through specialized Ca^{2+} ion channels at the plasma membrane named Ca^{2+} release-activated channels (CRACs). One candidate of CRACs termed ORAI1 has been found to be involved in skin homeostasis by promoting Ca^{2+} mobilization in keratinocytes (Bikle and Mauro, 2014; Vandenberghe et al., 2013). The activation of PAR-2 elicits SOCEs through ORAI1 in basal keratinocytes or undifferentiated human primary keratinocytes (UhPK) (Misery, 2014b; Wilson et al., 2013a). Indeed, PAR-2 activation is associated to Ca^{2+} store depletion that consequently promotes the Ca^{2+} sensors stromal interaction molecule 1 (STIM1) activation at the membrane stores. The activation of PAR-2 drops a direct physical interaction with STIM1 which activate ORAI1-evoked SOCEs (Misery, 2014b; Wilson et al., 2013a). However, the role of PAR-2-mediated Ca^{2+} mobilization in differentiated keratinocytes from the spinosum and granulosum layers remains poorly understood. Immunohistochemical and RT-qPCR assays demonstrated the down-regulation of ORAI1 protein during the keratinocytes differentiation process (Vandenberghe et al., 2013), suggesting that ORAI1 could be inoperative to induce SOCEs in differentiated human primary keratinocytes (DhPK). Altogether, the lack of ORAI1 in DhPK strongly suggests another intracellular pathways by which PAR-2 could promote skin inflammation compared to UhPK.

For years, the interest in the role of intracellular Ca^{2+} induced by PAR-2 into keratinocytes in skin inflammation and pruritus is growing but previous works focused on UhPK from the basal layer. In this regard, we hypothesized that intracellular PAR-2-evoked Ca^{2+} mobilization could also contribute to skin inflammation from DhPK. Regarding the change in the expression of PAR-2 and ORAI1 following differentiation, we investigate PAR-2 Ca^{2+} signaling pathways in DhPK compared to UhPK by focusing on Ca^{2+} release and SOCEs. We also investigated the intracellular pathways of PAR-2 in DhPK on NF- κ B activity and inflammatory mediators' production such as IL-1 β , TNF- α and TSLP expression and release.

2. Results

The cytotoxicity of drugs (GB83, U73122, AMG9810, Xestospongin C) and their solvent (DMSO 0.05%) used for RT-qPCR and ELISA test following 4 h and 24 h of incubation was analysed by MTT test. The cytotoxicity of transfection with siRNA (PAR-2, TRPV1, ORAI1 and siScramble) was also tested following 48 h of transfection. Here we certify that all siRNA as well as drugs and their solvent did not have cytotoxic effect, without impact on cell viability (Data not shown). We also certify that all drugs and their solvent used in Ca^{2+} imaging did not impact intracellular Ca^{2+} fluctuation (Data not shown). Efficiency of siRNA knockdown of PAR-2, TRPV1 and ORAI1 was controlled by RT-qPCR showing an expression decrease of these targets around 60% (Data not shown)

2.1. SLIGKV activates PAR-2-evoked Ca^{2+} stores depletion in the UhPK and DhPK

Firstly, we confirmed previous evidences that PAR-2 is up-regulated in DhPK compared to UhPK (Kempkes et al., 2014; Macfarlane et al., 2005). *In vitro* differentiation process by incubating UhPK in a rich Ca^{2+} medium for 16 h was controlled by analysing the changes in expression levels of early differentiation markers like keratin 14 and involucrin, which are specific to basal and spinosum layers, respectively (Supplementary data 2 A to C). To address the potential role of PAR-2 activation in generating Ca^{2+} release in UhPK and DhPK, we investigated the ability to the agonist peptide of PAR-2 (SLIGKV) to elicit Ca^{2+} release by imaging Ca^{2+} cytosolic fluctuation using Ca^{2+} reporter, Fura 2-AM. The activation of PAR-2 by the PAR-2-activating peptide SLIGKV in Ca^{2+} free medium triggered a rapid Ca^{2+} release from internal stores in both UhPK and DhPK (Figure 1 A to C). The Ca^{2+} mobilization was specific to the activation of PAR-2, because specific siRNA knockdown of PAR-2 or administration of PAR-2 antagonist GB83 abrogated SLIGKV-mediated Ca^{2+} store depletion in Ca^{2+} free medium. These results confirm that the agonist peptide of PAR-2 SLIGKV activates PAR-2 to promote Ca^{2+} release in UhPK and DhPK.

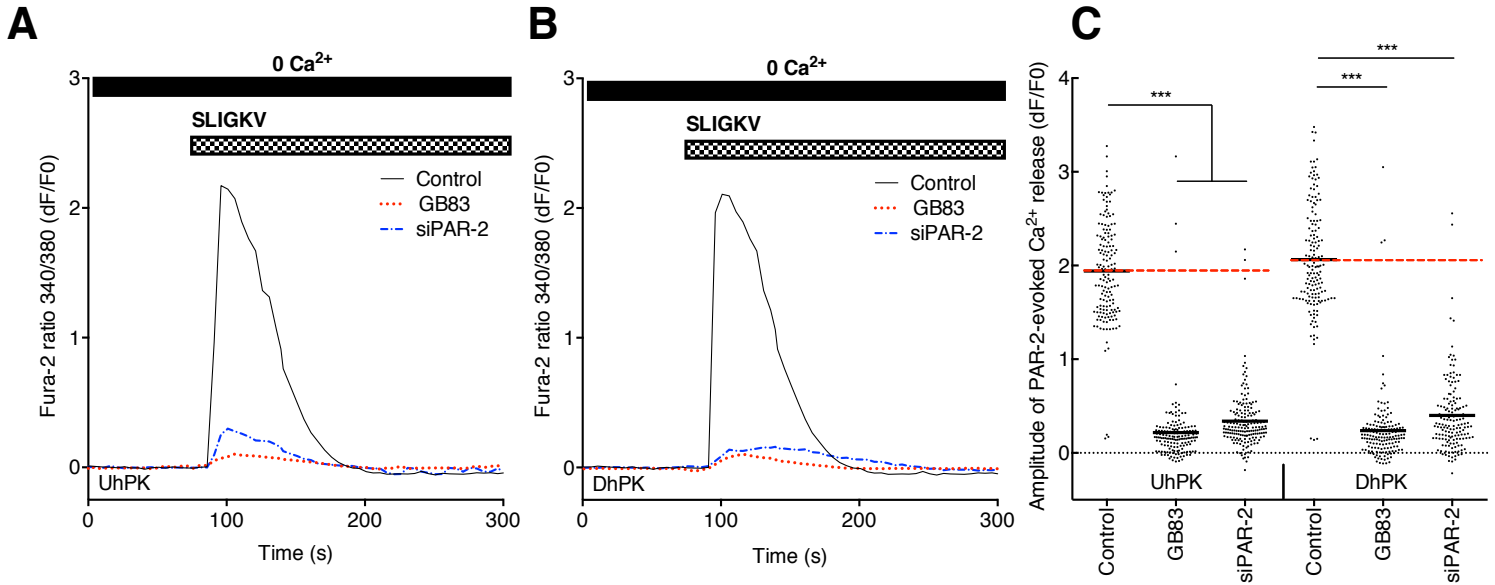


Figure 1: PAR-2 activation by SLIGKV evoked robust Ca^{2+} store depletion in UHPK and DhPK.

The PAR-2 agonist peptide SLIGKV induced Ca^{2+} release. (A) UHPK and (B) DhPK were treated with 100 μM SLIGKV in Ca^{2+} free bath solution. Blockage of PAR-2 by siRNA knockdown for 48 h or pre-treated with 2 μM PAR-2 antagonist GB83 abrogated SLIGKV-evoked Ca^{2+} release in UHPK and in DhPK. (C) Dot blot graph illustrated the amplitude of SLIGKV-evoked Ca^{2+} release in DhPK and UHPK, each point represent the maximal Ca^{2+} response of individual cell (data exhibited are mean $\pm$ SEM; $n = 45\text{--}55$ cells; representative of four independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.2. PAR-2-evoked Ca^{2+} stores depletion did not trigger SOCEs in the DhPK.

The Ca^{2+} store depletion is generally associated to Ca^{2+} influx named SOCEs. As seen above, PAR-2 activation by SLIGKV stimulated Ca^{2+} release and the question is whether PAR-2 could trigger SOCEs in UHPK and DhPK. To evaluate the role stores depletion in triggering SOCEs in UHPK and DhPK, we analysed the ability to the SERCA pumps inhibitors, thapsigargin (TG), to trigger Ca^{2+} stores depletion and then SOCEs. Figure 2 A and C showed that TG stimulated Ca^{2+} release in Ca^{2+} free medium and then Ca^{2+} add-back in bath solution elicited SOCEs in UHPK. Regarding DhPK, TG-evoked Ca^{2+} release did not elicit SOCEs following Ca^{2+} add-back in bath solution. To assess the role of PAR-2-mediated Ca^{2+} release in UHPK and DhPK, we analysed the ability of SLIGKV-evoked Ca^{2+} release to trigger SOCEs (Figure 2 B and C). We showed that SLIGKV elicited robust Ca^{2+} release in Ca^{2+} free bath solution and then Ca^{2+} add-back in bath solution triggered Ca^{2+} influx named SOCEs in UHPK, confirming that PAR-2-evoked Ca^{2+} triggers SOCEs in these cells. Regarding DhPK, SLIGKV-mediated Ca^{2+} release did not elicit Ca^{2+} influx following

add-back of Ca^{2+} in bath solution confirming our previous results with TG. These results indicate that PAR-2-elicited Ca^{2+} release from internal stores but did not trigger SOCEs suggesting that CRACs channels could be inoperative or absent in DhPK.

SOCEs are dependent to opening of ORAI1 that occurs following Ca^{2+} store depletion. In this way, we therefore examined the effects of ORAI1 blockage in TG- and PAR-2-elicited SOCEs in UhPK. As shown in Figure 2 D and F, blocking ORAI1 with siRNA knockdown and Synta 66 diminished approximately by 75% and 90% the TG-elicited SOCEs following Ca^{2+} add-back in bath solution. The same inhibition was obtained SLIGKV-elicited SOCEs (Figure 2 E and F). These results indicate that CRACs especially ORAI1 are essential for TG- and PAR-2-evoked SOCEs in UhPK. Altogether, we suggested that ORAI1 could be inoperative or absente in DhPK to trigger SOCEs compared to the DhPK.

To confirm the changes in the functionality of ORAI1 between the UhPK and DhPK, we confirmed previous evidences that ORAI1 mRNA and protein levels are down regulated in DhPK in comparison to UhPK (Supplementary data 2 A to C) (Vandenberghe et al., 2013). These data suggest that CRACs could be inoperative to triggers SOCEs in DhPK probably due to their down-regulation occurring keratinocytes differentiation process (Vandenberghe et al., 2013). Moreover, the lack of SOCEs in PAR-2-mediated Ca^{2+} signaling pathways could highlight news intracellular pathways for PAR-2 in DhPK by which it regulates Ca^{2+} elevation and probably inflammatory process.

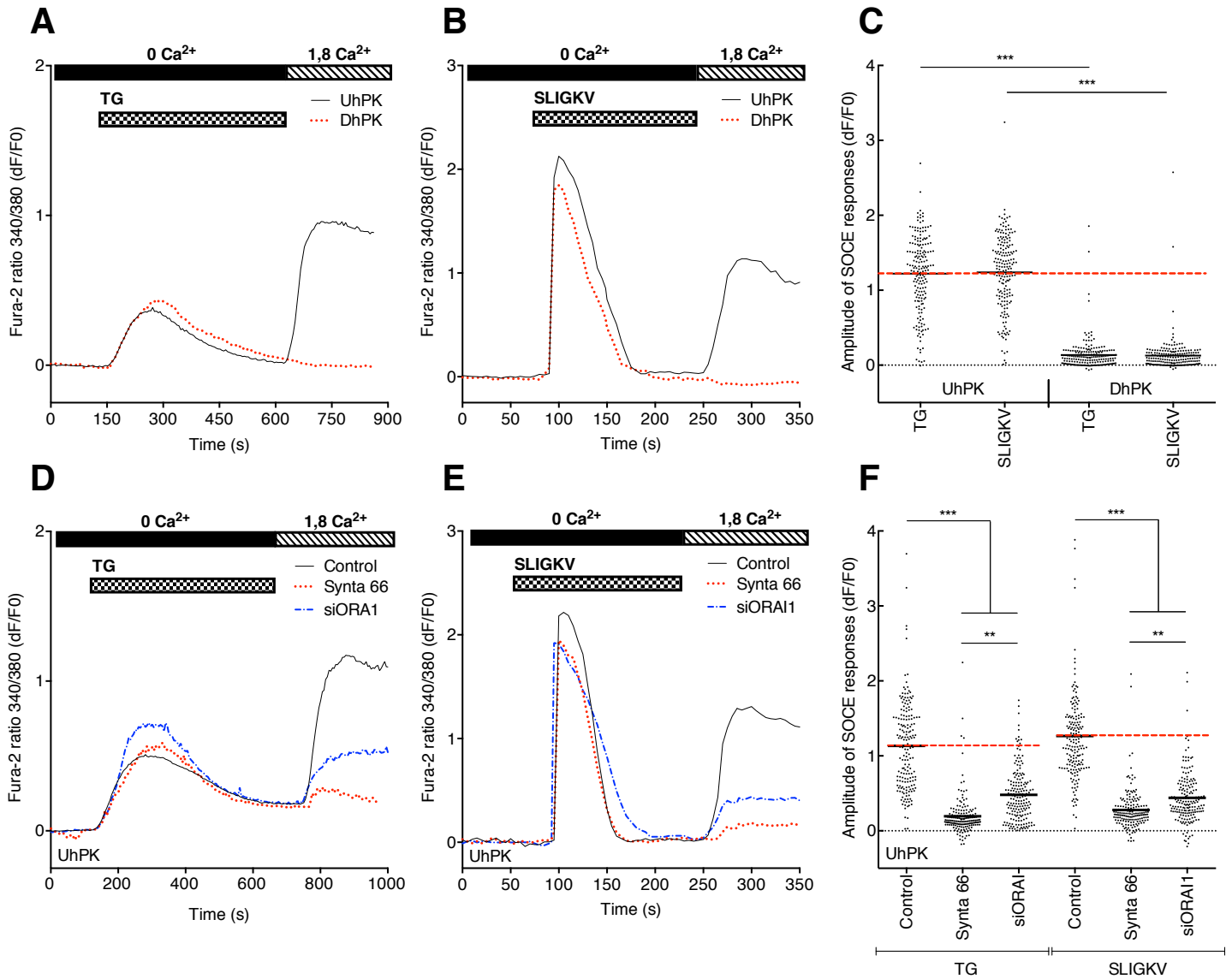


Figure 2: PAR-2-evoked Ca^{2+} stores depletion did not trigger SOCEs in DhPK.

(A to C) SLIGKV-evoked Ca^{2+} stores depletion in DhPK did not trigger SOCEs. To depleted stores, UhPK and DhPK were treated with (A) 2 μM SERCA pumps inhibitor thapsigargin (TG) or (B) 100 μM SLIGKV in Ca^{2+} free bath solution and then 1.8 mM of Ca^{2+} was added-back in the external bath solution to visualize SOCEs. (C) Amplitude of SOCEs responses following SLIGKV- and TG-evoked Ca^{2+} release in DhPK compared to UhPK, each point represent the maximal Ca^{2+} response of individual cell (data are mean $\pm$ SEM; $n = 45\text{-}55$ cells; representative of four independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (D to E) SLIGKV-evoked Ca^{2+} stores depletion in UhPK triggered SOCEs through ORAI1. UhPK were treated with (D) 2 μM TG or (E) 100 μM SLIGKV in a Ca^{2+} free bath solution to depleted stores. SOCEs were triggered by 1.8 mM Ca^{2+} adding-back in the external bath solution. SOCEs were blocked by siRNA knockdown of ORAI1 and by 10 μM ORAI1 inhibitor Synta 66. (F) Dot blot graph summarize SOCEs amplitude response following SLIGKV- and TG-evoked Ca^{2+} release in UhPK, each point represent the maximal Ca^{2+} response of individual cell (data are mean; $n = 50\text{-}60$ cells; representative of three independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

*2.3. PAR-2 evoked Ca^{2+} store depletion is dependant of PLC and downstream of both *Insp3R* and *TRPV1* in DhPK.*

The Ca^{2+} store depletion is mainly dependent of PLC pathway. PLC hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) to form InsP₃, which directly act on InsP₃R to allow Ca^{2+} release. To assess the contribution of PLC and InsP₃R on PAR-2-mediated Ca^{2+} release in DhPK, we used specific PLC inhibitor, U73122, and the InsP₃R antagonist, Xestospongin C. Figures 3 A and B exhibit that U73122 totally impaired the SLIGKV-mediated Ca^{2+} increase, while Xestospongin C partially diminished by 50% this rise of Ca^{2+} in DhPK. These results indicate that PLC activation is necessary to PAR-2-evoked robust Ca^{2+} release in DhPK. However, InsP₃R appeared to be involved in a lesser extent in DhK than UhPK. Data strongly suggests a likely input of another Ca^{2+} release channel at the endoplasmic stores membrane in DhPK.

One candidate for a second PAR-2-elicited Ca^{2+} release is the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), which is localized in endoplasmic stores from a large number of cells where it acts as a Ca^{2+} channel release from a subset of the InsP₃R-containing stores (Castro et al., 2009; Gallego-Sandín et al., 2009; Helen Turner, 2003; Marshall et al., 2003). Regarding ours results on SOCEs and InsP₃R in DhPK, we hypothesized that TRPV1 could participate as a second channel release in PAR-2-evoked Ca^{2+} release from a subset of internal InsP₃R stores.

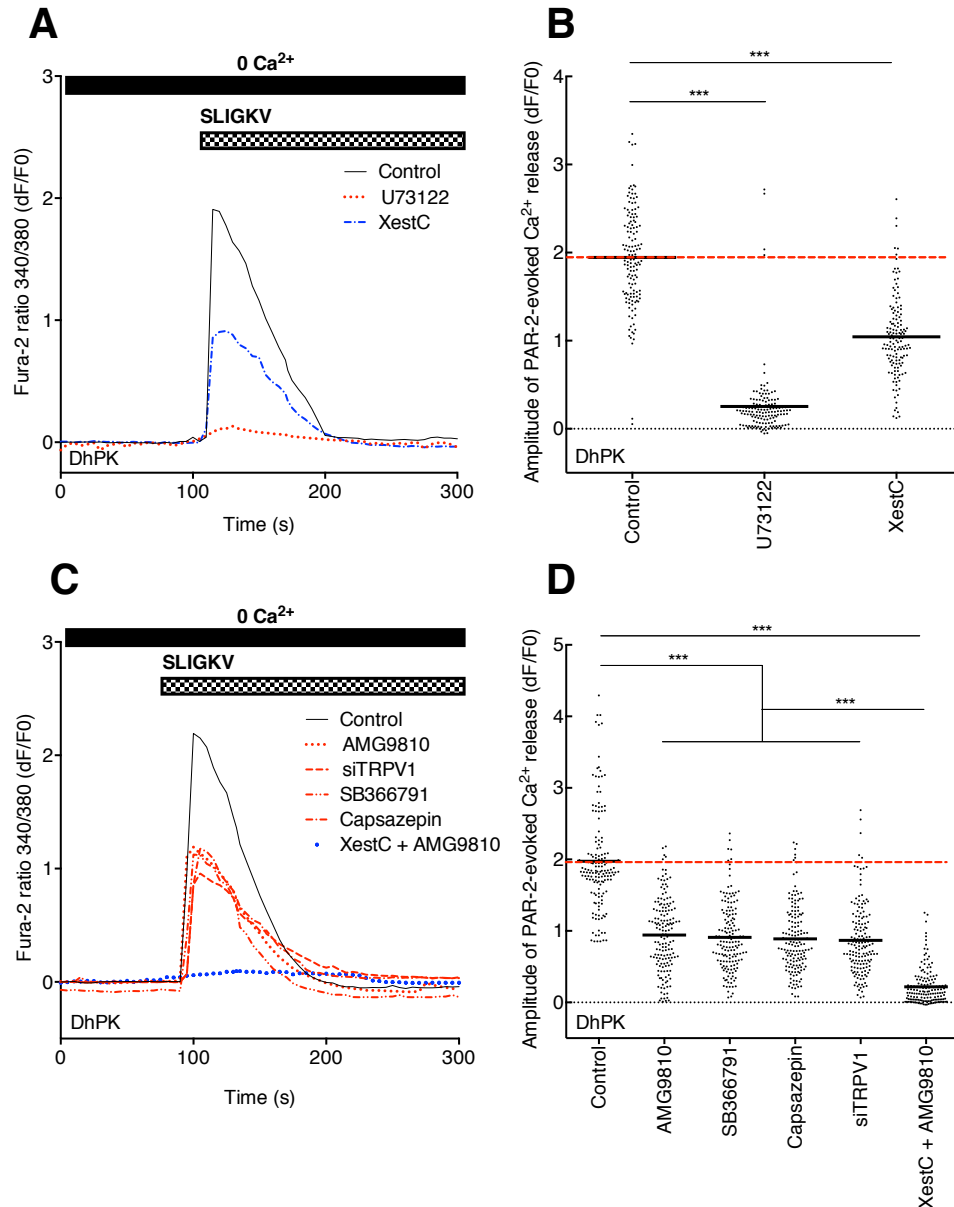


Figure 3: PAR-2-evoked Ca^{2+} store depletion were PLC dependant and gone through both InsP3R and TRPV1 in DhPK.

(A-B) SLIGKV-elicited Ca^{2+} stores depletion in DhPK was totally abolished by PLC (U73122) and partially by InsP3R antagonist: xestospongine C, XestC. DhPK were treated with 100 μM SLIGKV following pre-treatment for 30 min with 10 μM U73122 or 5 μM XestC in Ca^{2+} free bath solution. (B) Dot blot illustrate the amplitude of SLIGKV-evoked Ca^{2+} release following pre-treatment with U73122 and XestC in DhPK, each point represent the maximal Ca^{2+} response of individual cell (data are mean $\pm$ SEM; $n = 45-55$ cells; representative of four independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).). (C-D) Concomitant inhibition of InsP3R and TRPV1 totally inhibited SLIGKV-evoked Ca^{2+} release in DhPK. Cells were treated with 100 μM SLIGKV following transfection for 48 h with siTRPV1 knockdown or pre-treatment for 30 min with 1 μM SB366791, 10 μM capsazepine and 1 μM AMG9810 as well as concomitant treatment with 1 μM AMG9810 and 5 μM Xestospongine C (XestC). (D) Dot blot illustrate the amplitude of SLIGKV-evoked Ca^{2+} release following TRPV1 inhibition or concomitant inhibition of TRPV1 and InsP3R in DhPK, each point represent the maximal Ca^{2+} response of individual cell (data are mean $\pm$ SEM; $n = 45-55$ cells; representative of four independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

To directly address this potential role for TRPV1, we next analysed the pharmacological inhibition of TRPV1 on PAR-2-evoked Ca^{2+} release in DhPK. To assess this hypothesis, we analysed the cytosolic Ca^{2+} fluctuation in response to SLIGKV in Ca^{2+} free bath solution in TRPV1 knockdown DhPK or pre-treated with various TRPV1 antagonists such as AMG9810, SB366791 and capsazepin. Figure 3 C and D showed that SLIGKV-evoked Ca^{2+} release was significantly reduced by 50% with all TRPV1 antagonists as well as in TRPV1 knockdown. These findings highlight the important role of TRPV1 channel in PAR-2-mediated Ca^{2+} release in DhPK. Nonetheless, the part of each channel TRPV1 and InsP3R or other channels in the Ca^{2+} response of PAR-2 in these cells need to be clarified. To address the potential role of both InsP3R and TRPV1 in PAR-2-elicited Ca^{2+} , we performed a concomitant inhibition of these two channels with the InsP3R and TRPV1 antagonists, xestospongine C and AM9810, respectively. Interestingly, the rate of Ca^{2+} release following PAR-2 activation was totally abolished by concomitant inhibition of both TRPV1 and InsP3R. Altogether, data indicate that TRPV1 partially acts as an intracellular Ca^{2+} channel contributing to Ca^{2+} release following PAR-2 activation in DhPK. In addition, both TRPV1 and InsP3R appear to be the main actors of PAR-2-evoked Ca^{2+} store depletion in these cells.

2.4. PAR-2 stimulated NF- κ B activity and inflammatory mediators expression through PLC and both TRPV1 and InsP3R in DhPK

The rise of cytosolic Ca^{2+} is also considered as a second messenger (Elsholz et al., 2015) able to modulate nuclear factor activity such as NFAT and NF- κ B, leading consequently to modulation of gene expression (Buddenkotte et al., 2005; Jairaman et al., 2015; Wilson et al., 2013a; Wullaert et al., 2011). To address the potential role of PAR-2 in the expressional change in DhPK, we examined the ability of SLIGKV to stimulate the NF- κ B reporter plasmid coupled to luciferase gene in DhPK. The activation of PAR-2 increased the luciferase activity of NF- κ B plasmid reporter, which was absent in PAR-2-knockdown cells and abolished with the PAR-2 antagonist GB83 confirming that the rise of NF- κ B activity is specific to PAR-2 (Figure 4 A). Then, we focused on the potential role of each intracellular actor on PAR-2-mediated NF- κ B activity such as PLC, InsP3R and TRPV1 previously found to be involved in PAR-2-evoked Ca^{2+} release. The PLC plays a pivotal role in the beginning of PAR-2

intracellular pathways because the PLC antagonist U73122 totally abolished SLIGKV-mediated the rise in the transcriptional activity of NF- κ B. This activity rise was partially diminished by 50% in TRPV1-knockdown cells as well as with TRPV1 and InsP3R antagonist's AMG9810 and xestopongin C, respectively. In addition, concomitant inhibition of both TRPV1 and InsP3R totally inhibited PAR-2-mediated NF- κ B activity. These results confirm our Ca²⁺ imaging results and indicate that PAR-2-mediated Ca²⁺ release through PLC and both TRPV1 and InsP3R regulates the activity of NF- κ B in DhPK.

To address the potential role of PAR-2-mediated the production of inflammatory mediators in DhPK, we initially examined the ability to SLIGKV to regulate the expression of inflammatory TSLP, TNF- α and IL-1 β (Figure 4 B and C and D, respectively). Indeed, PAR-2-activating peptide SLIGKV up-regulated the expression of TSLP, TNF- α and IL-1 β , which were abolished in PAR-2-knockdown cells and with PAR-2 antagonist GB83 confirming that these up-regulations were specific to PAR-2. We next analysed the role of PLC, InsP3R and TRPV1 on PAR-2-mediated inflammatory mediators' production in DhPK. The PLC inhibitors U73122 totally abrogated ours targets overexpression induced by SLIGKV confirming the participation of this signaling protein in the beginning of PAR-2 intracellular pathways.

Therefore, these up-regulations were diminished by 50% in TRPV1-knockdown cells and by the TRPV1 and InsP3R antagonists AMG9810 and Xestospongin C, respectively. Concomitant inhibition of both TRPV1 and InsP3R totally abolished PAR-2-mediated IL-1 β , TNF- α and TSLP expression. Altogether, our results suggest that InsP3R and TRPV1 are the mains actors in PAR-2-mediated the expression of inflammatory mediators in DhPK. In addition, these data could be correlated to our previous results on the role of InsP3R and TRPV1 in the Ca²⁺ release and the NF- κ B activity following PAR-2 activation in DhPK.

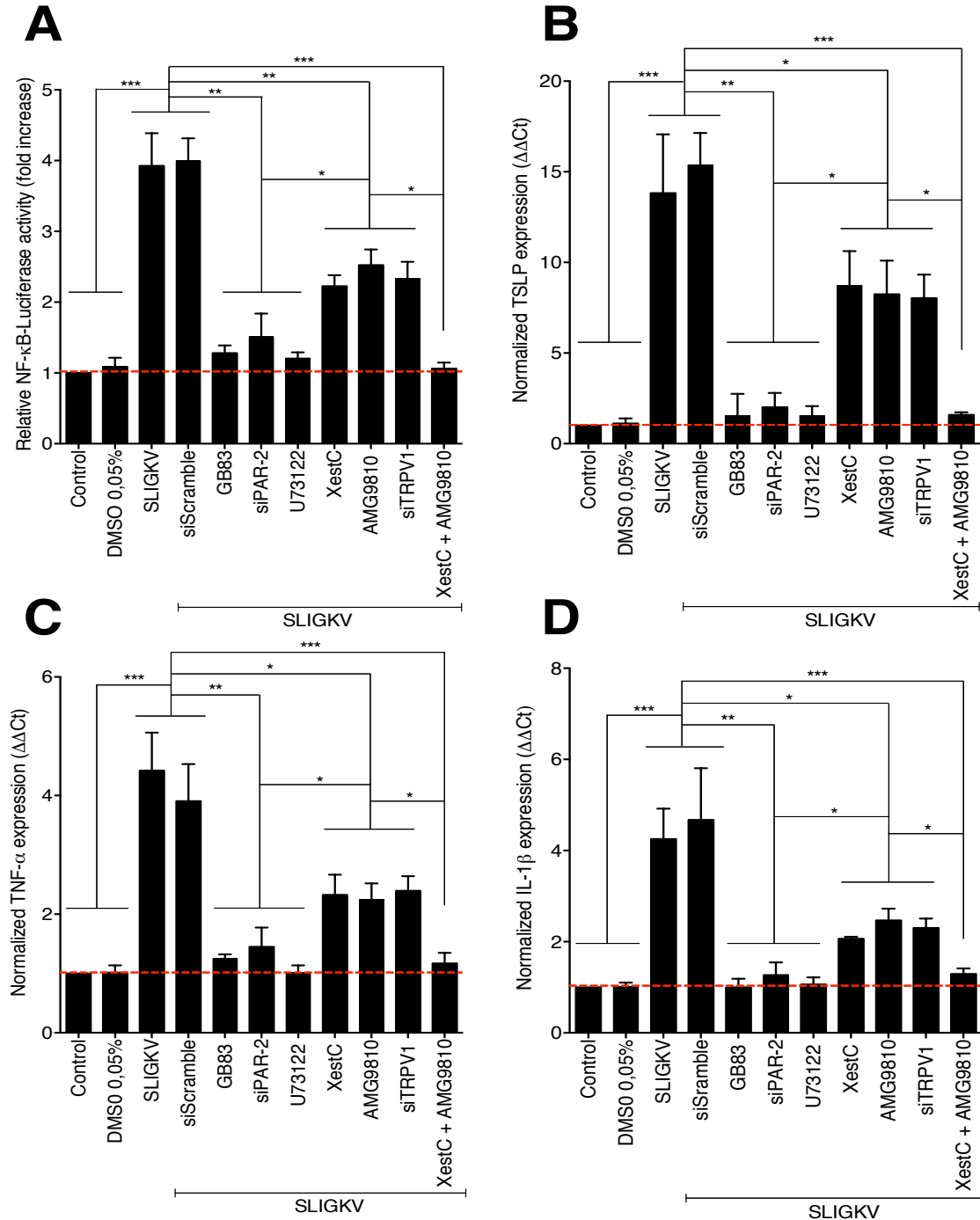


Figure 4: Concomitant inhibition of TRPV1 and InsP3R abrogated PAR-2-evoked NF-κB transcriptional activity and inflammatory mediator expression

(A) PAR-2-mediated NF-κB reporter activity as well as expression and release of (B) TSLP, (C) TNF- α , (D) IL-1 β were abrogated by concomitant inhibition of TRPV1 and InsP3R in DhPK. (A) For NF-κB activity assay, cells were transfected with the pNF-κB-Tluc16-DD reporter for 48 h. (A-F) Cells were transfected for 48 h with siRNA knockdown for Scramble, PAR-2 and TRPV1 or pre-treated for 30 min with 2 μ M GB83, 10 μ M U73122, 5 μ M xestopongin C (XestC), 1 μ M AMG9810 as well as concomitant 1 μ M AMG9810 and 5 μ M xestospongine C prior to addition of 100 μ M SLIGKV for 3 h gene expression or for 24 h pNF-κB-Tluc16-DD reporter. DMSO at 0.05 % was used as control for agonist dilution (data are mean $\pm$ SEM; n = 3 replicates; representative of four independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.5. PAR-2 up-regulated inflammatory mediators release through PLC and both TRPV1 and InsP3R in DhPK

As shown previously, PAR-2 up-regulated TSLP, TNF- α and IL-1 β expression in DhPK (Figure 4 B and C and D, respectively). To validate the potential role of PAR-2 in inflammatory process and in the induction of pruritus, we performed ELISA test of TSLP, TNF- α and IL-1 β to analyse secretion level of these mediators from DhPK (Figure 5 A, B and C). We demonstrated that SLIGKV enhanced TSLP, TNF- α and IL-1 β release in DhPK, which were abrogated by the inhibition of PAR-2 (GB83 and siRNA) confirming that these releases were linked to PAR-2 activation. As seen beforehand, PLC and both InsP3R and TRPV1 played a central role in PAR-2-mediated Ca²⁺ release, NF- κ B activity and inflammatory in DhPK.

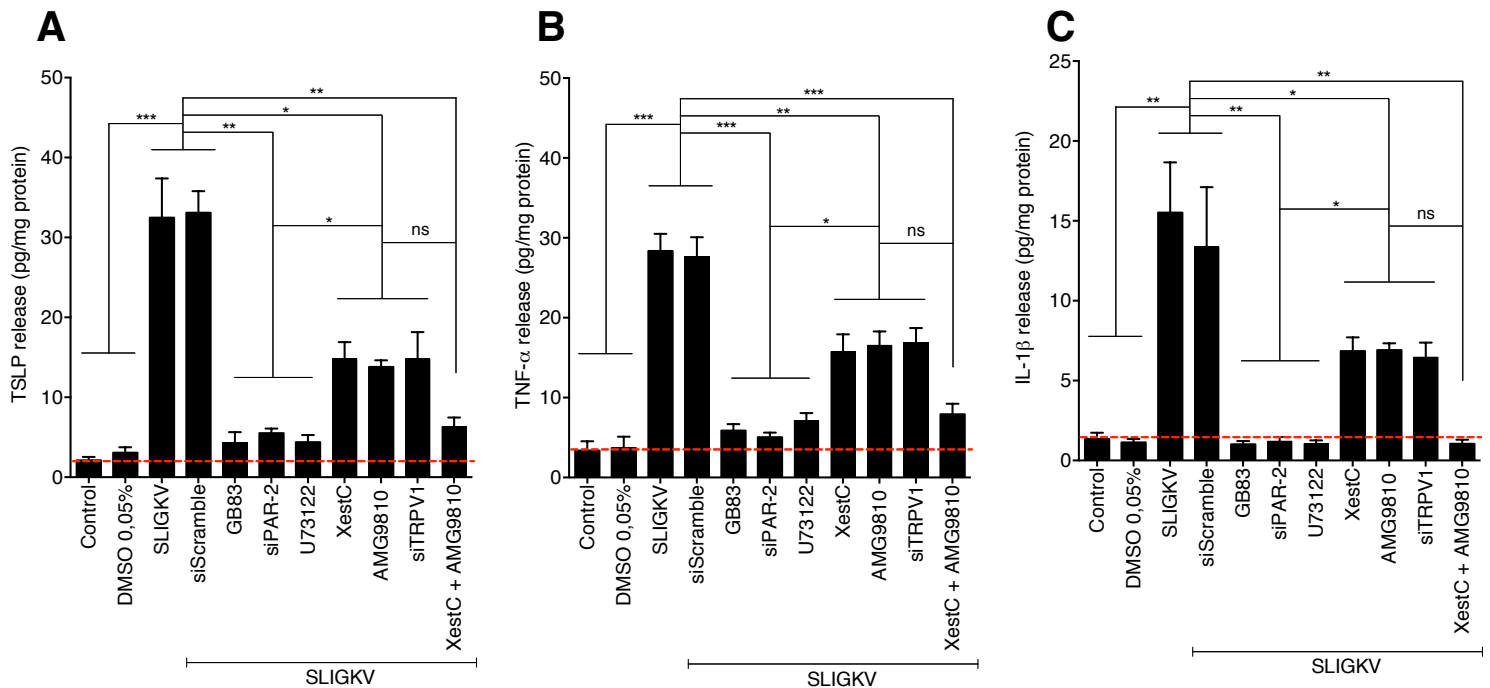


Figure 5: Concomitant inhibition of TRPV1 and InsP3R abrogated PAR-2-evoked inflammatory mediator release

PAR-2-mediated (A) TSLP, (B) TNF- α , (C) IL-1 β release was abrogated by concomitant inhibition of TRPV1 and InsP3R in DhPK. Cells were transfected for 48 h with siRNA knockdown for Scramble, PAR-2 and TRPV1 or pre-treated for 30 min, 2 μ M GB83, 10 μ M U73122, 5 μ M xestopongin C (XestC), 1 μ M AMG9810 as well as concomitant 1 μ M AMG9810 and 5 μ M xestospongine C prior to addition of 100 μ M SLIGKV for 24 h. DMSO at 0.05 % was used as control for agonist dilution (data are mean $\pm$ SEM; n = 3 replicates; representative of four independent experiments; one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

In this way, we next analysed the role of these three actors on PAR-2-mediated inflammatory mediators release in DhPK. We found that the PLC inhibitors U73122 totally abrogated TSLP, TNF- α and IL-1 β release confirming the central role of PLC in PAR-2 intracellular pathways. Therefore, the separate blockage of TRPV1 (AMG9810 and siRNA) and InsP3R (XestC) partially diminished the secretion level of TSLP, TNF- α and IL-1 β . Interestingly, PAR-2-mediated inflammatory mediator release was abrogated by the concomitant inhibition of both TRPV1 and InsP3R. Altogether, our results confirmed that both InsP3R and TRPV1 are the main actors of signaling pathways in PAR-2-mediated inflammatory mediators release in DhPK. In addition, these data could be correlated to our previous results on the role of both InsP3R and TRPV1 on Ca²⁺ release, NF- κ B activity as well as TSLP, TNF- α and IL-1 β following PAR-2 activation in DhPK.

3. Discussion

The keratinocyte differentiation is associated with the migration from the depth layers (*stratum basale*) to the external layers (*stratum spinosum* then *stratum granulosum*) (Watt, 1983). This process is especially characterised by the up-regulation of involucrin and PAR-2 as well as the down-regulation of keratin 14 and ORAI1 (Kempkes et al., 2014; Macfarlane et al., 2005; Steinhoff et al., 1999; Vandenberghe et al., 2013). We confirmed these expressional changes by immunohistological, RT-qPCR and western blotting assays between *in vitro* culture of UHPK and DhPK (supplementary data). These results suggest that DhPK could also promote skin inflammation via PAR-2 activation. However, it has been showed that PAR-2-evoked Ca²⁺ depletion triggers SOCEs through ORAI1 in UHPK (Bikle and Mauro, 2014; Castro et al., 2009; Vandenberghe et al., 2013; Wilson et al., 2013a, 2013b). Considering the down-regulation of ORAI1 in DhPK, we hypothesized that PAR-2-evoked intracellular Ca²⁺ mobilization could be different between UHPK and DhPK.

To directly address the role of PAR-2 on Ca²⁺ store depletion, we recorded intracellular Ca²⁺ fluctuation in UHPK and DhPK. In both conditions, PAR-2-activating peptide SLIGKV elicited robust Ca²⁺ store depletion, which was abrogated by blocking PAR-2. Thus, we confirmed that PAR-2 mediates Ca²⁺ release in UHPK and

we showed for the first time the same effect in DhPK. Next, we analysed the ability to PAR-2-evoked Ca^{2+} release on triggering SOCEs. Firstly, we confirmed that PAR-2 or TG-mediated Ca^{2+} store depletion evoked SOCEs through ORAI1 in UHPK (Bikle and Mauro, 2014; Castro et al., 2009; Vandenberghe et al., 2013; Wilson et al., 2013a, 2013b). Interestingly, PAR-2- and TG-evoked Ca^{2+} release did not evoke SOCEs in DhPK, thus confirming our hypothesis on the different PAR-2 Ca^{2+} signalling between UHPK and DhPK. Regarding to these results, we proposed that CRACs-evoked SOCEs may be inoperative in DhPK probably due to ORAI1 down-regulation occurring keratinocytes differentiation process. This highlights new intracellular pathways for PAR-2 in DhPK by which it regulates Ca^{2+} elevation and consequently probably inflammatory process.

Currently, it is clearly established that PAR-2-mediated Ca^{2+} store depletion in a PLC- and InsP3-dependent mechanism in UHPK (Macfarlane et al., 2005; Wilson et al., 2013a, 2013b). Firstly, we showed that PLC totally impaired PAR-2-evoked Ca^{2+} stores depletion in DhPK, while InsP3R appeared to be involved in a lesser extent, strongly suggesting a likely input of another Ca^{2+} release channel. TRPV1 is a Ca^{2+} channel localized at both plasmatic and endoplasmic membranes from excitable and non-excitable cells including dorsal root ganglion (DRG) neurons, mast cells, fibroblast-like cells and liver cells (Castro et al., 2009; Gallego-Sandín et al., 2009; Helen Turner, 2003; Marshall et al., 2003). Indeed, TRPV1 acts as an intracellular release channel from a subset of the InsP3R-containing stores and fails to trigger SOCEs (Castro et al., 2009; Gees et al., 2010; Helen Turner, 2003; Marshall et al., 2003; Wisnoskey et al., 2003). Using Ca^{2+} imaging in DhPK, we confirmed the functionality of TRPV1 at the endoplasmic stores to promote Ca^{2+} store depletion and its inability to trigger SOCEs. In this way, we hypothesized that TRPV1 channel could be a good candidate for PAR-2-evoked Ca^{2+} release in DhPK. We next analysed whether the blockage of TRPV1 could impact PAR-2-evoked Ca^{2+} store depletion in DhPK. We demonstrated for the first time that blockage of TRPV1 partially impaired PAR-2-evoked Ca^{2+} store depletion. All together, our data confirm a functionally localization of TRPV1 at Ca^{2+} stores during PAR-2-evoked Ca^{2+} release. Next, we found that both TRPV1 and InsP3R were the main actors of PAR-2 Ca^{2+} response as revealed by the abrogating PAR-2-evoked Ca^{2+} store depletion following concomitant inhibition of TRPV1 and InsP3R.

Mobilization of cytosolic Ca^{2+} could be considered as a second messenger in the control of keratinocytes functions in health and disease (Elsholz et al., 2015) by increasing the NF- κ B and NFAT activity and then the expression of inflammatory-related genes (Buddenkotte et al., 2005; Jairaman et al., 2015; Wilson et al., 2013a; Wullaert et al., 2011). It is clearly established that PAR-2-elicited Ca^{2+} mobilization in keratinocytes induces inflammatory gene expression through NFAT activity, mainly TSLP (Wilson et al., 2013a). In UhPK, PAR-2-evoked Ca^{2+} response could also mediate NF- κ B activity following by gene modulation such as ICAM1 (Buddenkotte et al., 2005; Macfarlane et al., 2005). Using a luciferase reporter construction of NF- κ B activity, we confirmed that PAR-2 activate NF- κ B pathway. Interestingly, the blockage of PLC abrogated NF- κ B activity induced by PAR-2 thus confirming our results on Ca^{2+} imaging. This suggests that PLC participates in the beginning of PAR-2 intracellular pathways, which is in agreement with previous data (Macfarlane et al., 2005). In addition InsP3R and TRPV1 inhibition partially impaired NF- κ B activity, concomitant inhibition of these two channels abrogated it. These data suggest that InsP3R and TRPV1 are involved in PAR-2-mediated NF- κ B activity confirming our first hypothesis, which suggest InsP3R and TRPV1 as the main actors of PAR-2-evoked Ca^{2+} release.

PAR-2 is known to increase the production of pro-inflammatory mediators in UhPK including cytokines IL-1 β , TNF- α , TSLP, CXCL-1, -2, -8 and several MMP-1, -2, -3, -9 (Gouin et al., 2015a; Lee et al., 2010b; Misery, 2014b; Takei-Taniguchi et al., 2012). We next investigated the potential role of PAR-2 in DhPK on the expression and release of inflammatory IL-1 β , TNF- α and TSLP. Our data showed that PAR-2 activation up-regulated the expression and the release of these three inflammatory mediators. Similarly to calcium imaging results, PLC inhibition totally abrogated PAR-2-mediated inflammatory mediators' production, confirming its role in PAR-2 signaling pathway demonstrated in some previous studies (Steinhoff et al., 2003b, 2005; Wilson et al., 2013a). While the independant inhibition of InsP3R and TRPV1 partially inhibited PAR-2-mediated IL-1 β , TNF- α and TSLP production, concomitant inhibition of these both channel totally impaired it. These data could be correlated tout our previous data and suggest that InsP3R and TRPV1 offer two independent release pathway from Ca^{2+} stores and then inflammatory mediators production via Ca^{2+} and NF κ B signaling.

The IL-1 β , TNF- α and TSLP production could be linked to inflammatory responses on skin neighbouring target cells associated to skin disorders such as psoriasis, AD and NS, that are usually associated to pruritus (Liu et al., 2011; Namazi, 2005; Steinhoff et al., 2003b, 2005). TSLP is highly expressed in skin epithelial cells from AD patients and promotes T cells, DCs and mast cells activation (Moniaga et al., 2013; Ziegler et al., 2013). In relation to our results, PAR-2 activation in DhPK could be the main source of TSLP, which enhance skin inflammation by activating and mobilizing skin immune cells. TNF- α is known to act in the pathogenesis of inflammatory skin diseases such as AD and psoriasis (Ackermann and Harvima; Sereflican et al., 2016). TNF- α increases intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), which occurs in keratinocytes from lesional skin of psoriasis and AD patients (Ackermann and Harvima). It also increases adhesion molecules in endothelial cells, which stimulate monocytes adhesion (Viemann et al., 2004). Thus, PAR-2-mediated the rise of TNF- α production from DhPK could directly trigger AD or psoriasis by disturbing epidermis and promoting immune cell recruitment. The last one, IL-1 β , a potent mediator of fever, pain sensitivity, vasodilatation and inflammation was found particularly increase within psoriatic and AD lesions (Abdel Hay et al., 2013; Schön et al., 2001). It promotes immune cells infiltration into the tissues by increasing the expression of adhesion molecules on endothelial cells (Contassot et al., 2012). It also sensitizes mechanical threshold and thermal responsiveness of sensory neurons (Binshtok et al., 2008), thus facilitating neuropeptide secretion from sensory neurons and then cutaneous neurogenic inflammation (CNI) (Gouin et al., 2015a). Regarding our results on PAR-2-mediated up regulation of IL-1 β , it could be correlated with immune cells recruitment and neuropeptides associated to inflammatory skin disorders such as psoriasis or AD.

Compared to basal keratinocytes (UhPK), the DhPK are the main keratinocyte types in the epidermis and from the first line of defence of body against environmental hazard. The PAR-2 keratinocytes are activated by serine proteases, which are mainly released by mast cells following skin injury, allergies as well as chemical contacts. Considering the up-regulation of PAR-2 in the upper stratum of epidermis, it appears that DhPK could be considered as noxious sensor, which promote skin inflammation within epidermis. Our results give us valuable clues to understanding PAR-2 signaling pathways in DhPK (Figure 6). Indeed, this study provides evidences

for a key role of both TRPV1 and InsP3R channels in PAR-2-mediated Ca^{2+} stores depletion, NF- κB activity and consequently inflammatory gene production in DhPK. Our data on UhPK and DhPK open new putative therapeutic ways for skin disorders in which PAR-2 are involved, such as psoriasis or AD.

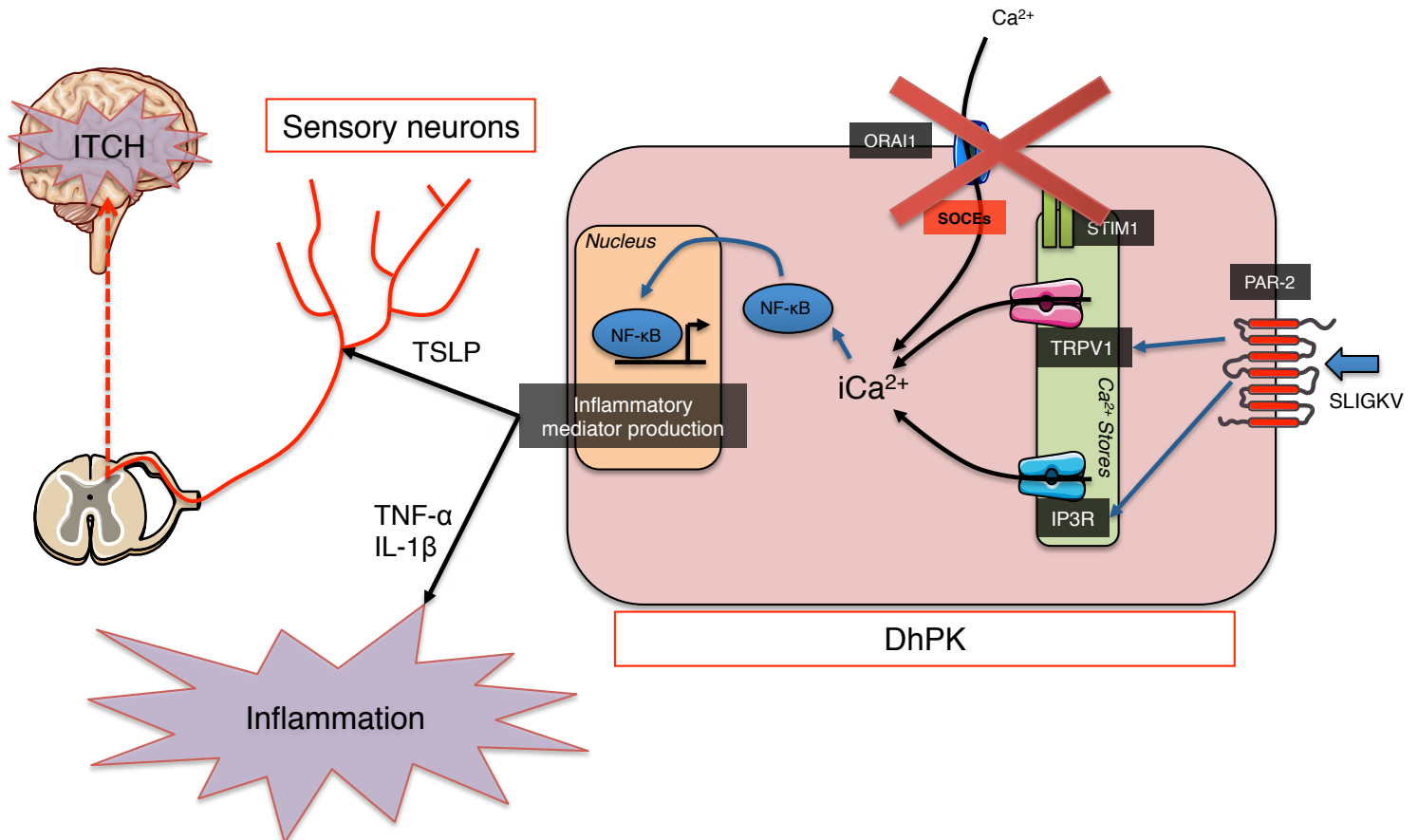


Figure 6: Model of the PAR-2-mediated Ca^{2+} signaling pathways in DhPK.

The activation of PAR-2 with the PAR-2 activating peptide SLIGKV evokes PLC stimulation, leading to Ca^{2+} store depletion through the opening of both InsP3R and TRPV1 channels at the endoplasmic store membrane. Interestingly, Ca^{2+} stores depletion does not lead SOCERs probably due to the down regulation of STIM1 and ORAI1 in DhPK. Ca^{2+} release activates the NF- κB signalling, leading to induce inflammatory TSLP, TNF- α and IL-1 β production. TSLP directly acts on sensory neurons to induce itch and both TNF- α and IL-1 β mediates inflammatory response by acting on neighbouring target skin cells.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents and chemicals

The keratinocyte serum-free medium (K-SFM) contained with 5 µg/ml recombinant epidermal growth factor (EGF) and 50 µg/ml bovine pituitary extract with 0,07 mM Ca^{2+} (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). The Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contained 1,8 mM Ca^{2+} (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). The Ca^{2+} -imaging buffer had the following composition (in mM) 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 Hepes, 10 glucose with or without 1.8 CaCl_2 . pH was adjusted to 7.45 using NaOH. Stock solution of SB366791, capsazepin, AMG9810, xestospongine C (XestC), U73122, GB83, thapsigargin (TG) and Synta 66 were dissolved in dimethyl sulfoxide. PAR-2 agonist peptide SLIGKV was reconstituted in phosphate-buffered saline (PBS). SB366791, capsazepin, xestospongine C were from Abcam (Cambridge, UK). AMG9810, U73122, SLIGKV and capsaicin were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). GB83 was from Axon Medchem (Groningen, NLD), Synta 66 was from Glix Laboratories (Southborough, MA, USA) and TG was from Serbilab (Le Mans, FR).

4.2. Human Primary Keratinocytes Culture

Human primary keratinocytes (hPK) were obtained from patient abdominoplasties. To isolate keratinocytes, the abdominal skin was excised, and hypodermis was removed from dermis and epidermis. To isolate epidermis, the strips skins obtained were incubated over night at 4°C in 25 U/mL Dispase® (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). The following day, the epidermis was recovered and incubated three times for 15 min each in trypsin solution. The cell suspension obtained was filtered in a 40-µm filter and centrifuged at 400 × g for 5 min. Finally, cells were suspended in KSFM and cultured at 37°C at 5% CO_2 in a humidified chamber. The medium was changed every 3 days. Before confluency cells were split by treating cells with trypsin for 5 min at 37°C. Throughout this article, we used the terms UHPK and DhPK for undifferentiated proliferating keratinocytes and for differentiated keratinocytes with DMEM for 16 h, respectively.

4.3. *siRNA transfection*

siRNAs were synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) for TRPV1 (NM_080704.3) and ORAI1 (NM_032790.3). ARNi for PAR-2 (NM_005242.4) was from Qiagen (Venlo, NLD) for PAR-2. AllStar negative control scramble RNA (siScramble ; Qiagen, Venlo, NLD) was used as control siRNA. The hPK cells were transfected for 48 h using the Lipofectamine P3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. To confirm the cells transfection efficiency by the siRNA, we used RT-qPCR for each target in comparison to the siScramble conditions. Primers for PAR-2, TRPV1 and ORAI1 were presented in the real time quantitative PCR section. A MTT test at 48 h was performed to analyze the effect of transfection with these siRNA on cell viability (Data not shown).

4.4. *Western blotting*

hPK were grown on 24-well plates in triplicate. At 80 - 90% confluence, hPK and DhPK were washed with cold PBS and lysed with the Tri-reagent (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, USA). Protein extractions were done according to Tri-reagent manufacturer's guidelines and the protein content was then determined by means of Bradford assay. Then, 10X loading buffer [125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 15% (v/v) glycérol, 0,004% bromophénol Blue and 10% 2-mercaptoethanol] was added to an aliquot of protein extraction and was incubated for 5 min at 95°C. Protein sample (100 µg) were loaded for electrophoresis on 10% (w/v) polyacrylamide gel along with molecular-mass standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred electrophoretically at 100 V on ice during 1 h on a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Blots were targeted using a rabbit anti-ORAI1 (1 / 1000, Abcam, Cambridge, UK) or a rabbit anti-actin (1 / 5000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, CA, USA) for 1 h 30 at room temperature. Then, membrane was probed for 1 h with a goat anti-rabbit coupling to horseradish peroxidase (HRP) (1 / 5000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and detected with ECL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The chemiluminescence was analysed with the ChemiSmart 5100 device (PeQLab Biothecnologie GmbH, Erlangen, DE) and blot intensity was measured using the ImageJ software (National Institute of

Health, Bethesda, MD, USA). The protein level of ORAI1 was normalized with the housekeeping protein (here actin).

4.5. Reverse transcription and real-time quantitative PCR

The UhPK and DhPK were grown on 24-well plates in triplicate. Around 80% of confluence, RNA extraction was performed according the TRI-reagent protocol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). RNAs were quantified by spectrophotometer at 260 nm and protein contamination is measured at 280 nm. Sample purity was analysed by the optical densities report (OD) at 260 onto 280 nm. 1 μ g of RNA was transformed to cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacture's guidelines. The measurement of the levels of keratin 14, involucrin, TRPV1, ORAI1 and PAR-2 mRNA transcript expression was realized using with the Power SYBR® Green PCR Master Mix for SYBR assay (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) on the Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instruction. The sequences for each primer were indicated in supplementary data 1 and were purchased from Eurogentec (Seraing, Liège, BEL) The housekeeping gene actine was used as an endogenous control to normalize results. The comparative threshold cycle method $\Delta\Delta C_t$ was used to quantify the results. A MTT test at 4 h was performed to analyze the effect of antagonists on cell viability (Data not shown).

4.6. Immunocytological assay

UhPK and DhPK were plated on poly-L-lysine coated on glass-bottom slide compartmented with flexiPERM® 8-wells (Sarstedt, Nümbrecht, DE). At 80% of confluence, the cells were fixed and permeabilized with cold methanol during 30 s and blocked in PBS containing 2.5% foetal calf serum (SVF) for 15 min. Then, conventional immunostaining was performed for protein detection. The primary antibodies used were: (i) mouse anti-keratin 14 (1 / 500 ; Santa Cruz, Dallas, Tex, USA), (ii) mouse anti-involucrin (1 / 500 ; Abcam, Cambridge, UK), (iii) rabbit anti-PAR-2 (1 / 500 ; Abcam, Cambridge, UK) and (iv) rabbit anti-ORAI1 (1 / 100 ; Abcam, Cambridge, UK). Antibodies specificity was controlled using isotypic control for mouse IgG (1 / 500) and rabbit IgG (1 / 500) (all from Abcam Cambridge, UK).

Goat anti-mouse TRITC (1 / 500, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, USA) and pig anti-rabbit TRITC (1 / 500, Agilent-Technologies-Dako, Santa Clara, CA, USA) were used as secondary antibodies. The nucleuses were stained by DAPI coloration (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The fluorescence analysis was obtained on BX41 Axiostar plus upright microscope, and pictures were taken with an Axiocam Cc1 digital camera (Carl Zeiss Meditec, Marly-le-Roi, FR). To analyse the change in PAR-2, ORAI1, keratin 14 and involucrin expression during differentiation process, the fluorescence measures with AxioVision software (Carl Zeiss Meditec, Marly-le-Roi, FR) and were respectively done for each conditions at the same exposition time.

4.7. Intracellular Ca^{2+} measurement

The UhPK and DhPK were grown on poly-L-lysine-coated glass-bottom dish. At 80% of confluence, the cells were loaded with 4 μ M Fura 2-AM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and 2 μ M pluronic acid (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in the Ca^{2+} -imaging buffer in dark during 45 min at 37°C and 5% CO_2 . Before initiating Ca^{2+} imaging, cells were washed away excess dye and incubated 10 min in Ca^{2+} -imaging buffer. Intracellular Ca^{2+} measurements were done according to the protocol described in (Philippe et al., 2015). To analyse Ca^{2+} release, experiments were executed at room temperature in the Ca^{2+} -imaging buffer without external Ca^{2+} and Ca^{2+} add-back was done to visualize SOCEs. Image acquisition was performed using IX71, Olympus upright microscope (Olympus Corporation, Tokyo, JAP) equipped with a monochromator illumination system (Polychrome V ; TILL Photonics Media, Pittsfield, MA, USA) and 415DCLP dichroic mirror, by a 14-bit CCD camera (EXi Blue Fluorescence Microscopy Camera ; Qimaging, Surrey, BC, CAN). Image acquisition and analysis were done by Metafluor 6.3 software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). For data analysis, the F340/F380 intensity ratio was obtained for each time point after having defined region of interest and subtracted background. The amplitude of Ca^{2+} responses was measured by calculating the difference between the basal and maximal ratio. The effects of antagonists on Ca^{2+} fluctuation was analysed 15 min before SLIGKV incubation (Data not shown).

4.8. NF- κ B-luciferase assay

The DhPK cells were grown on 96-wells white plate in triplicate. At 80% confluence, endogenous NF- κ B activity was analysed using the pNF- κ B-Tluc16-DD luciferase reporter vector (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Plasmid were transfected into DhPK using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufactory's instruction. At 48 h after transfection, the luciferase activity was recorded according the TurboLucTM One-Step Glow Assay Kit process (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data acquisition and analysis was performed with the SoftMax® Pro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.9. Analysis of cytokine release

The DhPK were cultured in 96-wells plates in triplicate. At 80% confluence the cells were stimulated for 24 h and the release level of inflammatory mediators were measured according the Duo Set ELISA Kits guidelines (R&D systems, Minneapolis, MN, USA): TSLP (DY1398-05), TNF- α (DY210-05) and IL-1 β (DY276-05). A MTT test at 24 h was performed to analyze the effect of antagonists on cell viability (Data not shown).

4.10. Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical significance was analyse using GraphPad Prism 3 (GraphPad software Inc., Ca, U.S.A) and assessed using one-way ANOVA or Wilcoxon-Mann-Withney test. Differences between means were considered significant at $P < 0.05$.

Acknowledgements:

This work was supported by the Uriage Dermatological Laboratories, Courbevoie, France. The authors wish to thank the entire team of the LINK, EA4685. We thank Dr W. Hu for providing skin samples. We also thank the Dr O.Mignen and his team for kindly providing access for calcium imaging as well as thapsigergin. No conflict of interest

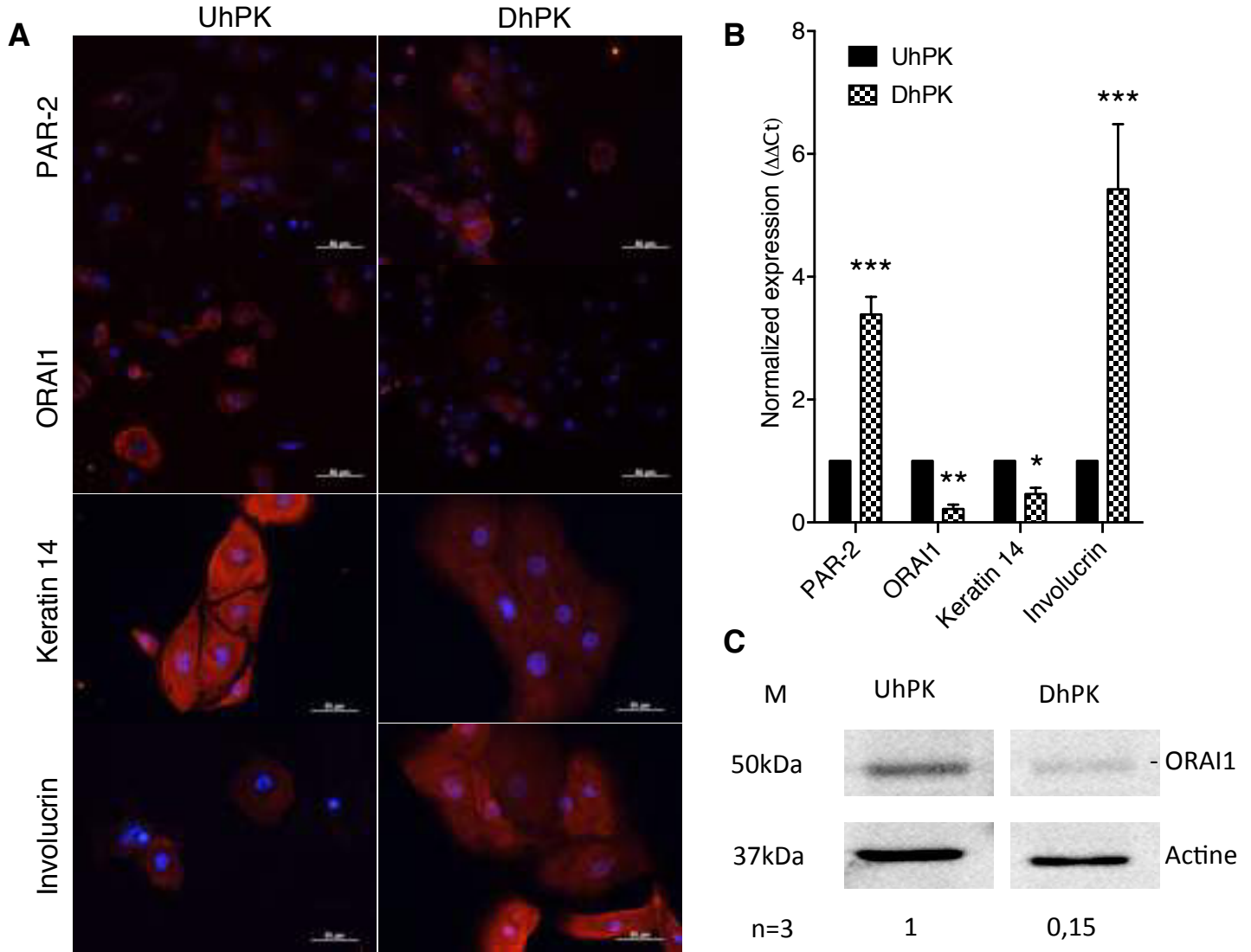
5. Supplementary data

5.1. Supplementary data 1

No.	Name (accession no.)	Forward (5'...-3')	Backward (5'...-3')
1	hActin (NM_001101.3)	GAGACCTTCAACACCCCAGC	ATGTCACGCACGATTTCCCT
2	hOrai1 (NM_032790)	AGGTGATGAGCCTCAACGAG	CTGATCATGAGCGCAAACAG
3	hKeratin 14 (NM_000526.4)	TCATCCAGAGATGTGACCTCC	GTTCTTGGTGCGAAGGACCTG
4	hInvolucrin (NM_005547)	GCCTCAGCCTTACTGTGAGT	GAGCTCCTGACTGAGGGCA
5	hTRPV1 (NM_080704.3)	CAACAAGATCGCACAGGAGA	TCCTTGCCATCAGGTGTGTA
6	hTSLP (NM_033035.4)	GGCTAAACCATGACAGAA	CCCTGAGCTTCTCTGGACA
7	hTNF- α (NM_000594.3)	AGAACTCACTGGGGCCTACA	GCTCCGTGTCTCAAGGAAGT
8	hIL-1 β (NM_000576.2)	ACCAAACCTCTTCGAGGCAC	AGCCATCATTTCACTGGCGA
12	hPAR-2 (NM_005242.4)	TGCTAGCAGCCTCTCTCTCC	CCAGTGAGGACAGATGCAGA

Supplementary data 1: Primers used for the real time quantitative PCR

5.2. Supplementary data 2



Supplementary data 2: Evolution of PAR-2 and ORAI1 expression in UhPK and DhPK.

(A) Immunohistological assay for the expression of PAR-2-, ORAI1- Keratin 14 and involucrin in UhPK and DhPK. Cells were labelled with PAR-2-, ORAI1- Keratin 14- and Involucrin-antibodies and revealed with secondary antibodies coupling to TRITC. Nucleuses were stained in blue using DAPI coloration. The stained cells were visualized using fluorescence microscopy (representative of three independent experiments). (B) Real-time quantitative PCR showing the expression levels of PAR-2-, ORAI1- Keratin 14 and involucrin in UhPK and DhPK. Data were normalized with the actine housekeeping gene expression and report to the UhPK condition (data exhibited are mean $\pm$ SEM; $n = 3$ replicates; representative of three independent experiments, Wilcoxon-Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

C. Expériences complémentaires de l'article 3

1. Contrôle de l'effet des antagonistes et de leur solvant sur DhPK

1.1. Sur la viabilité

Dans l'objectif de vérifier si les antagonistes, les ARNi et le solvant de l'article 3 peuvent altérer la viabilité cellulaire des DhPK et donc perturber l'interprétation de nos résultats, un test MTT a été réalisé. Comme le montre la figure 18, les ARNi dirigés contre PAR-2, TRPV1 et ORAI1 ainsi que l'ARNi non spécifique (siScramble, contrôle négatif) n'avaient pas d'effet sur la viabilité des cellules après 48 h de transfection. Après 4 h et 24 h d'incubation, temps correspondant à l'incubation pour la qPCR et les tests ELISA, l'ensemble des antagonistes et leur solvant (0,05% de DMSO) n'induisaient pas de perte de la viabilité cellulaire en comparaison avec la condition contrôle. En revanche, le contrôle positif, 1X de solution de lyse, provoquait une forte diminution de 75-80% de la viabilité cellulaire à 48 h de transfection ainsi qu'à 4 h et 24 h d'incubation.

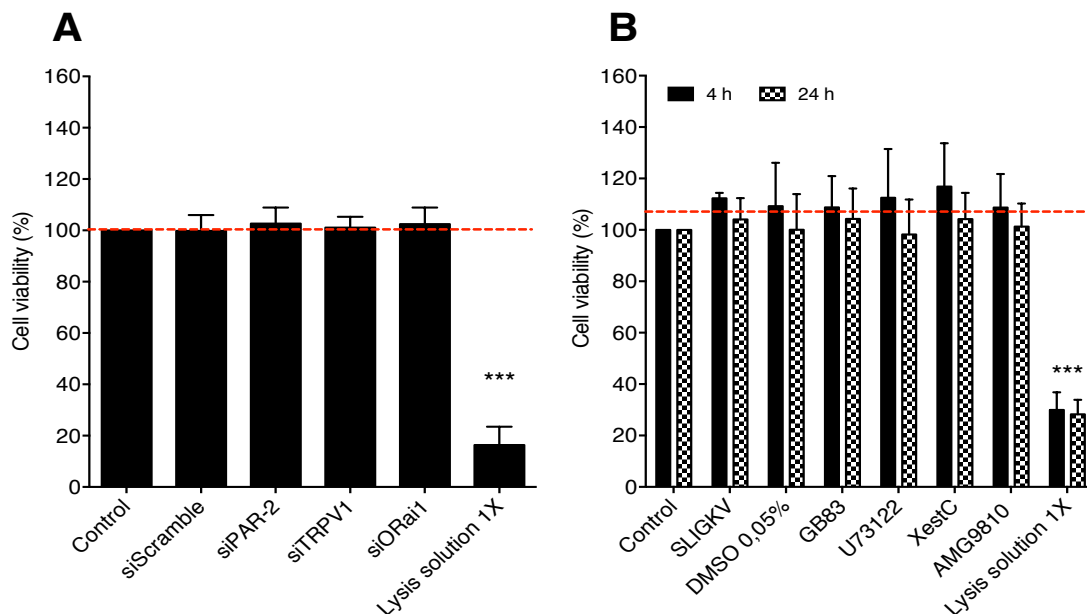


Figure 18. Viabilité des DhPK au solvant, ARNi et antagonistes.

Graphique représentant la viabilité cellulaire des DhPK en réponse (A) aux ARNi (PAR-2, TRPV1, ORAI1 et siScramble) après 48 h de transfection ainsi qu'aux antagonistes à 4 h et 24 h d'incubation. Les antagonistes utilisés étaient les suivants : GB83 (2 μ M, PAR-2), U73122 (10 μ M, PLC), Xestospongin C (5 μ M, InsP3R), AMG9810 (1 μ M, TRPV1). Le solvant était le DMSO à 0,05% et le SLIGKV à 100 μ M était le peptide agoniste de PAR-2. Le tampon de lyse à 1X a été utilisé en contrôle positif. Le graphique représente les valeurs moyennes $\pm$ SEM de n = 3 expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test ANOVA one-way : * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01 ; *** = p < 0,001 ; ns = non significatif.

1.2. Sur la déplétion des réserves calciques

Nous avons voulu confirmer que la pré-incubation des antagonistes utilisés dans l'article 3 et leur solvant (DMSO à 0,05%) n'avait pas d'effets sur la déplétion des réserves calciques dans les DhPK. Nous avons réalisé des expériences d'imagerie calcique en condition sans Ca^{2+} et les antagonistes ont été appliqués directement sur les DhPK. La thapsigargine (TG), un inhibiteur des pompes SERCA connue pour induire la déplétion des réserves calciques, a été utilisée comme contrôle positif. Comme décrit sur la figure 19, représentant les amplitudes maximales de la déplétion des réserves calciques, l'ensemble des antagonistes et leur solvant (DMSO 0,05%) n'avaient pas d'impact sur la déplétion des réserves calciques. La TG induisait bien une déplétion des réserves calciques comparativement aux antagonistes, au contrôle et au solvant.

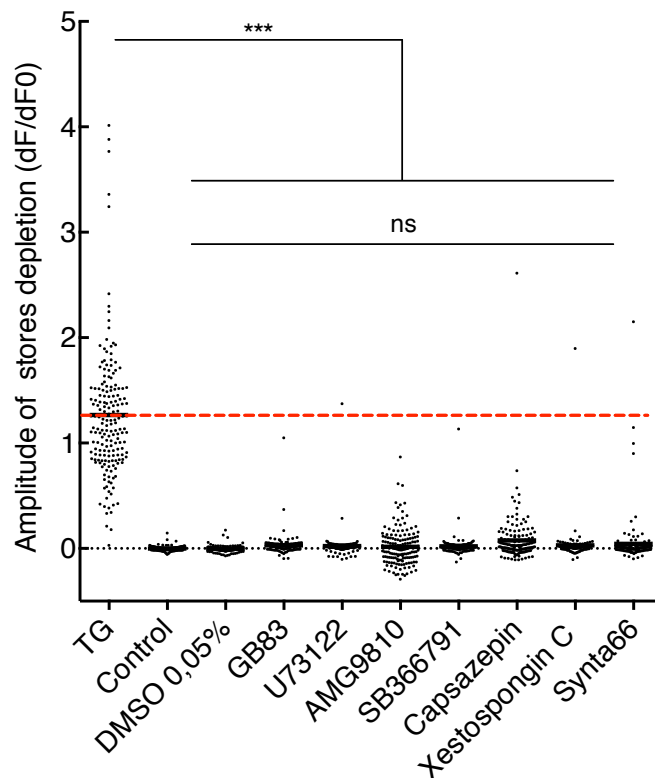


Figure 19. Effets du solvant et des antagonistes sur la réponse calcique des DhPK.

Graphique représentant l'amplitude maximale (dF/dF0) de la déplétion des réserves calciques induites par le solvant (DMSO 0,05%) ainsi que les antagonistes du PAR-2 (2 μM , GB83), PLC (10 μM , U73122), de TRPV1 (1 μM , AMG9810 ; 1 μM , SB366791 ; 10 μM , capsazepine), InsP3R (5 μM , XestosponginC) et ORAI1 (10 μM , Synta66) dans les DhPK. La thapsigargine (TG), inhibiteur des pompes SERCAs, a été utilisée à 2 μM comme contrôle positif de la déplétion des réserves calciques. Chaque point représente la réponse calcique maximale (F/F0) d'une cellule obtenue à partir de n = 3 expériences indépendantes, N = 45-55 cellules. La significativité a été analysée par le test ANOVA one-way : * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01 ; *** = p < 0,001 ; ns = non significatif.

2. Contrôle de la transfection des ARNi

Nous avons également contrôlé l'efficacité de nos transfections avec les ARNi dans les UhPK et DhPK. La capacité de ces ARNi à inhiber l'expression de nos gènes d'intérêts a été analysée. L'expression des ARNm de PAR-2, ORAI1 et TRPV1 a été analysée par RT-qPCR après 48 h de transfection avec les ARNi spécifiques de chaque gène. Un ARNi n'ayant pas de séquence cible (siScramble) a été utilisé comme contrôle négatif de la transfection. Comme montré sur la figure 20 A, l'expression de PAR-2 et ORAI1 était diminuée d'environ 60% dans les UhPK par les ARNi dirigés contre ces deux cibles en comparaison avec la condition contrôle, ARNi Scramble. Les ARNi dirigés contre PAR-2 et TRPV1 induisaient une baisse significative de 60-70% de l'expression de ces deux cibles dans les DhPK (Figure 20 B).

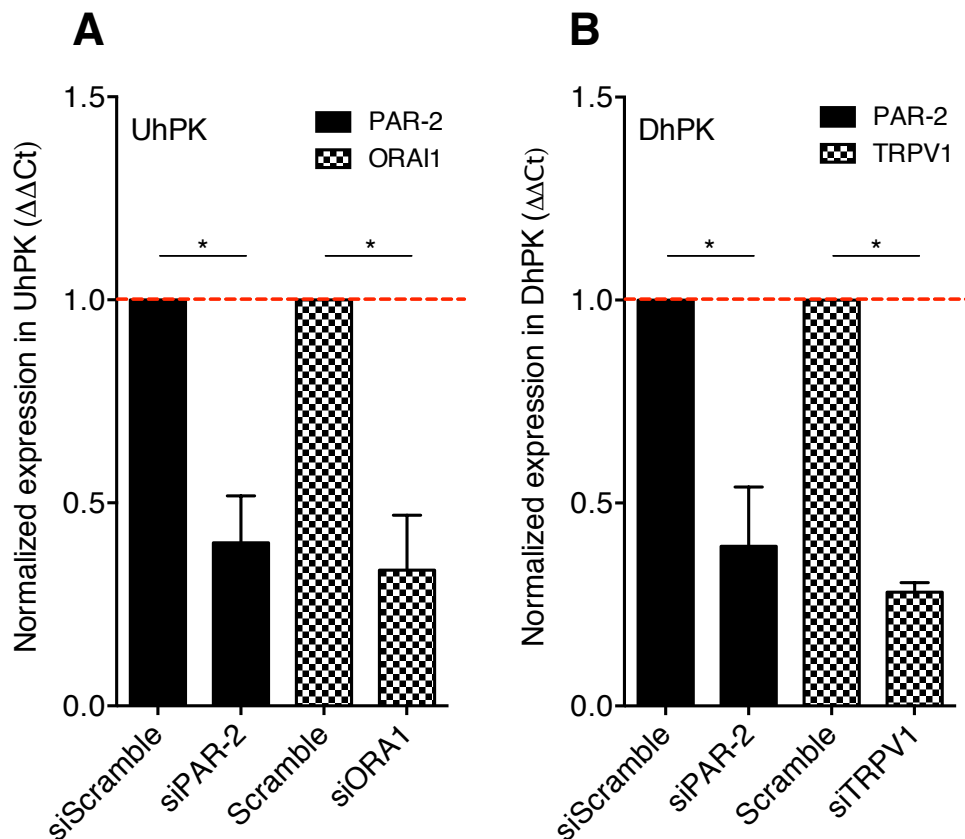


Figure 20. Contrôle de l'efficacité des ARNi dans les UhPK et DhPK

Graphique représentant l'expression relative de PAR-2 et ORAI1 selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$ suite à la transfection sur 48 h avec des ARNi dirigés contre PAR-2 et ORAI1 dans (A) les UhPK et (B) les DhPK. L'ARNi n'ayant pas de séquence cible (siScramble) a été utilisé comme contrôle négatif de la transfection. Le graphique représente les valeurs moyennes $\pm$ SEM de $n = 3$ expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test de *Mann-Whitney* : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = non significatif.

D. Conclusion et perspectives

L'activation de PAR-2 déclenche la déplétion des réserves calciques mais pas d'influx SOCEs dans les DhPK. L'absence de cet influx semblait s'expliquer par la perte d'expression d'ORAI1 retrouvée en RT-qPCR et Western blot, étant en corrélation avec la littérature (Vandenberghe et al., 2013). Nous avons également montré que la déplétion des réserves calciques induite par PAR-2 était dépendante de la PLC et des deux canaux InsP3R et TRPV1. L'activation de PAR-2, *via* des mécanismes dépendants de la PLC, de l'InsP3R et de TRPV1, stimulait l'activité du facteur de transcription NF- κ B et la production de médiateurs de l'inflammation : TSLP, IL-1 β et TNF- α . Ces trois cytokines sont connues pour être impliquées dans l'inflammation et le prurit. Nous avons montré pour la première fois que les DhPK participent également à la réponse inflammation induite par PAR-2.

En perspective de ce chapitre, nous confirmerions la localisation de TRPV1 au niveau des réserves calciques dans les DhPK. Trois grandes réserves calciques intracellulaires ont été décrites : le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et le golgi. Nous réaliserions ainsi des co-immunomarquages de TRPV1 avec des marqueurs spécifiques du réticulum endoplasmique (KDEL) ou du Golgi (58K) ou de la mitochondrie (ATPB) en microscopie confocale. Nous vérifierions que la déplétion des réserves calciques induite par TRPV1 n'est pas associée à un influx SOCE. Nous contrôlerions la localisation de TRPV1 au niveau du réticulum endoplasmique. D'une part, nous analyserions si les compartiments sont SERCA sensibles en incubant successivement l'inhibiteur des pompes SERCA (TG) et l'agoniste de TRPV1 (capsaïcine). D'autre part, nous activerions successivement TRPV1 et InsP3R, afin de déterminer si TRPV1 et InsP3R sont localisés dans les mêmes compartiments intracellulaires. Nous tenterions également de savoir si la déplétion des réserves calciques *via* InsP3R est liée ou non à celle de TRPV1 en réalisant simultanément une activation de l'un de ces canaux et une inhibition de l'autre, *et vice versa*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A. Conclusion

Les travaux menés durant ces trois années de thèse ont porté sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de PAR-2 et leurs possibles implications dans l'induction et le maintien de certaines dermatoses prurigineuses de types neurogeniques comme le psoriasis ou la DA. Nous avons choisi d'étudier les deux types cellulaires principalement impliqués dans l'INC en réalisant des cultures primaires de neurones sensoriels de rat et de DhPK. Notre choix s'est porté sur des DhPK, d'une part parce qu'ils représentent le type cellulaire le plus abondant dans l'épiderme et surexpriment PAR-2, et d'autre part, parce que peu d'études portant sur PAR-2 utilisent ces cellules. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'activation des PARs sur l'expression des gènes impliqués dans l'INC. Ce criblage a été effectué sur les neurones sensoriels de rats et les DhPK. Nous avons ensuite été regarder plus en détails les mécanismes calciques intracellulaires de l'activation de PAR-2 et analysé les bienfaits de l'eau thermale d'Uriage sur ces mécanismes dans les DhPK. Pour finir, nous avons tenté d'adapter le modèle de la lignée PC12 différenciable en neurones sensoriels pour l'étude de l'INC. Les PC12 ont été utilisées comme alternative à l'utilisation d'animaux pour les tests cosmétiques.

Avant de nous intéresser aux rôles de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels et les DhPK, nous avons confirmé que PAR-2 était exprimé dans ces deux types cellulaires, alors que PAR-4 n'était détecté que dans les neurones sensoriels. Nous nous sommes donc intéressés au rôle inflammatoire de PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels et uniquement à celui de PAR-2 dans les DhPK. Nous avons sélectionné des gènes connus pour leurs implications dans des mécanismes neurogéniques, d'innervation, de prolifération cellulaire, de maintien de la barrière cutanée et de recrutement des cellules immunitaires. Ces familles de gènes codaient des neuropeptides, des neurotrophines, des facteurs de croissance, des connexines, des MMPs et des cytokines. Nous avons réalisé un criblage de ces gènes d'intérêts qui pourraient être modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels et par PAR-2 dans les DhPK. Nous avons montré que l'activation de PAR-2 induisait une modification d'expression des neuropeptides, des facteurs de croissance et des neurotrophines dans les neurones sensoriels. Ces mêmes modulations étaient observées dans les DhPK avec en plus une modulation des cytokines, des

chimiokines, des connexines et des MMPs. Après la mise en corrélation de nos résultats des criblages obtenus sur les neurones sensoriels et les DhPK, nos résultats apportent des éléments supplémentaires aux mécanismes moléculaires induits par l'activation de PAR-2. Cela pourrait venir compléter notre connaissance actuelle de la physiopathologie du psoriasis, de la DA ou encore du NS. De manière intéressante, PAR-4 semblait agir comme un modulateur de l'activité de PAR-2 dans les neurones sensoriels en inhibant ou augmentant sa réponse sur l'expression des gènes d'intérêts.

Le Ca^{2+} est considéré comme un second messager intracellulaire responsable de l'expression et de l'exocytose de médiateurs de l'inflammation. Nous avons analysé les fluctuations de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} suite à l'activation de PAR-2 dans les DhPK. Son activation dans les UhPK déclenche la déplétion des réserves calciques et un influx SOCEs à travers ORAI1 suite à son activation par STIM1. Or, il nous semblait que les mécanismes calciques entre les UhPK et les DhPK soient différents, avec la perte de l'expression de STIM1 et ORAI1 dans les DhPK (Vandenbergh et al., 2013). La perte d'expression d'ORAI1 a été confirmée dans nos DhPK. Nous avons choisi d'explorer cette piste et de comprendre les mécanismes calciques et inflammatoires de PAR-2 dans les DhPK. Ces résultats feront l'objet d'une publication dans laquelle nous avons montré que PAR-2 induisait une déplétion des réserves calciques qui n'était pas associée à un influx SOCEs. La déplétion des réserves calciques était dépendante de la PLC et des deux canaux calciques InsP3R et TRPV1 localisés au niveau intracellulaire. L'activation de PAR-2 augmentait également l'activité NF-KB et la production de médiateurs de l'inflammation et du prurit (TSLP, TNF- α et IL-1 β) par des mécanismes dépendants de la PLC, du InsP3R et de TRPV1.

Dans le cadre d'un travail avec les laboratoires dermatologiques d'Uriage, nous avons utilisé deux approches pour étudier les effets de l'eau thermale d'Uriage sur l'activation de PAR-2 : une dans les DhPK et l'autre dans les neurones sensoriels. L'eau thermale d'Uriage appartenant à un laboratoire produisant des cosmétiques l'incluant, l'utilisation d'animaux pour la Recherche n'est pas autorisée dans l'Union Européenne. L'étude sur les GRD de rat était donc impossible. Nous avons décidé d'utiliser la lignée de PC12, qui est une lignée de phéochromocytome de rat connue

pour être différenciable en neurones sous l'influence du NGF. Nous avons caractérisé les PC12 comme neurones sensoriels périphériques par le marquage des neurofilaments, de la périphérine et du Brn3A. Leur potentiel neurosécrétoire a également été défini par le marquage de la SP, du CGRP, du TRPV1 et de PAR-2. La difficulté de les activer par les agonistes de TRPV1 et de PAR-2 suggère que ces récepteurs ou les mécanismes calciques pourraient être altérés. Bien que les PC12 expriment certains marqueurs des neurones sensoriels périphériques, la difficulté de les activer remet en cause l'utilisation de cette lignée pour une telle étude. Dans les DhPK, nous avons mis en évidence que l'eau thermique d'Uriage a des effets anti-inflammatoires en bloquant les modulations d'expression des connexines, des chimiokines, des cytokines et des MMPs induites par PAR-2. Cependant, la question demeure quant aux mécanismes impliqués dans un tel effet.

L'ensemble des résultats a été illustré par le schéma de synthèse présenté ci-dessous (Figure 21) :

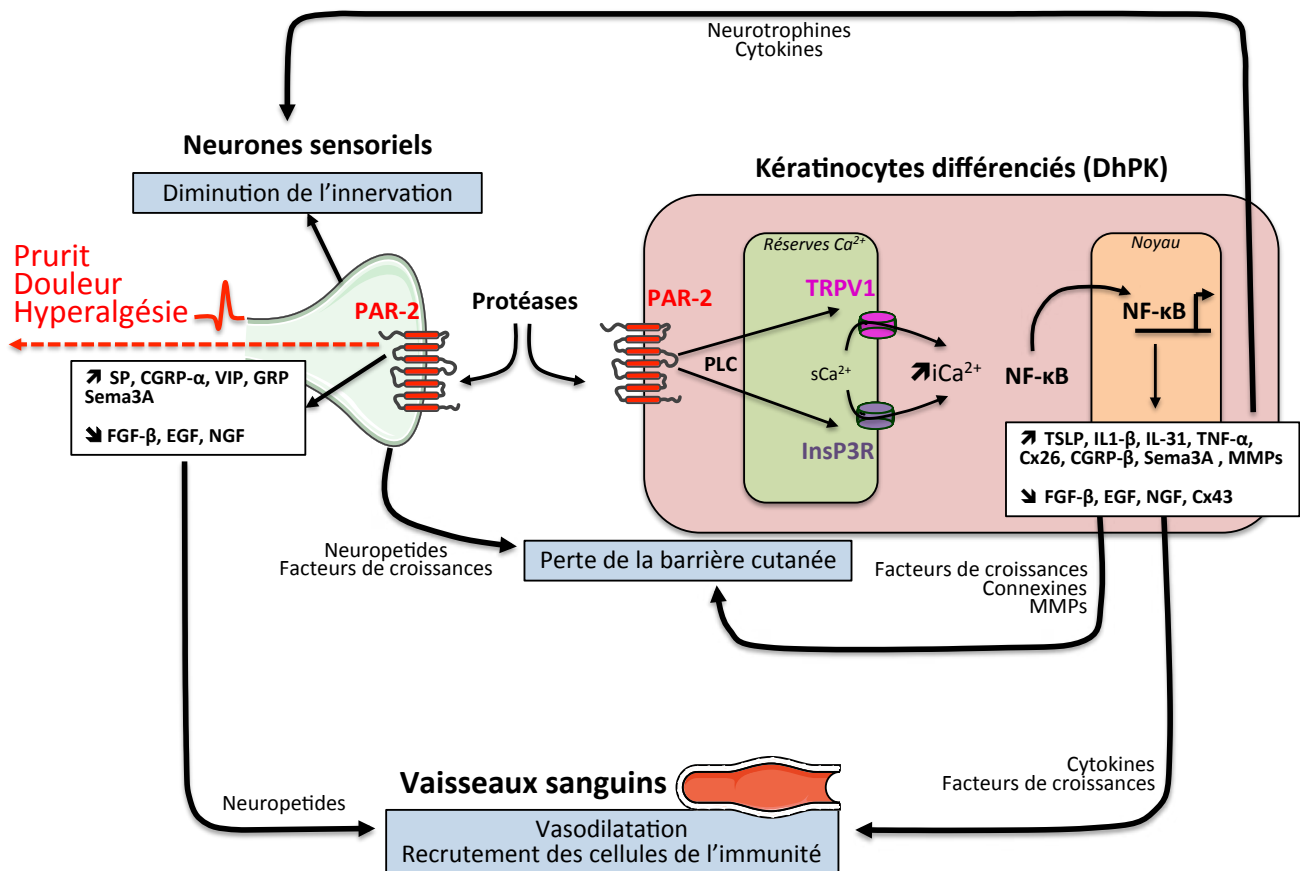


Figure 21 : Schéma de synthèse des mécanismes cellulaires et intracellulaires de PAR-2 dans les neurones sensoriels et les DhPK.

Illustration proposée des mécanismes menant à la régulation de gènes induite par PAR-2 dans les neurones sensoriels et les DhPK ainsi que de l'impact de ces médiateurs sur les cellules de la peau.

B. Perspectives

Etudier l'INC s'avère très compliquée pour plusieurs raisons. D'une part, l'INC implique au sein de la peau la participation de plusieurs types cellulaires étroitement connectés, et d'autre part, la sécrétion d'un grand nombre de molécules solubles. De plus, la majorité de ces cellules expriment les mêmes récepteurs et libèrent les mêmes médiateurs de manière synchrone ou décalée. L'ensemble de ces interactions cellulaires renforce les difficultés de compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'INC. L'utilisation de modèles unicellulaires dissociés du contexte physiologique, nous paraissait être un choix judicieux pour comprendre le rôle de chaque intervenant. Ces modèles d'étude sont néanmoins limités et n'envisagent pas des mécanismes d'inter-régulation entre les kératinocytes et les neurones.

Le premier point de perspective concerne plus particulièrement le criblage de la régulation de gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels de rat et les DhPK. Il serait important de refaire ces expériences sur des co-cultures hétérologues de neurones sensoriels de rat et de DhPK (Le Garrec et al., 2015; Pereira et al., 2010) ou sur des explants de peau réinnervés par les neurones sensoriels de rat (Lebonvallet et al., 2010, 2012, 2013). L'expression des gènes modulés par PAR-2 et PAR-4 dans les neurones sensoriels de rat et dans les DhPK sera également à confirmer au niveau protéique en analysant leur niveau de sécrétion dans le milieu par des tests ELISA par exemple.

Le second point de perspective porterait sur les PC12 comme modèle de lignée cellulaire de neurones sensoriels. Malgré la détection de marqueurs des neurones sensoriels périphériques, nous avons confirmé leur difficulté d'activation par la capsaïcine (TRPV1) et par le peptide agoniste de PAR-2 (SLIGKV). Nous avons conclu que l'absence de réponse calcique était probablement due à une fonctionnalité altérée de ces deux récepteurs ou encore à des défauts dans les voies de signalisation intracellulaire (Someya et al., 2004). Pour répondre à cette problématique, il serait pertinent de transfecter les PC12 avec des plasmides d'expression de TRPV1 et de PAR-2 fonctionnels, et de confirmer par la suite la bonne fonctionnalité de ces récepteurs en imagerie calcique. Si cette fonctionnalité

est avérée, nous tenterions d'analyser la modulation de gènes ainsi que le niveau de sécrétion de neuropeptides induits par PAR-2 et TRPV1. La modulation induite par PAR-2 dans les PC12 à celle obtenue dans les neurones sensoriels issus de GRD de rat serait ensuite comparée. Si les PC12 s'avèrent sécréter des neuropeptides nous pourrions remplacer les neurones sensoriels issus des GRD de rats et nous affranchir des animaux pour l'étude de l'INC (Le Garrec et al., 2015; Lebonvallet et al., 2010, 2012, 2013; Pereira et al., 2010). La mise en place d'un tel modèle sera également un enjeu économique majeur pour notre laboratoire dans le développement des tests cosmétiques avec les industriels.

Le dernier point de perspective concerne la localisation du canal calcique TRPV1 dans les DhPK. Il faudrait déterminer le type de réserves calciques intracellulaires (réticulum endoplasmique, golgi, mitochondrie) dans lequel est localisé TRPV1. L'eau thermale d'Uriage impactait les modulations d'expression induites par l'activation de PAR-2, néanmoins ces mécanismes d'action restent méconnus. L'eau thermale d'Uriage est fortement minéralisée et peut, par conséquence, impacter la réponse calcique des DhPK. Il serait intéressant d'analyser si cette eau thermale peut moduler la réponse calcique induite par PAR-2 dans les DhPK, et à quel niveau intracellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel Hay, R.M., Ibrahim, N.F., Metwally, D., and Rashed, L.A. (2013). The role of interleukin-1 β and interleukin-33 in atopic dermatitis. *Our Dermatol. Online* 4, 111–114.
- Ackermann, L., and Harvima, I.T. Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF- α and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 353–359.
- Ahn, S., Siddiqi, M.H., Aceituno, V.C., Simu, S.Y., Zhang, J., Jimenez Perez, Z.E., Kim, Y.-J., and Yang, D.-C. (2016). Ginsenoside Rg5:Rk1 attenuates TNF- α /IFN- γ -induced production of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) and LPS-induced NO production via downregulation of NF- κ B/p38 MAPK/STAT1 signaling in human keratinocytes and macrophages. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 52, 287–295.
- Ahnert-Hilger, G., Braeutigam, M., and Gratzl, M. (1987). Calcium-stimulated catecholamine release from α -toxin-permeabilized PC12 cells: biochemical evidence for exocytosis and its modulation by protein kinase C and G proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 7842–7848.
- Akaishi, S., Ogawa, R., and Hyakusoku, H. (2008). Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med. Hypotheses* 71, 32–38.
- Akiyama, T., Tominaga, M., Takamori, K., Carstens, M.I., and Carstens, E. (2014). Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. *Pain* 155, 80–92.
- Akiyama, T., Ivanov, M., Nagamine, M., Davoodi, A., Carstens, M.I., Ikoma, A., Cevikbas, F., Kempkes, C., Buddenkotte, J., Steinhoff, M., et al. (2016). Involvement of TRPV4 in Serotonin-Evoked Scratching. *J. Invest. Dermatol.* 136, 154–160.
- Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Jeske, N.A., and Hargreaves, K.M. (2007). Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J. Physiol.* 583, 175–193.
- Alpizar, Y.A., Boonen, B., Gees, M., Sanchez, A., Nilius, B., Voets, T., and Talavera, K. (2013). Allyl isothiocyanate sensitizes TRPV1 to heat stimulation. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 466, 507–515.
- Altrichter, S., Boodstein, N., and Maurer, M. (2009). Matrix metalloproteinase-9: a novel biomarker for monitoring disease activity in patients with chronic urticaria patients? *Allergy* 64, 652–656.
- Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G.S., Grady, E.F., Trevisani, M., Manni, C., Geppetti, P., McRoberts, J.A., Ennes, H., et al. (2004). Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4300–4312.
- Amadesi, S., Cottrell, G.S., Divino, L., Chapman, K., Grady, E.F., Bautista, F., Karanjia, R., Barajas-Lopez, C., Vanner, S., Vergnolle, N., et al. (2006). Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C ϵ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J. Physiol.* 575, 555–571.
- Anand, U., Otto, W.R., Facer, P., Zebda, N., Selmer, I., Gunthorpe, M.J., Chessell, I.P., Sinisi, M., Birch, R., and Anand, P. (2008). TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat

sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 438, 221–227.

Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S., and Bevan, S. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2485–2494.

Andreev, Y.A., Vassilevski, A.A., and Kozlov, S.A. (2012). Molecules to selectively target receptors for treatment of pain and neurogenic inflammation. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 6, 35–45.

Ansel, J., Perry, P., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., Luger, T., and Hefeneider, S. (1990). Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 94, 101S – 107S.

Asfaha, S., Cenac, N., Houle, S., Altier, C., Papez, M.D., Nguyen, C., Steinhoff, M., Chapman, K., Zamponi, G.W., and Vergnolle, N. (2007). Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br. J. Pharmacol.* 150, 176–185.

Atoyan, R., Shander, D., and Botchkareva, N.V. (2009). Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2312–2315.

Aubdool, A.A., and Brain, S.D. (2011). Neurovascular aspects of skin neurogenic inflammation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 15, 33–39.

Bae, J.Y., Kim, J.H., Cho, Y.S., Mah, W., and Bae, Y.C. (2015). Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion. *J. Comp. Neurol.* 523, 126–138.

Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849–857.

Barbier, null, and Ricard, null (1951). [The cure at Uriage, based on recent medical and pathological research]. *Maroc Méd.* 30, 208–209.

Basu, S., and Srivastava, P. (2005). Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5120–5125.

Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269–1282.

Bautista, D.M., Pellegrino, M., and Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 181–200.

Bayliss, W.M. (1901). On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *J. Physiol.* 26, 173–209.

Beauvais, F., Garcia-Mace, J., and Joly, F. (1998). In vitro effects of Uriage spring water on the apoptosis of human eosinophils. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 446–450.

Benecke, H., Waring, J., Lotts, T., and Stander, S. Transient receptor potential

channels and pruritus. In *TRP Channels in Drug Discovery*, (Tamas Birio),.

Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W. (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721–731.

Bhave, G., Hu, H.-J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12480–12485.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., and Rifkin, D.B. (1997). Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocr. Rev.* 18, 26–45.

Bikle, D.D., and Mauro, T.M. (2014). Calcium, Orai1, and epidermal proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1506–1508.

Billeter, A.T., Galbraith, N., Walker, S., Lawson, C., Gardner, S.A., Sarojini, H., Galandiuk, S., and Polk, H.C. (2015). TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response. *Surgery* 158, 646–654.

Binshtok, A.M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G.J., Ji, R.-R., Bean, B.P., Woolf, C.J., et al. (2008). Nociceptors Are Interleukin-1 β Sensors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 14062–14073.

Birklein, F., and Schmelz, M. (2008). Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci. Lett.* 437, 199–202.

Bíró, T., Maurer, M., Modarres, S., Lewin, N.E., Brodie, C., Ács, G., Ács, P., Paus, R., and Blumberg, P.M. (1998). Characterization of Functional Vanilloid Receptors Expressed by Mast Cells. *Blood* 91, 1332–1340.

Boillat, A., Alijevic, O., and Kellenberger, S. (2014). Calcium entry via TRPV1 but not ASICs induces neuropeptide release from sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 61C, 13–22.

Bos, J.D. (1997). The skin as an organ of immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 107 Suppl 1, 3–5.

Boulais, N., and Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. *Eur. J. Dermatol. EJD* 18, 119–127.

Braunstein, S., Kaplan, G., Gottlieb, A.B., Schwartz, M., Walsh, G., Abalos, R.M., Fajardo, T.T., Guido, L.S., and Krueger, J.G. (1994). GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 103, 601–604.

Braverman, I.M., and Yen, A. (1977a). Ultrastructure of the human dermal microcirculation. II. The capillary loops of the dermal papillae. *J. Invest. Dermatol.* 68, 44–52.

Braverman, I.M., and Yen, A. (1977b). Ultrastructure of the capillary loops in the dermal papillae of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 68, 53–60.

Brazzini, B., Ghersetich, I., Hercogova, J., and Lotti, T. (2003). The neuro-immuno-cutaneous-endocrine network: relationship between mind and skin. *Dermatol. Ther.* 16, 123–131.

Briot, A., Deraison, C., Lacroix, M., Bonnard, C., Robin, A., Besson, C., Dubus, P.,

- and Hovnanian, A. (2009). Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* *206*, 1135–1147.
- Briot, A., Lacroix, M., Robin, A., Steinhoff, M., Deraison, C., and Hovnanian, A. (2010). Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in Netherton syndrome adult mouse model. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2736–2742.
- Buddenkotte, J., Stroh, C., Engels, I.H., Moormann, C., Shpacovitch, V.M., Seeliger, S., Vergnolle, N., Vestweber, D., Luger, T.A., Schulze-Osthoff, K., et al. (2005). Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 38–45.
- Buhé, V., Vié, K., Guéré, C., Natalizio, A., Lhéritier, C., Le Gall-Ianotto, C., Huet, F., Talagas, M., Lebonvallet, N., Marcorelles, P., et al. (2016). Pathophysiological Study of Sensitive Skin. *Acta Derm. Venereol.* *96*, 314–318.
- Bunker, C.B., Cerio, R., Bull, H.A., Evans, J., Dowd, P.M., and Foreman, J.C. (1991). The effect of capsaicin application on mast cells in normal human skin. *Agents Actions* *33*, 195–196.
- Burgess, G.M., Mullaney, I., McNeill, M., Dunn, P.M., and Rang, H.P. (1989). Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* *9*, 3314–3325.
- Cabanillas, B., and Novak, N. (2016). Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr. Opin. Immunol.* *42*, 1–8.
- Caley, M.P., Martins, V.L.C., and O'Toole, E.A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care* *4*, 225–234.
- Castro, J., Aromataris, E.C., Rychkov, G.Y., and Barritt, G.J. (2009). A small component of the endoplasmic reticulum is required for store-operated Ca²⁺ channel activation in liver cells: evidence from studies using TRPV1 and taurodeoxycholic acid. *Biochem. J.* *418*, 553–566.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* *389*, 816–824.
- Caughey, G.H. (2011). Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv. Exp. Med. Biol.* *716*, 212–234.
- Cesare, P., Moriondo, A., Vellani, V., and McNaughton, P.A. (1999). Ion channels gated by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7658–7663.
- Chao, L.K., Hua, K.-F., Hsu, H.-Y., Cheng, S.-S., Lin, I.-F., Chen, C.-J., Chen, S.-T., and Chang, S.-T. (2008). Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *46*, 220–231.
- Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A.D., Bonafé, J.L., Wilkinson, J., Taïeb, A., Barrandon, Y., et al. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* *25*, 141–142.

- Chen, D., Wang, Z., Zhang, Z., Zhang, R., and Yu, L. (2013). Capsaicin up-regulates protease-activated receptor-4 mRNA and protein in primary cultured dorsal root ganglion neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* **33**, 337–346.
- Chen, K., Zhang, Z.-F., Liao, M.-F., Yao, W.-L., Wang, J., and Wang, X.-R. (2015). Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. *J. Neurol. Sci.* **352**, 62–67.
- Chen, Y., Yang, C., and Wang, Z.J. (2011). Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* **193**, 440–451.
- Chéret, J., Lebonvallet, N., Carré, J.-L., Misery, L., and Le Gall-Ianotto, C. (2013). Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **21**, 772–788.
- Ching, L.-C., Kou, Y.R., Shyue, S.-K., Su, K.-H., Wei, J., Cheng, L.-C., Yu, Y.-B., Pan, C.-C., and Lee, T.-S. (2011). Molecular mechanisms of activation of endothelial nitric oxide synthase mediated by transient receptor potential vanilloid type 1. *Cardiovasc. Res.* **91**, 492–501.
- Cho, S.I., Yang, Y.S., Choi, M.G., Choi, Y.H., Kwak, I.S., Park, C.W., and Kim, H.O. (2014). Increased Expression of Three Types of Transient Receptor Potential Channels (TRPA1, TRPV4 and TRPV3) in Burn Scars with Post-burn Pruritus. *Acta Derm. Venereol.*
- Cholewinski, A., Burgess, G.M., and Bevan, S. (1993). The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **55**, 1015–1023.
- Chu, P.G., and Weiss, L.M. (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* **40**, 403–439.
- Chu, C.-C., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2011). Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin. Immunol.* **23**, 28–41.
- Chu, D.Q., Choy, M., Foster, P., Cao, T., and Brain, S.D. (2000). A comparative study of the ability of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin(13 - 52) to modulate microvascular but not thermal hyperalgesia responses. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1589–1596.
- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., and Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957–962.
- Clavie, L.C. (1961). [The treatment of dry dermatoses at Uriage]. *Maroc Méd.* **40**, 252–254.
- Cocks, T.M., and Moffatt, J.D. (2000). Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 103–108.
- Cohen, S. (1993). Epidermal Growth Factor. In *Physiology or Medicine 1981-1990 : Nobel Lectures, Including Presentation Speeches and Laureate's Biographies.*, pp. 333–345.

- Contassot, E., Beer, H.-D., and French, L.E. (2012). Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13590.
- Costa, A., Eberlin, S., Poletti, A.J., da Costa Pereira, A.F., Pereira, C.S., Ferreira, N.M.C., Dolis, E., and Torloni, L.B.O. (2014). Neuromodulatory and anti-inflammatory ingredient for sensitive skin: in vitro assessment. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 13, 191–198.
- Couderot-Masuyer, C., A. Gougerot, and P. Humbert (2006). Etude in vitro du potentiel cicatrisant de l'eau thermale d'Uriage. *Nouv Dermatol* 24, 633–642.
- Dai, H., and Korthuis, R.J. (2011). Mast Cell Proteases and Inflammation. *Drug Discov. Today Dis. Models* 8, 47–55.
- Dai, Y., Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2004). Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4293–4299.
- Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H., and Noguchi, K. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.* 117, 1979–1987.
- Dall'acqua, M.C., Bonet, I.J.M., Zampronio, A.R., Tambeli, C.H., Parada, C.A., and Fischer, L. (2014). The contribution of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) to the in vivo nociceptive effects of prostaglandin E2. *Life Sci.*
- Dallos, A., Kiss, M., Polyánka, H., Dobozy, A., Kemény, L., and Husz, S. (2006). Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. *Neuropeptides* 40, 251–263.
- Davis, K.D. (1998). Cold-induced pain and prickle in the glabrous and hairy skin. *Pain* 75, 47–57.
- Démarchez, M. (2014). La phase inflammatoire de la cicatrisation cutanée.
- Denda, M., Fuziwara, S., Inoue, K., Denda, S., Akamatsu, H., Tomitaka, A., and Matsunaga, K. (2001). Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1250–1252.
- Denda, M., Nakatani, M., Ikeyama, K., Tsutsumi, M., and Denda, S. (2007). Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Exp. Dermatol.* 16, 157–161.
- Descargues, P., Deraison, C., Bonnart, C., Kreft, M., Kishibe, M., Ishida-Yamamoto, A., Elias, P., Barrandon, Y., Zambruno, G., Sonnenberg, A., et al. (2005). Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat. Genet.* 37, 56–65.
- Diogenes, A., Akopian, A.N., and Hargreaves, K.M. (2007). NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *J. Dent. Res.* 86, 550–555.
- Docherty, R.J., Yeats, J.C., Bevan, S., and Boddeke, H.W. (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured

dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **431**, 828–837.

Doerner, J.F., Gisselmann, G., Hatt, H., and Wetzel, C.H. (2007). Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J. Biol. Chem.* **282**, 13180–13189.

Earley, S., Gonzales, A.L., and Crnich, R. (2009). Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. *Circ. Res.* **104**, 987–994.

Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3471–3480.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174.

Elsholz, F., Harteneck, C., Muller, W., and Friedland, K. (2015). Calcium — a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur. J. Dermatol.* **24**, 650–661.

Fantini, F., Magnoni, C., Bracci-Laudiero, L., and Pincelli C, T.E. (1995). Nerve growth factor is increased in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 854–855.

Farahnik, B., Nakamura, M., Singh, R.K., Abrouk, M., Zhu, T.H., Lee, K.M., Jose, M.V., DaLovichio, R., Koo, J., Bhutani, T., et al. (2016). The Patient's Guide to Psoriasis Treatment. Part 2: PUVA Phototherapy. *Dermatol. Ther.* **6**, 315–324.

Ferri, G.L., Sabani, A., Abelli, L., Polak, J.M., Dahl, D., and Portier, M.M. (1990). Neuronal intermediate filaments in rat dorsal root ganglia: differential distribution of peripherin and neurofilament protein immunoreactivity and effect of capsaicin. *Brain Res.* **515**, 331–335.

De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., and Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **121**, 4930–4937.

Finch, P.W., Murphy, F., Cardinale, I., and Krueger, J.G. (1997). Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am. J. Pathol.* **151**, 1619–1628.

Fischer, M.J.M., Balasuriya, D., Jeggle, P., Goetze, T.A., McNaughton, P.A., Reeh, P.W., and Edwardson, J.M. (2014). Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflugers Arch.*

Frank, S., Madlener, M., and Werner, S. (1996). Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* **271**, 10188–10193.

Frateschi, S., Camerer, E., Crisante, G., Rieser, S., Membrez, M., Charles, R.-P., Beermann, F., Stehle, J.-C., Breiden, B., Sandhoff, K., et al. (2011). PAR2 absence completely rescues inflammation and ichthyosis caused by altered CAP1/Prss8 expression in mouse skin. *Nat. Commun.* **2**, 161.

Frydas, S., Varvara, G., Murmura, G., Saggini, A., Caraffa, A., Antinolfi, P., Tete', S., Tripodi, D., Conti, F., Cianchetti, E., et al. (2013). Impact of capsaicin on mast cell inflammation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **26**, 597–600.

- Fu, Q., Cheng, J., Gao, Y., Zhang, Y., Chen, X., and Xie, J. (2014). Protease-Activated Receptor 4: A Critical Participator in Inflammatory Response. *Inflammation*.
- Furio, L., de Veer, S., Jaillet, M., Briot, A., Robin, A., Deraison, C., and Hovnanian, A. (2014). Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* *211*, 499–513.
- Gallego-Sandín, S., Rodríguez-García, A., Alonso, M.T., and García-Sancho, J. (2009). The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. *J. Biol. Chem.* *284*, 32591–32601.
- Le Garrec, R., L’herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Lebonvallet, N., Leschiera, R., Buhe, V., Talagas, M., Vetter, I., Lewis, R.J., and Misery, L. (2015). Release of neuropeptides from a neuro-cutaneous co-culture model: A novel in vitro model for studying sensory effects of ciguatoxins. *Toxicon*.
- Gees, M., Coloul, B., and Nilius, B. (2010). The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Geherin, S.A., Fintushel, S.R., Lee, M.H., Wilson, R.P., Patel, R.T., Alt, C., Young, A.J., Hay, J.B., and Debes, G.F. (2012). The skin, a novel niche for recirculating B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 6027–6035.
- Gilfillan, A.M., and Beaven, M.A. (2011). Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* *31*, 475–529.
- Gomides, L.F., Lima, O.C.O., Matos, N.A., Freitas, K.M., Francischi, J.N., Tavares, J.C., and Klein, A. (2014). Blockade of proteinase-activated receptor 4 inhibits neutrophil recruitment in experimental inflammation in mice. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al*.
- Gong, K., Zou, X., Fuchs, P.N., and Lin, Q. (2015). Minocycline inhibits neurogenic inflammation by blocking the effects of tumor necrosis factor- α . *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*
- Gouin, O., Lebonvallet, N., L’Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.-L., and Misery, L. (2015a). Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. *Exp. Dermatol.*
- Gouin, O., Lebonvallet, N., L’Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.L., Lefeuvre, L., and Misery, L. (2015b). Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. *Exp. Dermatol.*
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 2424–2428.
- Guenther, F., and Melzig, M.F. (2015). Protease-activated receptors and their biological role - focused on skin inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* *67*, 1623–1633.
- Guillon, A., and Ricard, J. (1964). [DERMATOLOGIC INDICATIONS FOR THE URIAGE CURE]. *Presse Therm. Clim.* *101*, 112–114.
- Haegerstrand, A., Dalsgaard, C.J., Jonzon, B., Larsson, O., and Nilsson, J. (1990). Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3299–3303.
- Harvima, I.T., Nilsson, G., and Naukkarinen, A. (2010). Role of mast cells and

sensory nerves in skin inflammation. *G. Ital. Dermatol. E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Dermatol. E Sifilogr.* **145**, 195–204.

Helen Turner, A.F. (2003). Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J* **371**(Pt 2):341-50. *Biochem. J.* **371**, 341–350.

Herbert, M.K., and Holzer, P. (2002). [Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology]. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmedizin Schmerzther. AINS* **37**, 314–325.

Himi, N., Hamaguchi, A., Hashimoto, K., Koga, T., Narita, K., and Miyamoto, O. (2012). Calcium influx through the TRPV1 channel of endothelial cells (ECs) correlates with a stronger adhesion between monocytes and ECs. *Adv. Med. Sci.* **57**, 224–229.

Hinman, A., Chuang, H.-H., Bautista, D.M., and Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19564–19568.

Hoare, C., Li Wan Po, A., and Williams, H. (2000). Systematic review of treatments for atopic eczema. *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* **4**, 1–191.

Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.

Honda, K., Shinoda, M., Furukawa, A., Kita, K., Noma, N., and Iwata, K. (2014). TRPA1 contributes to capsaicin-induced facial cold hyperalgesia in rats. *Eur. J. Oral Sci.*

Hoogerwerf, W.A., Zou, L., Shenoy, M., Sun, D., Micci, M.A., Lee-Hellmich, H., Xiao, S.Y., Winston, J.H., and Pasricha, P.J. (2001). The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 9036–9042.

Horváth, G., Kemény, Á., Barthó, L., Molnár, P., Deli, J., Szente, L., Bozó, T., Pál, S., Sándor, K., Szőke, É., et al. (2015). Effects of Some Natural Carotenoids on TRPA1- and TRPV1-Induced Neurogenic Inflammatory Processes In Vivo in the Mouse Skin. *J. Mol. Neurosci. MN.*

Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., et al. (2011). Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β : Implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. *PAIN* **152**, 2036–2051.

Houle, S., Papez, M.D., Ferazzini, M., Hollenberg, M.D., and Vergnolle, N. (2005). Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br. J. Pharmacol.* **146**, 670–678.

Hovnanian, A. (2013). Netherton syndrome: skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition. *Cell Tissue Res.* **351**, 289–300.

Hsu, H.-Y., and Wen, M.-H. (2002). Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 22131–22139.

Huang, L.-Y.M., and Neher, E. (1996). Ca^{2+} -Dependent Exocytosis in the Somata of Dorsal Root Ganglion Neurons. *Neuron* **17**, 135–145.

- Huang, J., Zhang, X., and McNaughton, P.A. (2006). Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 197–206.
- Huang, J., Stohl, L.L., Zhou, X., Ding, W., and Granstein, R.D. (2011). Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells. *Brain. Behav. Immun.* 25, 787–799.
- Hwang, S.W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C.J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D., et al. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6155–6160.
- Ikezawa, Z., Komori, J., Ikezawa, Y., Inoue, Y., Kirino, M., Katsuyama, M., and Aihara, M. (2010). A Role of *Staphylococcus aureus*, Interleukin-18, Nerve Growth Factor and Semaphorin 3A, an Axon Guidance Molecule, in Pathogenesis and Treatment of Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2, 235–246.
- Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G., and Schmelz, M. (2006). The neurobiology of itch. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 535–547.
- Inoue, A., Ikoma, K., Morioka, N., Kumagai, K., Hashimoto, T., Hide, I., and Nakata, Y. (1999). Interleukin-1 β induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J. Neurochem.* 73, 2206–2213.
- Inoue, K., Koizumi, S., Fuziwara, S., Denda, S., Inoue, K., and Denda, M. (2002). Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 124–129.
- Ionescu, M., and Lefeuvre, L. (2012). Facial redness: Diagnosis and adjuvant topical use of thermal water in a series of 232 cases. 70th Annu. Meet. Am.-Acad.--Dermatol.
- Ishida-Yamamoto, A., Deraison, C., Bonnart, C., Bitoun, E., Robinson, R., O'Brien, T.J., Wakamatsu, K., Ohtsubo, S., Takahashi, H., Hashimoto, Y., et al. (2005). LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J. Invest. Dermatol.* 124, 360–366.
- Ishikawa, C., Tsuda, T., Konishi, H., Nakagawa, N., and Yamanishi, K. (2009). Tetracyclines modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1760–1765.
- Jain, A., Brönneke, S., Kolbe, L., Stäb, F., Wenck, H., and Neufang, G. (2011). TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. *Pain* 152, 2765–2772.
- Jairaman, A., Yamashita, M., Schleimer, R.P., and Prakriya, M. (2015). Store-Operated Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels Regulate PAR2-Activated Ca²⁺ Signaling and Cytokine Production in Airway Epithelial Cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 195, 2122–2133.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., and Szolcsányi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 31, 138–151.
- Jans, R., Sartor, M., Jadot, M., and Poumay, Y. (2004). Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 30–41.

- Jeske, N.A., Patwardhan, A.M., Gamper, N., Price, T.J., Akopian, A.N., and Hargreaves, K.M. (2006). Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* *281*, 32879–32890.
- Jessell, T.M., Iversen, L.L., and Cuello, A.C. (1978). Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Res.* *152*, 183–188.
- Ji, R.-R., Samad, T.A., Jin, S.-X., Schmoll, R., and Woolf, C.J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* *36*, 57–68.
- Jia, X., Zhang, H., Cao, X., Yin, Y., and Zhang, B. (2014). Activation of TRPV1 mediates thymic stromal lymphopoietin release via the Ca²⁺/NFAT pathway in airway epithelial cells. *FEBS Lett.* *588*, 3047–3054.
- Jian, T., Yang, N., Yang, Y., Zhu, C., Yuan, X., Yu, G., Wang, C., Wang, Z., Shi, H., Tang, M., et al. (2016). TRPV1 and PLC Participate in Histamine H4 Receptor-Induced Itch. *Neural Plast.* *2016*, 1682972.
- Joly, F., Gardille, C., Barbieux, E., and Lefeuvre, L. (2012). Beneficial Effect of a Thermal Spring Water on the Skin Barrier Recovery after Injury: Evidence for Claudin-6 Expression in Human Skin. *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.* *02*, 273–276.
- Joly, F., Branka, J.-E., and Lefeuvre, L. (2014). Thermal Water from Uriage-les-Bains Exerts DNA Protection, Induction of Catalase Activity and Claudin-6 Expression on UV Irradiated Human Skin in Addition to Its Own Antioxidant Properties. *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.* *04*, 99–106.
- Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H.-H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* *427*, 260–265.
- Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.-Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., and Oh, U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.* *279*, 7048–7054.
- Kamo, A., Tominaga, M., Negi, O., Tengara, S., Ogawa, H., and Takamori, K. (2011). Topical application of emollients prevents dry skin-inducible intraepidermal nerve growth in acetone-treated mice. *J. Dermatol. Sci.* *62*, 64–66.
- Karashima, Y., Prenen, J., Meseguer, V., Owsianik, G., Voets, T., and Nilius, B. (2008). Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *457*, 77–89.
- Karila, C. (2013). [Atopic dermatitis and allergy]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* *20*, 906–909.
- Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pásztor, E.T., Erdei, N., Czikora, A., Papp, Z., Edes, I., Pórszász, R., and Tóth, A. (2008). Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol. Pharmacol.* *73*, 1405–1412.
- Kato, A., Fujii, E., Watanabe, T., Takashima, Y., Matsushita, H., Furuhashi, T., and Morita, A. (2014). Distribution of IL-31 and its receptor expressing cells in skin of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* *74*, 229–235.

- Kempkes, C., Buddenkotte, J., Cevikbas, F., Buhl, T., and Steinhoff, M. (2014). Role of PAR-2 in Neuroimmune Communication and Itch. In *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press),.
- Kerkelä, E., and Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp. Dermatol.* *12*, 109–125.
- Kezic, S., Kammeyer, A., Calkoen, F., Fluhr, J.W., and Bos, J.D. (2009). Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods. *Br. J. Dermatol.* *161*, 1098–1104.
- Kim, C.G., Kang, M., Lee, Y.-H., Min, W.G., Kim, Y.H., Kang, S.J., Song, C.H., Park, S.J., Park, J.H., Han, C.H., et al. (2015). Bathing Effects of Various Seawaters on Allergic (Atopic) Dermatitis-Like Skin Lesions Induced by 2,4-Dinitrochlorobenzene in Hairless Mice. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2015*, 179185.
- Kim, D., Cavanaugh, E.J., and Simkin, D. (2008). Inhibition of transient receptor potential A1 channel by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *295*, C92–C99.
- Koh, W.S., Yoon, S.Y., Kwon, B.M., Jeong, T.C., Nam, K.S., and Han, M.Y. (1998). Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T-cell differentiation. *Int. J. Immunopharmacol.* *20*, 643–660.
- Komatsu, N., Takata, M., Otsuki, N., Ohka, R., Amano, O., Takehara, K., and Saijoh, K. (2002). Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J. Invest. Dermatol.* *118*, 436–443.
- Kovacs, D., Falchi, M., Cardinali, G., Raffa, S., Carducci, M., Cota, C., Amantea, A., Torrisi, M.R., and Picardo, M. (2005). Immunohistochemical analysis of keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 expression in psoriasis. *Exp. Dermatol.* *14*, 130–137.
- Krieg, T., and Braun-Falco, O. (1989). [Fibrocytes and fibroblasts. Definition and significance in wound healing and fibrotic diseases of the skin]. *Z. Für Hautkrankh.* *64*, 775–776, 779–781.
- Kubanov, A.A., Katunina, O.R., and Chikin, V.V. (2015). Expression of Neuropeptides, Neurotrophins, and Neurotransmitters in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Bull. Exp. Biol. Med.* *159*, 318–322.
- Kulka, M., Sheen, C.H., Tancowny, B.P., Grammer, L.C., and Schleimer, R.P. (2008). Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* *123*, 398–410.
- Kürkçüoğlu, N., and Alaybeyi, F. (1991). Substance P immunoreactivity in rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* *25*, 725–726.
- Kwak, I.S., Choi, Y.H., Jang, Y.C., and Lee, Y.K. (2014). Immunohistochemical analysis of neuropeptides (protein gene product 9.5, substance P and calcitonin gene-related peptide) in hypertrophic burn scar with pain and itching. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* *40*, 1661–1667.
- Labarthe, M.P., Bosco, D., Saurat, J.H., Meda, P., and Salomon, D. (1998).

Upregulation of connexin 26 between keratinocytes of psoriatic lesions. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 72–76.

LaMotte, R.H., and Campbell, J.N. (1978). Comparison of responses of warm and nociceptive C-fiber afferents in monkey with human judgments of thermal pain. *J. Neurophysiol.* **41**, 509–528.

LaMotte, R.H., Dong, X., and Ringkamp, M. (2014). Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 19–31.

Lawson, S.N., Harper, A.A., Harper, E.I., Garson, J.A., and Anderton, B.H. (1984). A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *J. Comp. Neurol.* **228**, 263–272.

Lebonvallet, N., Jeanmaire, C., Danoux, L., Sibille, P., Pauly, G., and Misery, L. (2010). The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. *Eur. J. Dermatol. EJD* **20**, 671–684.

Lebonvallet, N., Boulais, N., Le Gall, C., Pereira, U., Gauché, D., Gobin, E., Pers, J.-O., Jeanmaire, C., Danoux, L., Pauly, G., et al. (2012). Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. *Exp. Dermatol.* **21**, 156–158.

Lebonvallet, N., Pennec, J.-P., Le Gall, C., Pereira, U., Boulais, N., Cheret, J., Jeanmaire, C., Danoux, L., Pauly, G., and Misery, L. (2013). Effect of human skin explants on the neurite growth of the PC12 cell line. *Exp. Dermatol.* **22**, 224–225.

Lee, V.M., and Page, C. (1984). The dynamics of nerve growth factor-induced neurofilament and vimentin filament expression and organization in PC12 cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **4**, 1705–1714.

Lee, S.E., Jeong, S.K., and Lee, S.H. (2010a). Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Yonsei Med. J.* **51**, 808–822.

Lee, S.E., Kim, J.-M., Jeong, S.K., Jeon, J.E., Yoon, H.-J., Jeong, M.-K., and Lee, S.H. (2010b). Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Arch. Dermatol. Res.* **302**, 745–756.

Lee, Y.B., Lee, J.Y., Lee, H.J., Yun, S.T., Lee, J.T., Kim, H.J., Yu, D.S., Woo, S.Y., and Kim, J.-W. (2014). Immunomodulatory effects of balneotherapy with hae-un-dae thermal water on imiquimod-induced psoriasis-like murine model. *Ann. Dermatol.* **26**, 221–230.

Lee, Y.M., Li, W.H., Kim, Y.K., Kim, K.H., and Chung, J.H. (2008). Heat-induced MMP-1 expression is mediated by TRPV1 through PKC α signaling in HaCaT cells. *Exp. Dermatol.* **17**, 864–870.

Lee, Y.M., Kim, Y.K., Kim, K.H., Park, S.J., Kim, S.J., and Chung, J.H. (2009). A novel role for the TRPV1 channel in UV-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression in HaCaT cells. *J. Cell. Physiol.* **219**, 766–775.

Lee, Y.M., Kang, S.M., Lee, S.R., Kong, K.H., Lee, J.Y., Kim, E.J., and Chung, J.H. (2011). Inhibitory effects of TRPV1 blocker on UV-induced responses in the hairless mice. *Arch. Dermatol. Res.* **303**, 727–736.

Li, A.G., Wang, D., Feng, X.-H., and Wang, X.-J. (2004). Latent TGF β 1

overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J.* 23, 1770–1781.

Li, Z., Ji, F., Peng, Z., and Wang, K. (2008). [Expression of E-cadherin, beta-catenin and cyclin D1 in epidermal skin lesions of patients with active psoriasis vulgaris]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 28, 545–547.

Liang, W.-J., Zhang, G., Luo, H.-S., Liang, L.-X., Huang, D., and Zhang, F.-C. (2016). Tryptase and Protease-Activated Receptor 2 Expression Levels in Irritable Bowel Syndrome. *Gut Liver* 10, 382–390.

Liao, B.-C., Hsieh, C.-W., Liu, Y.-C., Tzeng, T.-T., Sun, Y.-W., and Wung, B.-S. (2008). Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 161–171.

Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112.

Lin, Z., Chen, Q., Lee, M., Cao, X., Zhang, J., Ma, D., Chen, L., Hu, X., Wang, H., Wang, X., et al. (2012). Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 558–564.

Lindsay, R.M., Lockett, C., Sternberg, J., and Winter, J. (1989). Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: Modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience* 33, 53–65.

Liu, B., Escalera, J., Balakrishna, S., Fan, L., Caceres, A.I., Robinson, E., Sui, A., McKay, M.C., McAlexander, M.A., Herrick, C.A., et al. (2013). TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 3549–3563.

Liu, Q., Weng, H.-J., Patel, K.N., Tang, Z., Bai, H., Steinhoff, M., and Dong, X. (2011). The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. *Sci. Signal.* 4, ra45.

Liuzzo, J.P., Petanceska, S.S., Moscatelli, D., and Devi, L.A. (1999). Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol. Med. Camb. Mass* 5, 320–333.

Lowes, M.A., Suárez-Fariñas, M., and Krueger, J.G. (2014). Immunology of Psoriasis. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 227–255.

Luo, D., Zhang, Y.-W., Peng, W.-J., Peng, J., Chen, Q.-Q., Li, D., Deng, H.-W., and Li, Y.-J. (2008). Transient receptor potential vanilloid 1-mediated expression and secretion of endothelial cell-derived calcitonin gene-related peptide. *Regul. Pept.* 150, 66–72.

Ma, Q.-P. (2002). Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci. Lett.* 319, 87–90.

Macfarlane, S.R., Sloss, C.M., Cameron, P., Kanke, T., McKenzie, R.C., and Plevin, R. (2005). The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of proteinase-activated receptor-2 mediated nuclear factor kappa B signalling in keratinocytes. *Br. J. Pharmacol.* 145, 535–544.

Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F.,

- and Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445, 541–545.
- Maddison, B., Namazi, M.R., Samuel, L.S., Sanchez, J., Pichardo, R., Stocks, J., Maruziva, D., and Yosipovitch, G. (2008). Unexpected diminished innervation of epidermis and dermoepidermal junction in lichen amyloidosis. *Br. J. Dermatol.* 159, 403–406.
- Maddison, B., Parsons, A., Sanguenza, O., Sheehan, D.J., and Yosipovitch, G. (2011). Retrospective study of intraepidermal nerve fiber distribution in biopsies of patients with nummular eczema. *Am. J. Dermatopathol.* 33, 621–623.
- Mägert, H.J., Ständker, L., Kreutzmann, P., Zucht, H.D., Reinecke, M., Sommerhoff, C.P., Fritz, H., and Forssmann, W.G. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 274, 21499–21502.
- Malin, S., Molliver, D., Christianson, J.A., Schwartz, E.S., Cornuet, P., Albers, K.M., and Davis, B.M. (2011). TRPV1 and TRPA1 function and modulation are target tissue dependent. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10516–10528.
- Marshall, I.C.B., Owen, D.E., Cripps, T.V., Davis, J.B., McNulty, S., and Smart, D. (2003). Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. *Br. J. Pharmacol.* 138, 172–176.
- Martin, T.F., and Grishanin, R.N. (2003). PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol.* 71, 267–286.
- Martin, P.E., Easton, J.A., Hodgins, M.B., and Wright, C.S. (2014). Connexins: sensors of epidermal integrity that are therapeutic targets. *FEBS Lett.* 588, 1304–1314.
- Mascia, F., Mariani, V., Giannetti, A., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2002). House dust mite allergen exerts no direct proinflammatory effects on human keratinocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 532–538.
- Mascia, F., Mariani, V., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2003). Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am. J. Pathol.* 163, 303–312.
- McNeil, B., and Dong, X. (2014). Mrgprs as Itch Receptors. In *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press),.
- Meseguer, V., Alpizar, Y.A., Luis, E., Tajada, S., Denlinger, B., Fajardo, O., Manenschijn, J.-A., Fernández-Peña, C., Talavera, A., Kichko, T., et al. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat. Commun.* 5, 3125.
- Meyer, M., Müller, A.-K., Yang, J., Šulcová, J., and Werner, S. (2011). The role of chronic inflammation in cutaneous fibrosis: fibroblast growth factor receptor deficiency in keratinocytes as an example. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 15, 48–52.
- Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairoir-Poc, C., Follet-Gueye, M.-L., Lati, E., Yvergnaux, F., Driouich, A., Lefeuvre, L., et al. (2013). Effects of a skin neuropeptide (substance p) on cutaneous microflora. *PloS One* 8, e78773.
- Misery, L. (1996). Le système neuro-immuno-cutané (SNIC). *Pathol. Biol.* 44, 867–874.

- Misery, L. (1997). Skin, immunity and the nervous system. *Br. J. Dermatol.* *137*, 843–850.
- Misery, L. (2011). Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *41*, 259–266.
- Misery, L. (2014a). Le prurit: des avancées physiopathologiques considérables. *Médecine/sciences* *30*, 1123–1128.
- Misery, L. (2014b). [TSLP, the key of pruritus in atopic dermatitis]. *Médecine Sci. MS* *30*, 142–144.
- Misery, L. (2016). Pruritus, Pain and Other Abnormal Skin Sensations. In *Pruritus*, L. Misery, and S. Ständer, eds. (Springer International Publishing), pp. 69–72.
- Misery, L., and Ständer, S. (2010). *Pruritus* (London: Springer London).
- Misery, L., Brenaut, E., Le Garrec, R., Abasq, C., Genestet, S., Marcorelles, P., and Zagnoli, F. (2014). Neuropathic pruritus. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 408–416.
- Mizumura, K., Sugiura, T., Katanosaka, K., Banik, R.K., and Kozaki, Y. (2009). Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp. Brain Res.* *196*, 53–65.
- Mohapatra, D.P., and Nau, C. (2003). Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* *278*, 50080–50090.
- Mohapatra, D.P., and Nau, C. (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 13424–13432.
- Mollanazar, N.K., Smith, P.K., and Yosipovitch, G. (2015). Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out? *Clin. Rev. Allergy Immunol.*
- Moniaga, C.S., Jeong, S.K., Egawa, G., Nakajima, S., Hara-Chikuma, M., Jeon, J.E., Lee, S.H., Hibino, T., Miyachi, Y., and Kabashima, K. (2013). Protease activity enhances production of thymic stromal lymphopoietin and basophil accumulation in flaky tail mice. *Am. J. Pathol.* *182*, 841–851.
- Montaño, J.A., Pérez-Piñera, P., García-Suárez, O., Cobo, J., and Vega, J.A. (2010). Development and neuronal dependence of cutaneous sensory nerve formations: Lessons from neurotrophins. *Microsc. Res. Tech.* *73*, 513–529.
- Morioka, N., Takeda, K., Kumagai, K., Hanada, T., Ikoma, K., Hide, I., Inoue, A., and Nakata, Y. (2002). Interleukin-1 β -induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A2 enzymes: secretory type IIA and cytosolic type IV. *J. Neurochem.* *80*, 989–997.
- Moroguchi, A., Ishimura, K., Okano, K., Wakabayashi, H., Maeba, T., and Maeta, H. (2004). Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* *36*, 39–44.
- Munger, B.L., and Ide, C. (1988). The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch. Histol. Cytol.* *51*, 1–34.
- Muñoz, M., and Coveñas, R. (2014). Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids* *46*, 1727–1750.

- Nakahigashi, K., Kabashima, K., Ikoma, A., Verkman, A.S., Miyachi, Y., and Hara-Chikuma, M. (2011). Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 865–873.
- Nakanishi, M., Hata, K., Nagayama, T., Sakurai, T., Nishisho, T., Wakabayashi, H., Hiraga, T., Ebisu, S., and Yoneda, T. (2010). Acid Activation of Trpv1 Leads to an Up-Regulation of Calcitonin Gene-related Peptide Expression in Dorsal Root Ganglion Neurons via the CaMK-CREB Cascade: A Potential Mechanism of Inflammatory Pain. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2568–2577.
- Nakatani, M., Maksimovic, S., Baba, Y., and Lumpkin, E.A. (2015). Mechanotransduction in epidermal Merkel cells. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *467*, 101–108.
- Namazi, M.R. (2005). Possible molecular mechanisms to account for the involvement of tryptase in the pathogenesis of psoriasis. *Autoimmunity* *38*, 449–452.
- Nanney, L.B., Sundberg, J.P., and King, L.E. (1996). Increased epidermal growth factor receptor in *fsn/fsn* mice. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 1169–1174.
- Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* *79*, 319–326.
- Nguyen, C., Coelho, A.-M., Grady, E., Compton, S.J., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Cenac, N., Garcia-Villar, R., Bueno, L., Steinhoff, M., et al. (2003). Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *81*, 920–927.
- Nickoloff, B.J., and Naidu, Y. (1994). Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* *30*, 535–546.
- Ninkina, N.N., Stevens, G.E., Wood, J.N., and Richardson, W.D. (1993). A novel Brn3-like POU transcription factor expressed in subsets of rat sensory and spinal cord neurons. *Nucleic Acids Res.* *21*, 3175–3182.
- Niu, J., Vysochan, A., and Luo, W. (2014). Dual innervation of neonatal Merkel cells in mouse touch domes. *PloS One* *9*, e92027.
- Nobbe, S., Dziunycz, P., Mühleisen, B., Bilsborough, J., Dillon, S.R., French, L.E., and Hofbauer, G.F.L. (2012). IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* *92*, 24–28.
- Nolano, M., Provitera, V., Crisci, C., Stancanelli, A., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W.R., and Santoro, L. (2003). Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. *Ann. Neurol.* *54*, 197–205.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., and Tominaga, M. (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* *277*, 13375–13378.
- Oakley, R.A., Lefcort, F.B., Plouffe, P., Ritter, A., and Frank, E. (2000). Neurotrophin-3 promotes the survival of a limited subpopulation of cutaneous sensory neurons. *Dev. Biol.* *224*, 415–427.
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve

injury. *J. Clin. Invest.* **115**, 2393–2401.

Obreja, O., Rukwied, R., Steinhoff, M., and Schmelz, M. (2006). Neurogenic components of trypsin- and thrombin-induced inflammation in rat skin, in vivo. *Exp. Dermatol.* **15**, 58–65.

Oikonomopoulou, K., Hansen, K.K., Saifeddine, M., Vergnolle, N., Tea, I., Blaber, M., Blaber, S.I., Scarisbrick, I., Diamandis, E.P., and Hollenberg, M.D. (2006). Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biol. Chem.* **387**, 817–824.

Olsson, M., Broberg, A., Jernås, M., Carlsson, L., Rudemo, M., Suurküla, M., Svensson, P.-A., and Benson, M. (2006). Increased expression of aquaporin 3 in atopic eczema. *Allergy* **61**, 1132–1137.

Oprée, A., and Kress, M. (2000). Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 6289–6293.

Ormerod, A.D., Weller, R., Copeland, P., Benjamin, N., Ralston, S.H., Grabowski, P., and Herriot, R. (1998). Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **290**, 3–8.

Ostadhadi, S., Haj-Mirzaian, A., Azimi, E., Mansouri, P., and Dehpour, A.R. (2015). Involvement of nitric oxide in serotonin-induced scratching in mice. *Clin. Exp. Dermatol.* **40**, 647–652.

Parekh, A.B., and Putney, J.W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* **85**, 757–810.

Patil, M.J., Jeske, N.A., and Akopian, A.N. (2010). Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca^{2+} . *Neuroscience* **171**, 1109–1119.

Patricio, E.S., Costa, R., Figueiredo, C.P., Gers-Barlag, K., Bicca, M.A., Manjavachi, M.N., Segat, G.C., Gentry, C., Luiz, A.P., Fernandes, E.S., et al. (2015). Mechanisms Underlying the Scratching Behavior Induced by the Activation of Proteinase-Activated Receptor-4 in Mice. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2484–2491.

Patwardhan, A.M., Jeske, N.A., Price, T.J., Gamper, N., Akopian, A.N., and Hargreaves, K.M. (2006). The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11393–11398.

Paukov, V.S. (1986). [Role of neutrophils and macrophages in localizing purulent infection]. *Arkh. Patol.* **48**, 30–38.

Paulsen, C.E., Armache, J.-P., Gao, Y., Cheng, Y., and Julius, D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **520**, 511–517.

Paus, R., Heinzelmann, T., Robicsek, S., Czarnetzki, B.M., and Maurer, M. (1995). Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 500–502.

Payan, D.G., Brewster, D.R., and Goetzl, E.J. (1983). Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **131**, 1613–1615.

Percoco, G., Merle, C., Jaouen, T., Ramdani, Y., Bénard, M., Hillion, M., Mijouin, L.,

- Lati, E., Feuilloley, M., Lefeuvre, L., et al. (2013). Antimicrobial peptides and pro-inflammatory cytokines are differentially regulated across epidermal layers following bacterial stimuli. *Exp. Dermatol.* **22**, 800–806.
- Pereira, U., Boulais, N., Misery, L., and Lefeuvre, L. (2006). In vitro model for studies on cutaneous neurogenic inflammation. 36th Annu. Meet. Eur.-Soc.--Dermatol.-Res.
- Pereira, U., Boulais, N., Misery, L., and Lefeuvre, L. (2007). Efficacy of A product of dermatologic laboratories Uriage On an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation. 37th Annu. Meet. Eur.-Soc.--Dermatol.-Res.
- Pereira, U., Boulais, N., Lebonvallet, N., Lefeuvre, L., Gougerot, A., and Misery, L. (2010). Development of an in vitro coculture of primary sensitive pig neurons and keratinocytes for the study of cutaneous neurogenic inflammation. *Exp. Dermatol.* **19**, 931–935.
- Perianin, A., Snyderman, R., and Malfroy, B. (1989). Substance P primes human neutrophil activation: a mechanism for neurological regulation of inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 520–524.
- Perry, M.J., Lawson, S.N., and Robertson, J. (1991). Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits. *J. Neurocytol.* **20**, 746–758.
- Petrus, M., Peier, A.M., Bandell, M., Hwang, S.W., Huynh, T., Olney, N., Jegla, T., and Patapoutian, A. (2007). A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol. Pain* **3**, 40.
- Philippe, R., Antigny, F., Buscaglia, P., Norez, C., Becq, F., Frieden, M., and Mignen, O. (2015). SERCA and PMCA pumps contribute to the deregulation of Ca²⁺ + homeostasis in human CF epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 892–903.
- Portier, M., Brachet, P., Croizat, B., and Gros, F. (1983). Regulation of Peripherin in Mouse Neuroblastoma and Rat PC 12 Pheochromocytoma Cell Lines. *Dev. Neurosci.* **6**, 215–226.
- Potenzieri, C., and Udem, B.J. (2012). Basic mechanisms of itch. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **42**, 8–19.
- Prescott, E.D., and Julius, D. (2003). A modular PIP₂ binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* **300**, 1284–1288.
- Qian, X., Francis, M., Solodushko, V., Earley, S., and Taylor, M.S. (2013). Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries. *Microcirc. N. Y. N 1994* **20**, 138–148.
- Qu, Z., Wolfrum, L.A., Svaren, J., Ehrenguber, M.U., Davidson, N., and Milbrandt, J. (1998). The Transcriptional Corepressor NAB2 Inhibits NGF-induced Differentiation of PC12 Cells. *J. Cell Biol.* **142**, 1075.
- Raap, U., Goltz, C., Deneka, N., Bruder, M., Renz, H., Kapp, A., and Wedi, B. (2005). Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 1268–1275.
- Rajasekhar, P., Poole, D.P., Liedtke, W., Bunnett, N.W., and Veldhuis, N.A. (2015).

P2Y1 Receptor Activation of the TRPV4 Ion Channel Enhances Purinergic Signaling in Satellite Glial Cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 29051–29062.

Rawlings, A.V., and Harding, C.R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* **17 Suppl 1**, 43–48.

Reed, D.E., Barajas-Lopez, C., Cottrell, G., Velazquez-Rocha, S., Dery, O., Grady, E.F., Bunnett, N.W., and Vanner, S.J. (2003). Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J. Physiol.* **547**, 531–542.

Reznik, M. (1996). Structure and functions of the cutaneous nervous system. *Pathol. Biol. (Paris)* **44**, 831–837.

Richter, J., Andersson, R., Edvinsson, L., and Gullberg, U. (1992). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) activates human neutrophils--inhibition by chemotactic peptide antagonist BOC-MLP. *Immunology* **77**, 416–421.

Riol-Blanco, L., Ordovas-Montanes, J., Perro, M., Naval, E., Thiriot, A., Alvarez, D., Paust, S., Wood, J.N., and von Andrian, U.H. (2014). Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature* **510**, 157–161.

Rodero, M.P., and Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 643–653.

Romano, B., Borrelli, F., Fasolino, I., Capasso, R., Piscitelli, F., Cascio, M., Pertwee, R., Coppola, D., Vassallo, L., Orlando, P., et al. (2013). The cannabinoid TRPA1 agonist cannabichromene inhibits nitric oxide production in macrophages and ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 213–229.

Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., and Steinhoff, M. (2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol. Rev.* **86**, 1309–1379.

Russell, F.A., Veldhoen, V.E., Tchitchkan, D., and McDougall, J.J. (2010). Proteinase-activated receptor-4 (PAR4) activation leads to sensitization of rat joint primary afferents via a bradykinin B2 receptor-dependent mechanism. *J. Neurophysiol.* **103**, 155–163.

Ryser, S., Schuppli, M., Gauthier, B., Hernandez, D.R., Roye, O., Hohl, D., German, B., Holzwarth, J.A., and Moodycliffe, A.M. (2014). UVB-induced skin inflammation and cutaneous tissue injury is dependent on the MHC class I-like protein, CD1d. *Invest. Dermatol.* **134**, 192–202.

Sääf, A., Pivarcsi, A., Winge, M.C.G., Wahlgren, C.-F., Homey, B., Nordenskjöld, M., Tengvall-Linder, M., and Bradley, M. (2012). Characterization of EGFR and ErbB2 expression in atopic dermatitis patients. *Arch. Dermatol. Res.* **304**, 773–780.

Saeki, H., Nakahara, T., Tanaka, A., Kabashima, K., Sugaya, M., Murota, H., Ebihara, T., Kataoka, Y., Aihara, M., Etoh, T., et al. (2016). Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2016. *J. Dermatol.*

Salas, M.M., Hargreaves, K.M., and Akopian, A.N. (2009). TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 1568–1578.

Salem, S.A.M., Abdel Fattah, N.S.A., Tantawy, S.M.A., El-Badawy, N.M.A., and Abd El-Aziz, Y.A. (2013). Neodymium-yttrium aluminum garnet laser versus pulsed dye

laser in erythematotelangiectatic rosacea: comparison of clinical efficacy and effect on cutaneous substance (P) expression. *J. Cosmet. Dermatol.* **12**, 187–194.

Samad, T.A., Moore, K.A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J.V., and Woolf, C.J. (2001). Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**, 471–475.

Santulli, R.J., Derian, C.K., Darrow, A.L., Tomko, K.A., Eckardt, A.J., Seiberg, M., Scarborough, R.M., and Andrade-Gordon, P. (1995). Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9151–9155.

Säterö, P., Klingenstierna, U., Karlsson, T., and Olausson, B. (2000). Pain threshold measurements with cutaneous argon laser, comparing a forced choice and a method of limits. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **24**, 397–407.

Saunders, C.I., Fassett, R.G., and Geraghty, D.P. (2009). Up-regulation of TRPV1 in mononuclear cells of end-stage kidney disease patients increases susceptibility to N-arachidonoyl-dopamine (NADA)-induced cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1019–1026.

Schechter, N.M., Brass, L.F., Lavker, R.M., and Jensen, P.J. (1998). Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **176**, 365–373.

Schlager, J.G., Rosumeck, S., Werner, R.N., Jacobs, A., Schmitt, J., Schlager, C., and Nast, A. (2016). Topical treatments for scalp psoriasis. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane Collaboration, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd),.

Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H.O., and Torebjörk, H.E. (1997). Specific C-receptors for itch in human skin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 8003–8008.

Schmelz, M., Schmidt, R., Weidner, C., Hilliges, M., Torebjörk, H.E., and Handwerker, H.O. (2003). Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J. Neurophysiol.* **89**, 2441–2448.

Schön, M., Behmenburg, C., Denzer, D., and Schön, M.P. (2001). Pathogenic function of IL-1 β in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice. *Clin. Exp. Immunol.* **123**, 505–510.

Schuhknecht, B., Marziniak, M., Wissel, A., Phan, N.Q., Pappai, D., Dangelmaier, J., Metze, D., and Ständer, S. (2011). Reduced intraepidermal nerve fibre density in lesional and nonlesional prurigo nodularis skin as a potential sign of subclinical cutaneous neuropathy. *Br. J. Dermatol.* **165**, 85–91.

Scott, C.A., Tattersall, D., O'Toole, E.A., and Kelsell, D.P. (2012). Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 1952–1961.

Seguchi, T., Cui, C.Y., Kusuda, S., Takahashi, M., Aisu, K., and Tezuka, T. (1996). Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 442–446.

Senning, E.N., Collins, M.D., Stratiievska, A., Ufret-Vincenty, C.A., and Gordon, S.E. (2014). Regulation of TRPV1 ion channel by phosphoinositide (4,5)-bisphosphate:

the role of membrane asymmetry. *J. Biol. Chem.* 289, 10999–11006.

Sereflican, B., Goksugur, N., Bugdayci, G., Polat, M., and Haydar Parlak, A. (2016). Serum Visfatin, Adiponectin, and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Levels in Patients with Psoriasis and their Correlation with Disease Severity. *Acta Dermatovenerol. Croat. ADC* 24, 13–19.

Serini, G., and Gabbiani, G. (1999). Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* 250, 273–283.

Shafer, T.J., and Atchison, W.D. (1991). Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology* 12, 473–492.

Shim, W.-S., Tak, M.-H., Lee, M.-H., Kim, M., Kim, M., Koo, J.-Y., Lee, C.-H., Kim, M., and Oh, U. (2007). TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2331–2337.

Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., and Calvin, D. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693–699.

Silva, C.R., Oliveira, S.M., Rossato, M.F., Dalmolin, G.D., Guerra, G.P., da Silveira Prudente, A., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., André, E., and Ferreira, J. (2011). The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. *Life Sci.* 88, 1077–1087.

Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738–746.

Singh, R.K., Lee, K.M., Jose, M.V., Nakamura, M., Ucmak, D., Farahnik, B., Abrouk, M., Zhu, T.H., Bhutani, T., and Liao, W. (2016). The Patient's Guide to Psoriasis Treatment. Part 1: UVB Phototherapy. *Dermatol. Ther.* 6, 307–313.

Siniewicz-Luzeńczyk, K., Stańczyk-Przyłuska, A., and Zeman, K. (2013). Correlation between serum interleukin-31 level and the severity of disease in children with atopic dermatitis. *Postępy Dermatol. Alergol.* 30, 282–285.

Smolyannikova, V.A., Kubanova, A.A., Karamova, A.E., Nefedova, M.A., and Chikin, V.V. (2015). [Role of the skin expression of neuropeptides, neurotrophins and their receptors in the pathogenesis of dermatoses]. *Arkh. Patol.* 77, 33–39.

Solinski, H.J., Zierler, S., Gudermann, T., and Breit, A. (2012). Human sensory neuron-specific Mas-related G protein-coupled receptors-X1 sensitize and directly activate transient receptor potential cation channel V1 via distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 287, 40956–40971.

Someya, A., Kunieda, K., Akiyama, N., Hirabayashi, T., Horie, S., and Murayama, T. (2004). Expression of vanilloid VR1 receptor in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 45, 1005–1010.

Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A.I., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M.-C., Meller, S., Rieker, J., et al. (2006). IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 411–417.

Southall, M.D., Li, T., Gharibova, L.S., Pei, Y., Nicol, G.D., and Travers, J.B. (2003).

Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 217–222.

Spahn, V., Stein, C., and Zöllner, C. (2014). Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. *Mol. Pharmacol.* **85**, 335–344.

Sparber, F., Tripp, C.H., Hermann, M., Romani, N., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: Possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology* **215**, 770–779.

Ständer, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpacovitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B.M., Luger, T.A., et al. (2004). Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.* **13**, 129–139.

Staruschenko, A., Jeske, N.A., and Akopian, A.N. (2010). Contribution of TRPV1-TRPA1 Interaction to the Single Channel Properties of the TRPA1 Channel. *J. Biol. Chem.* **285**, 15167–15177.

Stefansson, K., Brattsand, M., Roosterman, D., Kempkes, C., Bocheva, G., Steinhoff, M., and Egelrud, T. (2008). Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 18–25.

Stein Gold, L.F. (2016). Topical Therapies for Psoriasis: Improving Management Strategies and Patient Adherence. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **35**, S36–S44; quiz S45.

Steinhoff, M., Corvera, C.U., Thoma, M.S., Kong, W., McAlpine, B.E., Caughey, G.H., Ansel, J.C., and Bunnett, N.W. (1999). Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp. Dermatol.* **8**, 282–294.

Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., et al. (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat. Med.* **6**, 151–158.

Steinhoff, M., Ständer, S., Seeliger, S., Ansel, J.C., Schmelz, M., and Luger, T. (2003a). Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch. Dermatol.* **139**, 1479–1488.

Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., Skov, P.S., Luger, T.A., and Schmelz, M. (2003b). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 6176–6180.

Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T.A., and Hollenberg, M.D. (2005). Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.* **26**, 1–43.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). HOW MATRIX METALLOPROTEINASES REGULATE CELL BEHAVIOR. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold

temperatures. *Cell* 112, 819–829.

Su, X., Camerer, E., Hamilton, J.R., Coughlin, S.R., and Matthey, M.A. (2005). Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 2598–2605.

Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., and Mizumura, K. (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 88, 544–548.

Sulcova, J., Maddaluno, L., Meyer, M., and Werner, S. (2015). Accumulation and activation of epidermal $\gamma\delta$ T cells in a mouse model of chronic dermatitis is not required for the inflammatory phenotype. *Eur. J. Immunol.* 45, 2517–2528.

Sung, C.P., Arleth, A.J., Aiyar, N., Bhatnagar, P.K., Lysko, P.G., and Feuerstein, G. (1992). CGRP stimulates the adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells. *Peptides* 13, 429–434.

Szallasi, A., and Blumberg, P.M. (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30, 515–520.

Takei-Taniguchi, R., Imai, Y., Ishikawa, C., Sakaguchi, Y., Nakagawa, N., Tsuda, T., Hollenberg, M.D., and Yamanishi, K. (2012). Interleukin-17- and protease-activated receptor 2-mediated production of CXCL1 and CXCL8 modulated by cyclosporine A, vitamin D3 and glucocorticoids in human keratinocytes. *J. Dermatol.* 39, 625–631.

Talagas, M., and Misery, L. (2015). Innervation cutanée. In *Kinésithérapie-Médecine physique-Réadaptation*, (Elsevier), pp. 1–6.

Tanaka, R.J., Ono, M., and Harrington, H.A. (2011). Skin Barrier Homeostasis in Atopic Dermatitis: Feedback Regulation of Kallikrein Activity. *PLoS ONE* 6.

Tang, X.-Q., Tanelian, D.L., and Smith, G.M. (2004). Semaphorin3A inhibits nerve growth factor-induced sprouting of nociceptive afferents in adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 819–827.

Taylor-Clark, T.E., Undem, B.J., Macglashan, D.W., Ghatta, S., Carr, M.J., and McAlexander, M.A. (2008). Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol. Pharmacol.* 73, 274–281.

Taylor-Clark, T.E., Ghatta, S., Bettner, W., and Undem, B.J. (2009). Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. *Mol. Pharmacol.* 75, 820–829.

Teresiak-Mikołajczak, E., Czarnecka-Operacz, M., Jenerowicz, D., and Silny, W. (2013). Neurogenic markers of the inflammatory process in atopic dermatitis: relation to the severity and pruritus. *Postępy Dermatol. Alergol.* 30, 286–292.

Tey, H.L., Maddison, B., Wang, H., Ishiju, Y., McMichael, A., Marks, M., Willford, P., Maruzivab, D., Ferdinando, D., Dick, J., et al. (2012). Cutaneous innervation and itch in keloids. *Acta Derm. Venereol.* 92, 529–531.

Theoharides, T.C., Alysandratos, K.-D., Angelidou, A., Delivanis, D.-A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., et al. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 21–33.

- Thorne, P.S., Hawk, C., Kaliszewski, S.D., and Guiney, P.D. (1991). The noninvasive mouse ear swelling assay. II. Testing the contact sensitizing potency of fragrances. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* *17*, 807–820.
- Tominaga, M., and Takamori, K. (2014). Sensitization of Itch Signaling: Itch Sensitization—Nerve Growth Factor, Semaphorins. In *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press),.
- Tominaga, M., Wada, M., and Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6951–6956.
- Tominaga, M., Ogawa, H., and Takamori, K. (2008). Decreased production of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* *158*, 842–844.
- Toriseva, M., and Kähäri, V.-M. (2009). Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 203–224.
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andrè, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., et al. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13519–13524.
- Trowern, A.R., Laight, R., MacLean, N., and Mann, D.A. (1996). Detection of neuron-specific protein gene product (PGP) 9.5 in the rat and zebrafish using anti-human PGP9.5 antibodies. *Neurosci. Lett.* *210*, 21–24.
- Tsujii, K., Andoh, T., Lee, J.-B., and Kuraishi, Y. (2008). Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J. Pharmacol. Sci.* *108*, 385–388.
- Ufret-Vincenty, C.A., Klein, R.M., Collins, M.D., Rosasco, M.G., Martinez, G.Q., and Gordon, S.E. (2015). Mechanism for phosphoinositide selectivity and activation of TRPV1 ion channels. *J. Gen. Physiol.* *145*, 431–442.
- Valderrama, X., and Misra, V. (2008). Novel Brn3a cis-acting sequences mediate transcription of human trkA in neurons. *J. Neurochem.* *105*, 425–435.
- Vandenberghe, M., Raphaël, M., Lehen'kyi, V., Gordienko, D., Hastie, R., Oddos, T., Rao, A., Hogan, P.G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2013). ORA1 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E4839–E4848.
- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., and McNaughton, P.A. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* *534*, 813–825.
- Vellani, V., Kinsey, A.M., Prandini, M., Hechtfisher, S.C., Reeh, P., Magherini, P.C., Giacomoni, C., and McNaughton, P.A. (2010). Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Mol. Pain* *6*, 61.
- Viemann, D., Goebeler, M., Schmid, S., Klimmek, K., Sorg, C., Ludwig, S., and Roth, J. (2004). Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells. *Blood* *103*, 3365–3373.

- Vincent, L., Vang, D., Nguyen, J., Gupta, M., Luk, K., Ericson, M.E., Simone, D.A., and Gupta, K. (2013). Mast cell activation contributes to sickle cell pathobiology and pain in mice. *Blood* 122, 1853–1862.
- Wakita, H., Furukawa, F., and Takigawa, M. (1997). Thrombin and trypsin induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 109, 190–207.
- Wallengren, J. (1997). Vasoactive Peptides in the Skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2, 49–55.
- Wallengren, J. (2005). Neuroanatomy and neurophysiology of itch. *Dermatol. Ther.* 18, 292–303.
- Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2008a). Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain J. Neurol.* 131, 1241–1251.
- Wang, Y.Y., Chang, R.B., Waters, H.N., McKemy, D.D., and Liman, E.R. (2008b). The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J. Biol. Chem.* 283, 32691–32703.
- Watt, F.M. (1983). Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 81, 100s – 3s.
- Weber, H.C. (2015). Gastrointestinal peptides and itch sensation. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 22, 29–33.
- Wei, H., Koivisto, A., and Pertovaara, A. (2010). Spinal TRPA1 ion channels contribute to cutaneous neurogenic inflammation in the rat. *Neurosci. Lett.* 479, 253–256.
- Wei, T., Guo, T.-Z., Li, W.-W., Hou, S., Kingery, W.S., and Clark, J.D. (2012). Keratinocyte expression of inflammatory mediators plays a crucial role in substance P-induced acute and chronic pain. *J. Neuroinflammation* 9, 181.
- Westerink, R.H.S., and Ewing, A.G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 192, 273–285.
- Wilgus, T.A., and Wulff, B.C. (2014). The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. *Adv. Wound Care* 3, 356–365.
- Wilgus, T.A., Roy, S., and McDaniel, J.C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv. Wound Care* 2, 379–388.
- Williams, H.C. (2005). Atopic Dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 352, 2314–2324.
- Wilson, S.R., and Bautista, D.M. (2014). Role of Transient Receptor Potential Channels in Acute and Chronic Itch. In *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press),.
- Wilson, S.R., Gerhold, K.A., Bifulco-Fisher, A., Liu, Q., Patel, K.N., Dong, X., and Bautista, D.M. (2011). TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat. Neurosci.* 14, 595–602.
- Wilson, S.R., Thé, L., Batia, L.M., Beattie, K., Katibah, G.E., McClain, S.P., Pellegrino, M., Estandian, D.M., and Bautista, D.M. (2013a). The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell* 155,

285–295.

Wilson, S.R., Nelson, A.M., Batia, L., Morita, T., Estandian, D., Owens, D.M., Lumpkin, E.A., and Bautista, D.M. (2013b). The ion channel TRPA1 is required for chronic itch. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 9283–9294.

Wisnoskey, B.J., Sinkins, W.G., and Schilling, W.P. (2003). Activation of vanilloid receptor type I in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem. J.* **372**, 517–528.

Woo, D.H., Jung, S.J., Zhu, M.H., Park, C.-K., Kim, Y.H., Oh, S.B., and Lee, C.J. (2008). Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol. Pain* **4**, 42.

Wullaert, A., Bonnet, M.C., and Pasparakis, M. (2011). NF-κB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res.* **21**, 146–158.

Xie, Z. (2009). [Role of thermo TRP channels in cutaneous neurogenic inflammation and itch]. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J. Zhejiang Univ. Med. Sci.* **38**, 409–414.

Xie, J., Qi, S., Pan, S., Xu, Y., Li, T., Liu, X., and Liu, P. (2008). Expression of Smad protein by normal skin fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts in response to transforming growth factor beta1. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* **34**, 1216–1224; discussion 1224–1225.

Yang, D., Luo, Z., Ma, S., Wong, W.T., Ma, L., Zhong, J., He, H., Zhao, Z., Cao, T., Yan, Z., et al. (2010a). Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metab.* **12**, 130–141.

Yang, J., Meyer, M., Müller, A.-K., Böhm, F., Grose, R., Dauwalder, T., Verrey, F., Kopf, M., Partanen, J., Bloch, W., et al. (2010b). Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *J. Cell Biol.* **188**, 935–952.

Yang, L., Qiu, C.X., Ludlow, A., Ferguson, M.W.J., and Brunner, G. (1999). Active Transforming Growth Factor-β in Wound Repair. *Am. J. Pathol.* **154**, 105–111.

Yao, N., Xia, J.-X., Liu, X.-M., Wang, N., Mmi, X.-G., Wang, Y.-F., Guan, L.-L., Yang, J., Dong, Y.-Y., Wang, F.-W., et al. (2014). Topical application of a new monoclonal antibody against fibroblast growth factor 10 (FGF 10) mitigates propranolol-induced psoriasis-like lesions in guinea pigs. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **18**, 1085–1091.

Ye, F., Deng, P.-Y., Li, D., Luo, D., Li, N.-S., Deng, S., Deng, H.-W., and Li, Y.-J. (2007). Involvement of endothelial cell-derived CGRP in heat stress-induced protection of endothelial function. *Vascul. Pharmacol.* **46**, 238–246.

Yun, J.-W., Seo, J.A., Jang, W.-H., Koh, H.J., Bae, I.-H., Park, Y.-H., and Lim, K.-M. (2011). Antipruritic Effects of TRPV1 Antagonist in Murine Atopic Dermatitis and Itching Models. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1576–1579.

Yusuf, N., Nasti, T.H., Huang, C.-M., Huber, B.S., Jaleel, T., Lin, H.-Y., Xu, H., and Elmets, C.A. (2009). Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity. *J. Immunol. Baltim. Md* **182**, 675–683.

Zhang, K., and Kramer, R.H. (1996). Laminin 5 deposition promotes keratinocyte

motility. *Exp. Cell Res.* 227, 309–322.

Zhang, N., Inan, S., Cowan, A., Sun, R., Wang, J.M., Rogers, T.J., Caterina, M., and Oppenheim, J.J. (2005). A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4536–4541.

Zhang, X., Li, L., and McNaughton, P.A. (2008). Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* 59, 450–461.

Zhang, X.-C., Kainz, V., Burstein, R., and Levy, D. (2011). Tumor necrosis factor- α induces sensitization of meningeal nociceptors mediated via local COX and p38 MAP kinase actions. *Pain* 152, 140–149.

Zhao, R., and Tsang, S.Y. (2016). Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel. *J. Cell. Physiol.* n/a – n/a.

Zhao, P., Lieu, T., Barlow, N., Metcalf, M., Veldhuis, N., Jensen, D., Kocan, M., Sostegni, S., Haerteis, S., Baraznenok, V., et al. (2014a). Cathepsin S causes inflammatory pain via biased agonism of PAR2 and TRPV4. *J. Biol. Chem.*

Zhao, P., Metcalf, M., and Bunnett, N.W. (2014b). Biased Signaling of Protease-Activated Receptors. *Front. Endocrinol.* 5, 67.

Zhao, Y., Bao, L., Chan, L.S., DiPietro, L.A., and Chen, L. (2016). Aberrant Wound Healing in an Epidermal Interleukin-4 Transgenic Mouse Model of Atopic Dermatitis. *PLoS ONE* 11.

Ziegler, S.F., Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., and Han, H. (2013). The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 66, 129–155.

Zimmerman, B.J., Anderson, D.C., and Granger, D.N. (1992). Neuropeptides promote neutrophil adherence to endothelial cell monolayers. *Am. J. Physiol.* 263, G678–G682.

Zorzou, M.-P., Stratigos, A., Efstathiou, E., and Bamias, A. (2004). Exacerbation of psoriasis after treatment with an EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Acta Derm. Venereol.* 84, 308–309.

Zupanc, G.K. (1996). Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron Oxf. Engl.* 1993 27, 35–91.

Zurborg, S., Yurgionas, B., Jira, J.A., Caspani, O., and Heppenstall, P.A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat. Neurosci.* 10, 277–279.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.

(2011). *TRP Channels* (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis).

ANNEXES

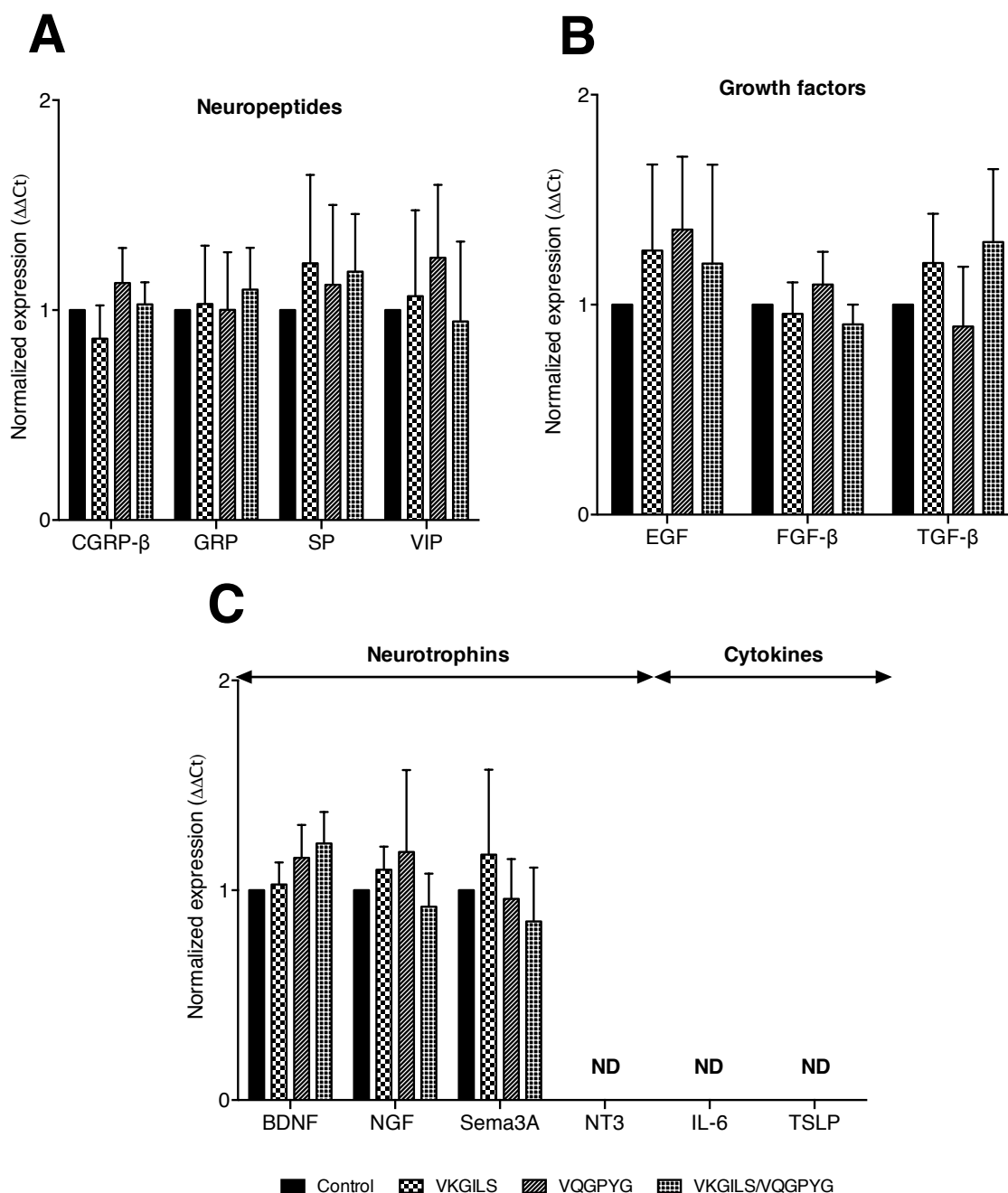


Figure 22. Contrôle de l'effet des séquences inverses des peptides agonistes de PAR-2 et PAR-4 sur les neurones sensoriels de rat *in vitro*.

Graphiques représentant l'expression relative des gènes **A.** des neuropeptides, **B.** des facteurs de croissance, **C.** des neurotrophines et cytokines selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$ suite à l'incubation à 100 μM de VKGILS et VQGPYG les séquences inverses des peptides agonistes des PAR-2 et -4, combinés ou seuls, dans des cultures primaires de neurones sensoriels issus de GRD de rat. Les gènes d'intérêt étaient les suivants : BDNF, CGRP- α , EGF, FGF, NGF et Sema3A, $n = 3$; GRP, VIP et SP, $n = 3$; IL-6, NT3, TGF- β , et TSLP, $n = 2$. Les graphiques représentent les valeurs moyennes $\pm$ SEM de n expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test de Mann-Whitney : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ND = non détecté.

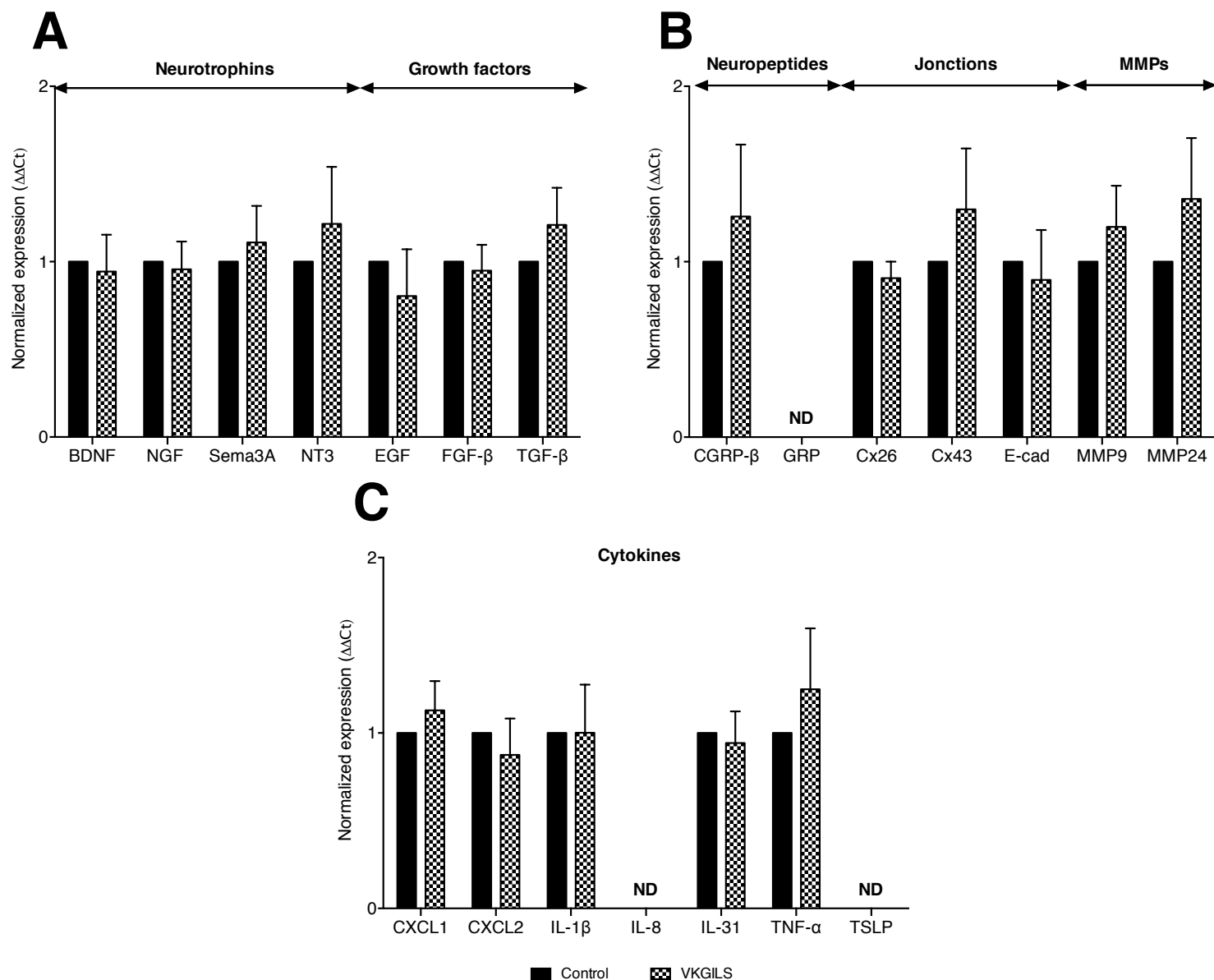


Figure 23. Contrôle de l'effet de la séquence inverse du peptide agoniste de PAR-2 sur les DhPK *in vitro*.

Graphiques représentant l'expression relative des gènes **A.** des neurotrophines, des facteurs de croissance, **B.** des neuropeptides, des jonctions, des MMPs et **C.** des cytokines selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$ suite à l'incubation de 100 μM de VKGILS la séquence inverse du peptide agoniste de PAR-2 sur les DhPK. Les gènes d'intérêts étaient les suivants : BDNF, EGF, FGF, TGF- β , CGRP- β , GRP, IL-8, IL-31, NGF, NT3 et Sema3A, $n = 3$; CXCL1, CXCL2, IL-1 β , TNF- α , TSLP, MMP9 et MMP24, $n = 6$; Cx26, Cx43 et E-cad, $n = 9$. Les graphiques représentent les valeurs moyennes $\pm$ SEM de n expériences indépendantes. La significativité a été analysée par le test de Mann-Whitney : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ND = non détecté.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Présentation Orale (2016) – 34^e Congrès Annuel De Recherche Dermatologique, Paris France.

Résumé publié dans le journal Annales de Dermatologie et Vénérologie. 143 (12) S424–S425 : CO10

Congrès Annuel de Recherche Dermatologique 2016
PARIS 6 et 7 décembre 2016



Société de Recherche Dermatologique

JDP2016/CARD-2916

Rôle inflammatoire et voie de signalisation intracellulaire de PAR-2 dans les kératinocytes différenciés

Olivier Gouin^{1,2}, Olivier Mignen³, Killian L'Herondelle¹, Raphaelle Le Garrec¹, Christelle Le Gall-Ianotto¹, Mehdi Sakka¹, Raphael Leschiera¹, Matthieu Talagas¹, Virginie Buhé¹, Emanuelle Plée-Gautier¹, Jean-Luc Carré¹, Luc Lefeuvre⁴, Nicolas Lebonvallet¹, Laurent Misery¹

¹EA4685, Laboratoire de Neurosciences de Brest, Brest, ²Laboratoires de Dermatologies d'Uriages, Courbevoie, ³INSERM U1078, Canalopathies et Signalisation Calcique, Brest, ⁴Laboratoires Dermatologiques d'Uriage, Courbevoie, France

Publication du résumé accepté: Si mon résumé est accepté, j'accepte qu'il soit publié dans le livre des résumés et sur le site Inte

Introduction: L'activation de PAR-2 dans les kératinocytes basaux renforce l'inflammation cutanée et le prurit par des mécanismes dépendants du calcium et la production de cytokines inflammatoires telles que la TSLP et le TNF- α . Cependant, dans la plupart des études, seuls les kératinocytes primaires issus de la couche basale de l'épiderme sont utilisés pour analyser le rôle de PAR-2 dans l'inflammation cutanée et le prurit. Nous avons étudié sur des cultures primaires de kératinocytes différenciés l'implication de PAR-2 sur la régulation des voies calciques et par conséquent la modulation de gènes impliqués dans l'inflammation.

Résultats: Les enregistrements des variations calciques intracellulaires sans Ca²⁺ extracellulaire ont montré que le SLIGKV, l'agoniste peptide de PAR-2, induisait la libération des réserves calciques. Cette libération était totalement inhibée par l'antagoniste de la PLC (U73122), de l'InsP₃R (xestospongine C) et du canal calcique TRPV1 (AMG9810). Après transfection d'un vecteur rapporteur luciférase comprenant le promoteur du NF- κ B, nous avons montré que le SLIGKV augmentait l'activité transcriptionnelle du NF- κ B. Cette élévation d'activité était inhibée par les antagonistes de TRPV1, de InsP₃R et de la PLC. Par la suite, nous avons démontré par RT-qPCR et ELISA que le SLIGKV augmentait l'expression et la sécrétion de la TSLP et du TNF- α . Par ailleurs, le blocage de TRPV1, de l'IP3R et de la PLC inhibait autant l'expression que la sécrétion de nos deux molécules cibles modulées à la hausse par PAR-2.

Conclusion: Nos travaux ont démontré pour la première fois que l'activation de PAR-2 dans les kératinocytes différenciés pouvait favoriser l'inflammation de la peau et le prurit par l'expression et la sécrétion de TSLP et de TNF- α par des mécanismes dépendants de la PLC, du NF- κ B et de la libération des réserves calciques à la fois *via* les canaux InsP₃R et TRPV1

Conflits d'intérêts: Aucun conflit à déclarer

Mots-clés: Inflammation cutanée, kératinocytes différenciés, PAR-2

Présentation Orale Poster-Walk (2016) – 46th Annual European Society of dermatology Research Meeting, Munich, Germany.

Résumé publié dans *journal of investigative dermatology*. 136 (9) S175 :084.

CONTROL ID: 2535788

TITLE: TRPV1 regulates PAR-2-evoked intracellular Ca^{2+} release and inflammatory mediators production in differentiated keratinocytes

AUTHORS (FIRST NAME, LAST NAME): Olivier GOUIN¹, Olivier Mignen³, Killian L'herondelle¹, Raphaelae Le Garrec¹, Christelle Le Gall-Ianotto¹, Virginie Buhé¹, Luc Lefeuvre², Laurent Misery¹, Nicolas Lebonvallet¹

INSTITUTIONS (ALL):

1. Laboratory of Neurosciences of Brest, University of Western Brittany, Brest, France.
2. Uriage Dermatological Laboratories, Courbevoie, France.
3. Canalopathies et Signalisation Calcique, U1078, Brest, France.

CURRENT TOPICS: Epidermal Structure and Function

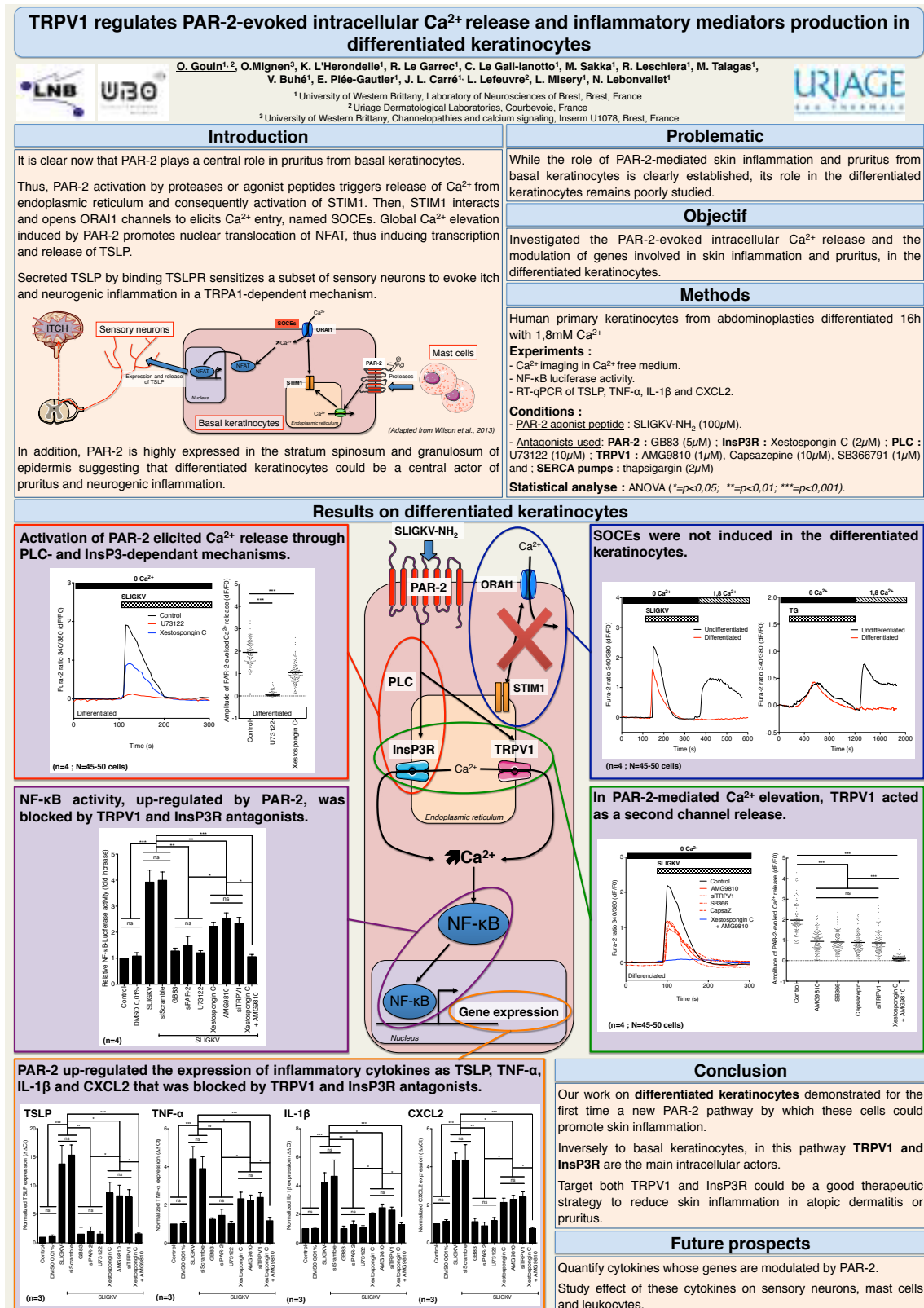
PRESENTATION TYPE: Oral or Poster

ABSTRACT BODY:

Abstract Body: The activation of PAR-2 in keratinocytes enhances inflammation through a Ca^{2+} -dependent cytokines expression and release such as TSLP. However, studies only used primary keratinocytes from the basal stratum of the epidermis to analyse the role of PAR-2 in inflammatory process and itch. We investigated the involvement of PAR-2 in the intracellular calcium signalling pathways in differentiated keratinocytes and consequently inflammatory genes modulation. Calcium imaging recordings in Ca^{2+} -free medium showed that PAR-2 agonist peptide (SLIGKV) evoked calcium release from endoplasmic stores, which was totally inhibited by the specific PLC antagonist (U73122). The InsP3R (Xestospongin C) and TRPV1 (AMG9810) antagonist partially impaired PAR-2-evoked Ca^{2+} release alone but totally together. Using RT-qPCR to assay the inflammatory cytokines RNA expression, we demonstrated that SLIGKV induced a 13-folds up-regulation of the TSLP expression and by 2-folds expression of IL1- β , TNF- α and CXCL2. PAR-2-mediated cytokines up-regulation in the keratinocytes was abolished with PAR-2 antagonist (GB83). In addition, blockage of TRPV1 with specific antagonists (AMG9810, SB366791 and Capsazepin) or with siRNA knockdown of TRPV1 impaired PAR-2-mediated gene expression. Our finding demonstrated for the first time that PAR-2 promotes skin inflammation in the differentiated keratinocytes through PLC-dependent Ca^{2+} release by both IP3 and TRPV1 channels release and consequently inflammatory genes expression.

Présentation Orale Poster-Walk (2016) – 46th Annual European Society of dermatology Research Meeting, Munich, Germany.

Résumé publié dans *journal of investigative dermatology*. 136 (9) S175 :084.



Présentation Orale et Poster (2016) – SFR SCINBIOS/IBSAM, Brest, France.

Rôle pivot de TRPV1 dans la libération de Ca^{2+} intracellulaire et la production de médiateurs inflammatoires induites par PAR-2 dans les kératinocytes différenciés

O. Gouin^{1,2}, O. Mignen³, K. L'Herondelle¹, R. Le Garrec¹, C. Le Gall-Ianotto¹, M. Sakka¹, R. Leschiera¹, M. Talagas¹, V. Buhé¹, E. Plée-Gautier¹, J. L. Carré¹, L. Lefeuvre², L. Misery¹, N. Lebonvallet¹

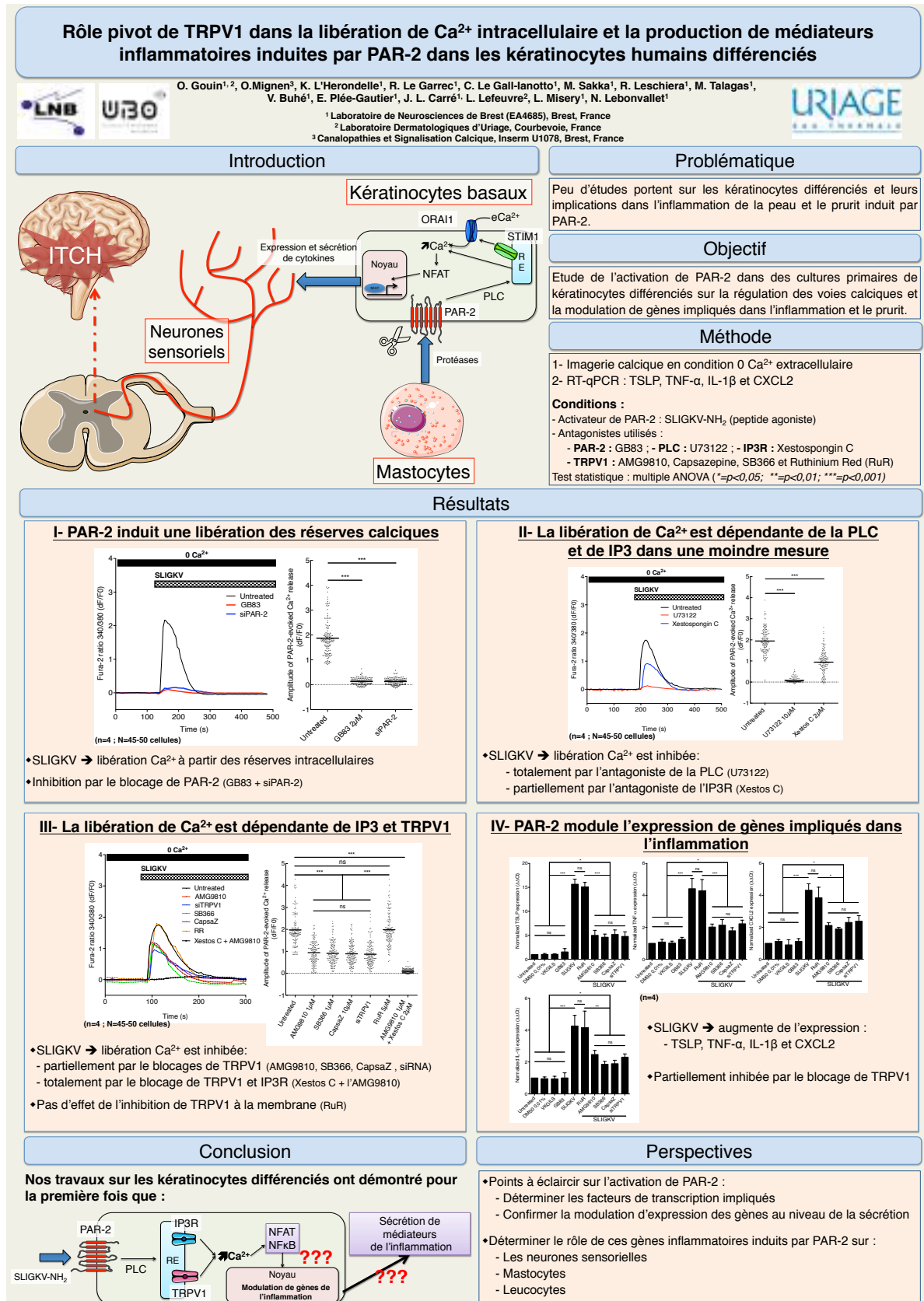
¹ Laboratoire de Neurosciences de Brest (EA4685), Brest, France

² Laboratoire Dermatologiques d'Uriage, Courbevoie, France

³ Canalopathies et Signalisation Calcique, Inserm U1078, Brest, France

L'activation de PAR-2 dans les kératinocytes renforce l'inflammation par des mécanismes dépendants du calcium et la production de cytokines inflammatoires telle que la TSLP. Cependant, seuls les kératinocytes primaires de la couche basale de l'épiderme sont utilisés pour analyser le rôle de PAR-2 dans l'inflammation cutanée et le prurit. Nous avons étudié l'implication de PAR-2 à partir de cultures primaires kératinocytes différenciés sur la régulation des voies calciques et par conséquent la modulation de gènes impliqués dans l'inflammation. Les enregistrements des variations calciques intracellulaires sans Ca^{2+} extracellulaire ont montré que SLIGKV, agoniste de PAR-2, induisait la libération de Ca^{2+} à partir des réserves du réticulum endoplasmique. Cette libération calcique était totalement inhibée par un antagoniste de la PLC (U73122). Les antagonistes de InsP3R (xestospongine C) et TRPV1 (AMG9810) diminuaient partiellement la libération de Ca^{2+} induite par PAR-2. Cependant, en combinaison la xestospongine C et l'AMG9810 inhibaient entièrement la réponse calcique de PAR-2. Nous avons également démontré par RT-qPCR que le SLIGKV induisait une régulation à la hausse de 13-fois l'expression de la TSLP et par deux-fois l'expression de IL1- β , TNF- α et CXCL2. Par ailleurs, le blocage de TRPV1 avec des antagonistes (AMG9810, SB366791 et capsazépine) ou avec un siARN de TRPV1 diminuait l'expression des gènes modulés par le SLIGKV. Nos travaux ont démontré pour la première fois que l'activation de PAR-2 dans les kératinocytes différenciés pouvait favoriser l'inflammation de la peau par l'expression de gènes inflammatoires par l'intermédiaire de mécanismes dépendants de la PLC et de la libération des réserves calciques à la fois par les canaux IP3 et TRPV1.

Présentation Orale et Poster (2016) – SFR SCINBIOS/IBSAM, Brest, France.



Présentation Orale et Poster (2015) – SFR SCINBIOS/IBSAM, Brest, France.

Olivier GOUIN

Laboratoire de Neurosciences de Brest (LNB) et Laboratoire de dermatologie d'Uriage

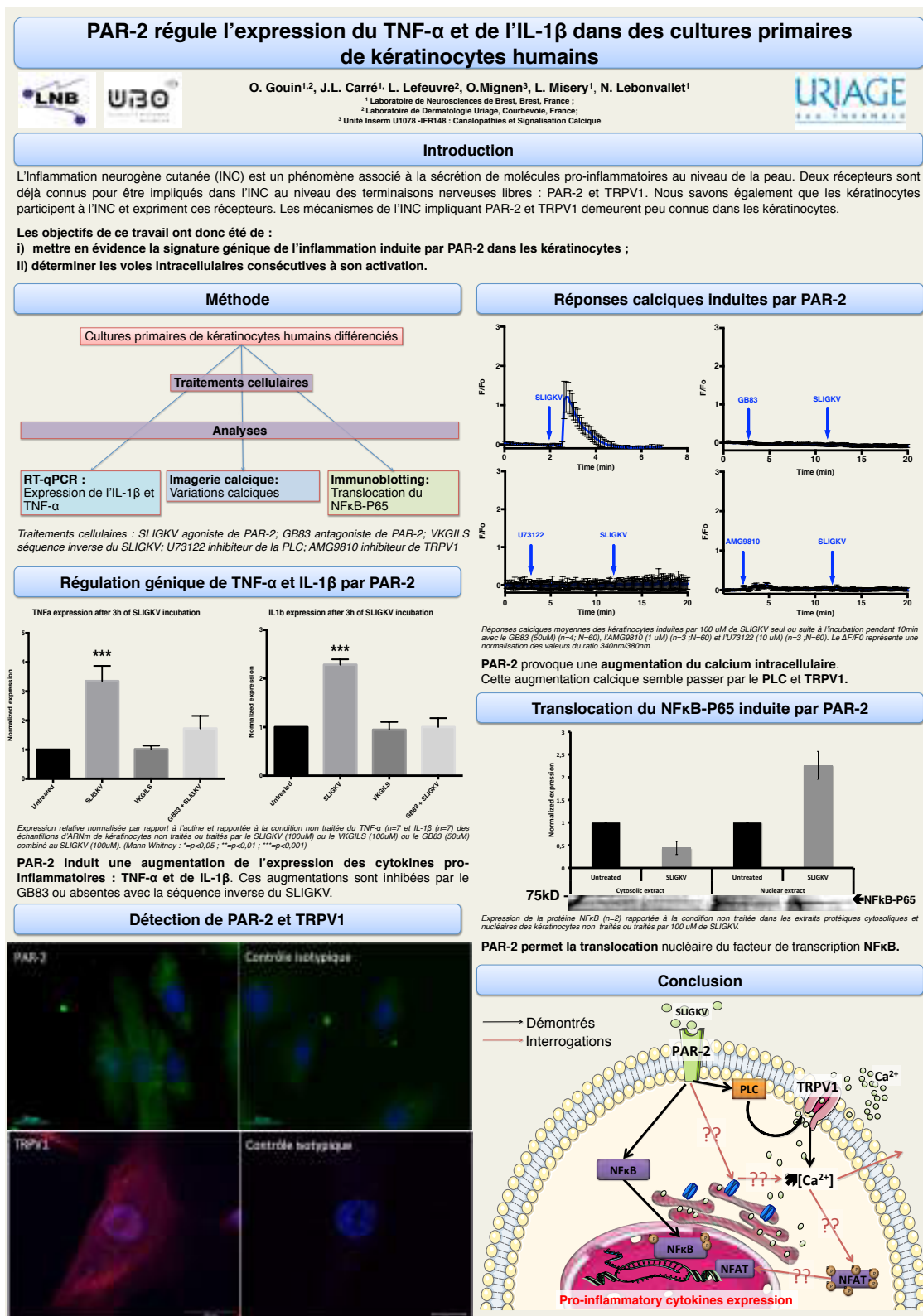
Doctorant en deuxième année thèse CIFRE

ol.gouin@gmail.com

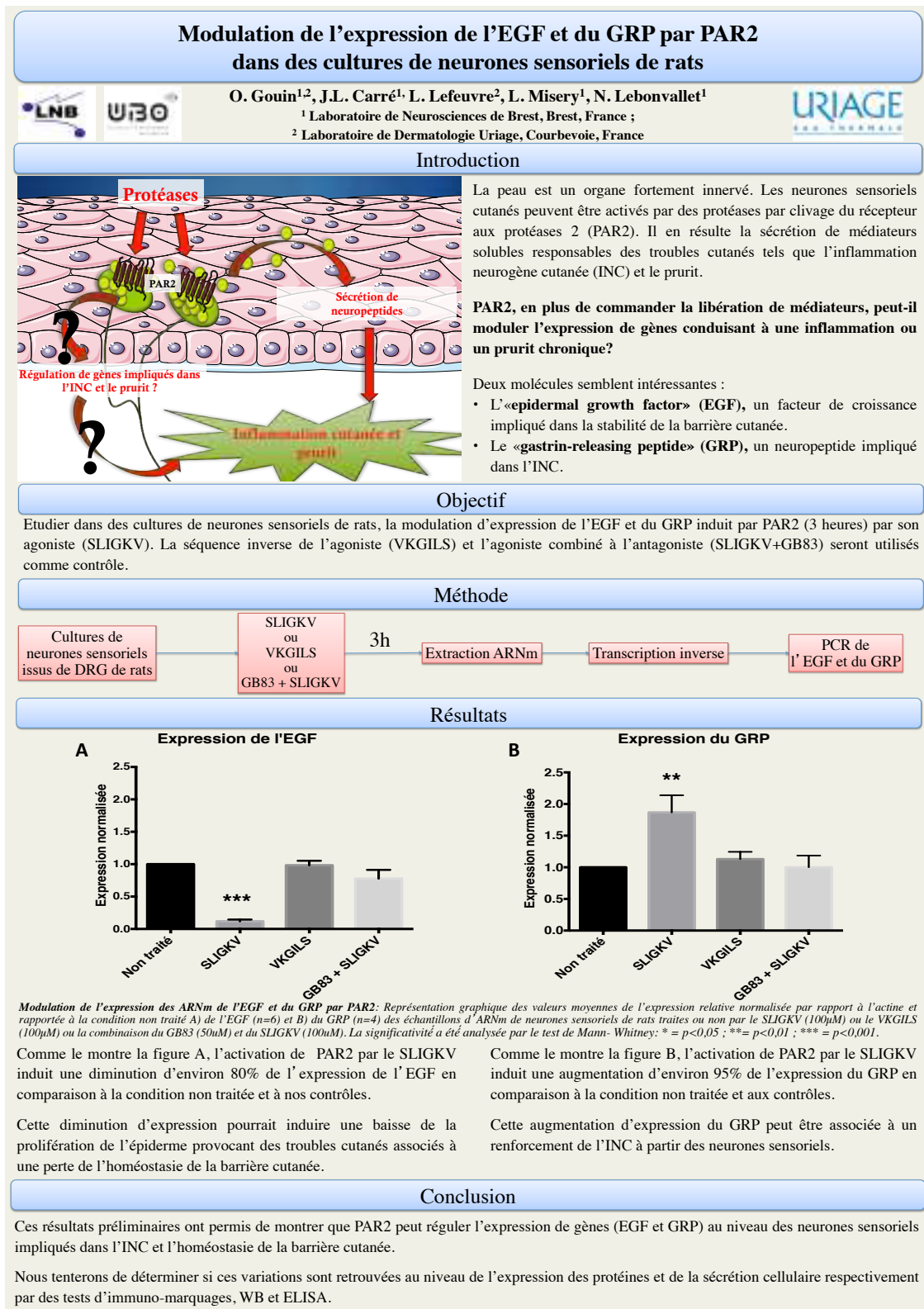
Résumé : Poster

Le « Proteinase activated receptor-2 » (PAR-2) est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G exprimées à la surface d'un grand nombre de cellules. Au niveau la peau, PAR-2 semble jouer un rôle régulateur dans les processus inflammatoire, dans la fonction de barrière et dans le prurit. La peau est un organe hautement sensoriel, richement innervée. Les interactions neuro-cutanées jouent un rôle fondamental dans sa fonction de barrière cutanée. Alors que le rôle de PAR2 dans la régulation de l'expression de gènes pro-inflammatoire a été démontré dans les kératinocytes, ce rôle dans les neurones sensoriels, présent au niveau du tissu cutané, reste encore inconnu. Par PCR en temps réel, nous avons mis en évidence que l'activation de PAR-2 par son agoniste spécifique, le SLIGKV, induisait une diminution de l'« epidermal growth factor » (EGF) et une augmentation du « gastrin releasing peptide » (GRP) dans des cultures primaires de neurones sensoriels de rat. Ces résultats *in vitro* suggèrent que PAR-2 dans les neurones sensoriels peut réguler des gènes qui vont influencer l'inflammation cutanée (par le GRP) ou la stabilité de la barrière (par l'EGF). Ces résultats préliminaires resteraient à être confirmé en protéomique.

Présentation Orale et Poster (2015) – SFR SCINBIOS/IBSAM, Brest, France.



Présentation Poster (2015) - Journée des Doctorant, Brest, France



Présentation Poster (2014) - Journée des Doctorant, Brest, France

Caractérisation des PC12 comme modèle de neurones sensoriels dans l'inflammation neurogène cutanée

O. Gouin^{1, 2}, K. L'Herondelle¹, R. Le Garrec¹, C. Le Gall-Ianotto¹, M. Sakka¹, R. Leschiera¹, M. Talagas¹, V. Buhé¹, E. Plée-Gautier¹, J. L. Carré¹, L. Lefevre², L. Misery¹, N. Lebonvallet¹

Contexte

L'inflammation neurogène cutanée (INC) est impliquée dans de nombreuses maladies de la peau comme le psoriasis ou la dermatite atopique, et est fréquemment associée à un prurit. Les neurones sensoriels de type C issus des ganglions des racines dorsales (DRG) sont le moteur de l'INC, et jouent un rôle crucial dans son initiation et son maintien par la libération de neurotransmetteurs. Actuellement, les DRG issus des mammifères sont préférentiellement utilisés pour étudier l'INC et le prurit engendrant des problèmes d'éthiques.

Objectif

L'objectif de ce travail a été de développer une alternative d'étude des neurones sensoriels par l'utilisation d'une lignée cellulaire de phéochromocytome de rat (PC12).

Méthode

Les PC12 ont été différenciées en neurones en présence de NGF.

RésultatsMarqueurs des neurones sensoriels

Afin de confirmer le phénotype neuronal des cellules issues des PC12, un immuno-marquage (IM) de marqueurs neuronaux a été réalisé. Les neurofilaments ont été détectés confirmant le phénotype de neurone. De plus, la périphérine et non NF200 a été détectée suggérant que ces cellules sont des neurones sensoriels peu ou pas myélinisés (A δ ou C) et non des neurones myélinisés (A β).

Ces résultats suggèrent que les cellules issues des PC12 semblent être des neurones sensoriels. Cependant, ont-elles un profil sécrétoire?

Marqueurs neuro-endocriniens

Par la suite, le profil neuro-sécrétoire des PC12 différenciées en neurones sensoriels a été visualisé par un marquage au PGP9.5. Dans nos conditions, il a été mis en évidence un marquage de la substance P (SP) et du calcitonine gene-related peptide (CGRP), neuropeptides impliqués dans l'INC et le prurit.

Ces résultats suggèrent que les cellules issues des PC12 semblent aptes à sécréter des neuropeptides de l'INC. Cependant, ont-elles les récepteurs pour être activées?

Des marqueurs spécifiques de l'INC et du prurit

Afin de compléter ce modèle, il a été réalisé un IM des récepteurs spécifiques de l'INC et du prurit impliqués dans l'activation neuronale et la sécrétion de neuropeptides. Deux de ces récepteurs, le canal cationique « transient receptor vanilloid 1 » (TRPV1) et le récepteur aux sérines protéases (PAR2) ont été détectés dans les PC12.

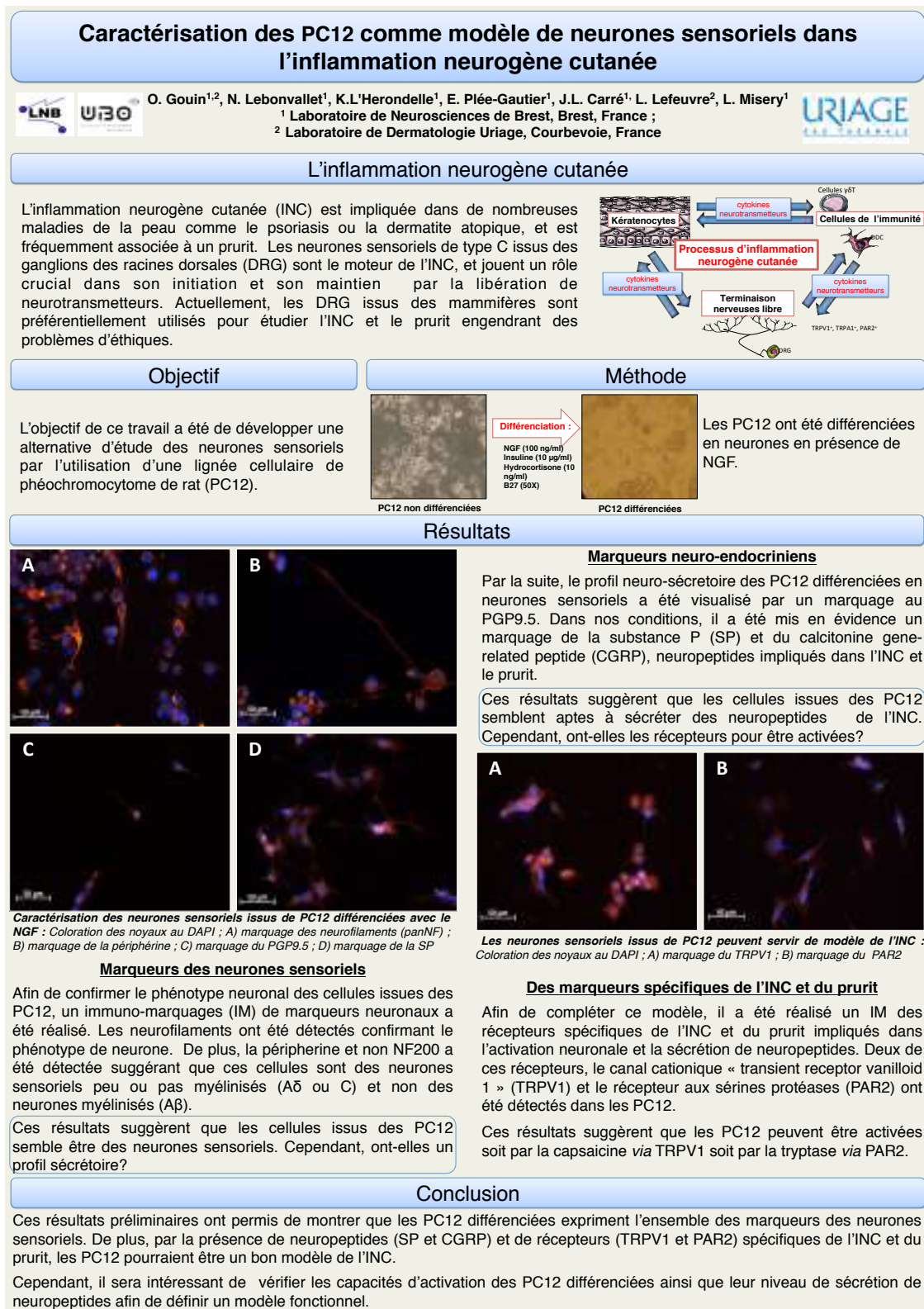
Ces résultats suggèrent que les PC12 peuvent être activées soit par la capsaïcine *via* TRPV1 soit par la tryptase *via* PAR2.

Conclusion

Ces résultats préliminaires ont permis de montrer que les PC12 différenciées expriment l'ensemble des marqueurs des neurones sensoriels. De plus, par la présence de neuropeptides (SP et CGRP) et de récepteurs (TRPV1 et PAR2) spécifiques de l'INC et du prurit, les PC12 pourraient être un bon modèle de l'INC.

Cependant, il sera intéressant de vérifier les capacités d'activation des PC12 différenciées ainsi que leur niveau de sécrétion de neuropeptides afin de définir un modèle fonctionnel.

Présentation Poster (2014) - Journée des Doctorant, Brest, France



Curriculum vitae

**Olivier GOUIN**

04/06/1987
18 av du Général Leclerc
94440 Santeny
06 89 57 11 41
ol.gouin@gmail.com

Disponible à partir de mai 2017

3^{ème} année de thèse
Permis B

FORMATION

- 2014-2017 : Doctorat à l'ED-SICMA à l'Université de Bretagne Occidentale**
Financement CIFRE : Laboratoires Dermatologiques d'Uriage => soutenance prévue en mars 2017.
- 2011-2012 : Master 2 Biochimie, Cellules, Cibles Thérapeutiques (BC2T) à l'Université Paris Diderot**
Spécialité Biomolécules et thérapeutiques - Mention bien
- 2010-2011 : Master 1 Biologie Santé à l'Université Paris-Est Créteil**
Mention assez bien, Major Promo
- 2007-2010 : Licence Sciences de la Vie et de la Terre à l'Université Paris-Est Créteil**
Spécialité Biologie, Santé – Mention assez bien
- 2006-2007 : Faculté de médecine au CHU Henri Mondor à l'Université Paris-Est Créteil**
- 2005-2006 : Baccalauréat général, série scientifique**

COMPETENCES**Domaines d'application :**

Immunologie, Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, Virologie (VHB, VHC, VIH), Physiologie cardiovasculaire, digestive, pulmonaire et cutanée, Neurosciences, expérimentation et éthique animale, Cancérologie (voies de signalisations intra-cellulaires)

Techniques :

Culture cellulaire :
Lignées cellulaires HaCat, PC12, C8161, HM11 et WM1361. Tests d'actifs d'industriels.
Cultures et co-cultures primaires de kératinocytes humains et de neurones issus de ganglions de la racine dorsale (GRD) de rats, Explants de peau ré-innervée avec des PC12 et des GRD.

Biologie moléculaire :

RT-qPCR, transfection siRNA et de vecteurs rapporteurs luciférase (NF-kB et NFAT)

Biochimie :

Elisa, immuno-précipitation, Western Blot

Microscopie :

Immunofluorescence, Patch clamp, imagerie calcique (Ca^{2+} release, SOCEs), imagerie confocale, coupe histologique

Informatique :

Systèmes d'exploitation : Mac, Linux, Windows
Logiciels : Zotero, endnote, Ms office, photoshop, NCBI, Prism (Statistiques).

Langues :

Anglais : Scientifique et technique
Espagnol : Bonnes notions

Autres diplômes :

Formation à l'expérimentation animale Niveau 1 en 2014 (Oniris)
Formation Hygiène et Sécurité en laboratoire et milieu hospitalier

EXPERIENCES ET REALISATIONS

2014-2017 : Etudiant thésard CIFRE pour les laboratoires dermatologiques d'Uriage et le Laboratoire de Neurosciences de Brest (AE4685), Université de Bretagne Occidentale (3 ans). Etude du rôle inflammatoire et des voies intracellulaires du récepteur PAR-2 dans les kératinocytes différenciés et les neurones sensoriels. Rédaction d'articles scientifiques, présentations des résultats sous forme de posters et communications orales.

2013 : Attaché de recherche Clinique chez BIOTRONIK-France (7 mois). Gestion de protocoles d'études cliniques nationales et européennes sur les défibrillateurs et les stents dans un contexte de pathologies cardiaques. Réalisation de visites de monitoring et rédaction des procédures opératoires standards internes. Suivi de projet en relation avec le chef d'étude clinique basé à Berlin et les praticiens hospitaliers.

2012-2013 : Professeur soutien scolaire pour Acadomia (1 an)

2012 : Stagiaire master 2 au laboratoire d'Immunologie, Dermatologie et Oncologie INSERM-UMR-S 976, Hôpital Saint Louis, Université Paris Diderot (6 mois). Contrôle de la traduction par Raf dans les mélanomes mutés sur Ras. Développement d'une nouvelle approche thérapeutique dans les mélanomes permettant de cibler les mélanomes mutés Ras mais aussi de prévenir ou retarder la résistance des mélanomes aux inhibiteurs de B-Raf.

2011 : Stagiaire master 1 au laboratoire de la Croissance cellulaire, Réparation et Régénération Tissulaire (CRRET), Université Paris Est Créteil (3 mois). Recherche de nouveaux partenaires à l'HARP (Héparin Affin Regulatory Peptid) et leurs implications dans l'angiogenèse tumorale.

2010 : Stagiaire Licence 1 au laboratoire de virologie moléculaire et immunologie-Physiopathologie et thérapeutique des hépatites virales chroniques IMRB-U955 équipe 18, Hôpital Henri Mondor Université Paris Est Créteil (3 mois). Recherche sur les lésions, les mécanismes de réparation de l'ADN et leurs implications sur le carcinome hépatocellulaire induit par le VHC.

2005-2011 : Aide-soignant au Centre Médical de Forcilles, période : juillet / août (5 ans)

Curriculum vitae

Publications scientifiques
- Gouin, O., Lebonvallet, N., L'Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.L., Lefeuvre, L., and Misery, L. (2015). Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. <i>Exp. Dermatol.</i> (IF : 3.762) - Gouin, O., Le Garrec, R., L'Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J. L., Lefeuvre, L., Lebonvallet, N., Misery, L. Roles of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and signaling pathways or interactions associated to their sensitization. Soumis. - Gouin, O., Le Garrec, R., L'Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J. L., Lefeuvre, L., Lebonvallet, N., Misery, L. Pivotal role of TRPV1 in the PAR-2-evoked intracellular Ca^{2+} release and inflammatory mediators production in differentiated keratinocytes. En cours de rédaction.
Communications scientifiques
- Gouin, O., Lebonvallet, N., L'Herondelle, K., Plée-Gautier, E., Carré, J.L., Lefeuvre, L., Misery, L. (2014). Caractérisation des PC12 comme modèle de neurones sensoriels dans l'inflammation neurogène cutanée. <i>Colloque SFR ScInBioS IBSAM 2014</i>, Brest, France. Communication poster. - Gouin, O., Carré, J.L., Lefeuvre, L., Mignen, O., Lebonvallet, N., Misery, L. (2015). PAR-2 régule l'expression du TNF-α et de l'IL-1β dans des cultures primaires de kératinocytes humains. <i>Colloque SFR ScInBioS IBSAM 2015</i>, Brest, France. Poster. - Gouin, O., Carré, J.L., Lefeuvre, L., Lebonvallet, N., Misery, L. (2015). Modulation de l'expression de l'EGF et du GRP par PAR2 dans des cultures de neurones sensoriels de rats. <i>Journées des jeunes chercheurs 2015 ED-SICMA</i>, Brest, France. Communication poster. - Gouin, O., Mignen, O., L'Herondelle, K., Le Garrec, R., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Leschiera, R., Talagas, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J. L., Lefeuvre, L., Lebonvallet, N., Misery¹, L. (2016). Rôle pivot de TRPV1 dans la libération de Ca^{2+} intracellulaire et la production de médiateurs inflammatoires induites par PAR-2 dans les kératinocytes humains différenciés. <i>Colloque SFR ScInBioS IBSAM 2016</i>, Brest, France. Communication orale et poster. - Gouin, O., Mignen, O., L'Herondelle, K., Le Garrec, R., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Leschiera, R., Talagas, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J. L., Lefeuvre, L., Lebonvallet, N., Misery, L. (2016). TRPV1 regulates PAR-2-evoked intracellular Ca^{2+} release and inflammatory mediators production in differentiated keratinocytes. <i>46th annual European Society for Dermatological Research (ESDR) meeting</i>, DOI: 10.1016/j.jid.2016.06.102, Munich, Allemagne. Communication orale et poster. - Gouin, O., Mignen, O., L'Herondelle, K., Le Garrec, R., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Leschiera, R., Talagas, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.L., Lefeuvre, L., Lebonvallet, N., Misery, L. (2016). Rôle inflammatoire et voie de signalisation intracellulaire de PAR-2 dans les kératinocytes différenciés. <i>Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD) 2016</i>, Paris, France. Communication orale.
Animations et vulgarisations scientifiques
2014 : Organisation du CARD 2014 à Océanopolis, Brest, France 2015 et 2016: Participation à l'animation grand public : La nuit européenne des chercheurs, Océanopolis, Brest, France
Encadrements de stagiaires
2015 : Encadrement d'un étudiant en master 1 en Sciences, Technologies, Santé mention Biologie et Santé, Université de Bretagne Occidentale (2 mois). Régulation génique induite par PAR2 et PAR4 dans des neurones sensoriels de rats. 2015 : Encadrement d'un étudiant en médecine, Université de Bretagne Occidentale (3 semaines). Stage d'observation au laboratoire sur les techniques d'étude des interactions entre les neurones sensoriels et la peau. 2015 : Encadrement d'une étudiante en IUT de l'Université Polytech'Nice-Sophia Antipolis. (6 mois). Etude de la régulation de la connexine-26, -23 et de la E-cadhérine sur des kératinocytes <i>in vitro</i> par PAR-2.
Divers
Formation aux risques d'incendie, Attestation de Formation aux Premiers Secours, Brevet d'Aptitude aux Fonctions d'Animateur (BAFA) <u>Sports pratiqués en club</u> : Tennis (classé 30-5) – Matches en équipe, Handball compétition <u>Voyages</u> : Belgique, Tunisie, Espagne, Grèce, Angleterre, Australie, Crète, Rome, Sicile

Etude du rôle de PAR-2 dans l'inflammation neurogène cutanée

Résumé :

L'inflammation neurogène cutanée (INC) est une inflammation de la peau induite par l'activation des fibres nerveuses intra-épidermiques qui secrètent des neuropeptides tels que la substance P (SP). L'INC est impliquée dans des dermatoses inflammatoires prurigineuses comme le psoriasis, la dermatite atopique (DA) et le syndrome de Netherton (SN). Un nouveau concept émerge, suggérant que les kératinocytes sont également des acteurs majeurs de l'INC. Le récepteur activé par des protéases de type 2 (PAR-2) est fortement incriminé dans l'INC associée à ces dermatoses, ce qui permet de comprendre les voies du prurit non-histaminergiques. Les enjeux thérapeutiques sont de taille puisqu'il n'existe actuellement aucun traitement efficace permettant la prise en charge spécifique du prurit histamino-indépendant au cours des dermatoses prurigineuses associées à l'INC.

Bien que le rôle de PAR-2 dans la sécrétion de neuropeptides à partir des neurones sensoriels soit clairement établi, son implication dans la modulation de gènes pouvant contribuer à l'entretien ou l'amplification de l'INC reste méconnue. Le rôle inflammatoire de PAR-2 a également été démontré sur des kératinocytes cultivés en monocouche *via* la sécrétion de cytokines par des mécanismes dépendants du Ca^{2+} . La surexpression de PAR-2 et la perte d'expression de certains canaux calciques impliqués dans sa réponse calcique dans les kératinocytes différenciés suggèrent des mécanismes d'action de PAR-2 différents pour ceux-ci. Dans le but d'étudier le rôle pro-inflammatoire de PAR-2 au cours des dermatoses prurigineuses, nous avons analysé l'effet de son activation sur des monocultures de neurones sensoriels issus de ganglions rachidiens dorsaux (GRD) de rat et de kératinocytes humains différenciés (DhPK), en criblant l'expression de médiateurs de l'inflammation. Pour approfondir, les voies calciques de PAR-2 sous-jacente à la modulation d'expression dans les kératinocytes différenciés, des expériences d'imagerie calcique ont été réalisées et différents antagonistes ont été utilisés pour analyser les acteurs impliqués. Dans le cadre d'un partenariat avec les laboratoires dermatologiques d'Uriage, nous avons testé les effets de l'eau thermale d'Uriage sur la modulation de gènes induite par PAR-2 dans les DhPK. Nous avons également utilisé une lignée de PC12 différenciables en neurones par le NGF afin de les utiliser comme alternatives des neurones sensoriels issus des GRD de rat pour l'étude de l'INC.

L'ensemble des résultats obtenus au cours du criblage des gènes modulés par PAR-2 confirme le rôle pro-inflammatoire de PAR-2 dans les neurones sensoriels de rat et dans les DhPK. La découverte d'une nouvelle voie calcique de PAR-2 dans les DhPK offre de nouvelles pistes thérapeutiques pour les dermatoses prurigineuses telles que le psoriasis, la DA et le NS. Les résultats obtenus avec l'eau thermale d'Uriage peuvent présenter une perspective thérapeutique pour les patients souffrants de dermatoses prurigineuses réfractaires aux traitements conventionnels. L'utilisation d'une lignée neuronale comme les PC12 pour l'étude de l'INC serait une alternative utile dans le développement des tests cosmétiques avec les industriels pour notre laboratoire.

Mots-clés :

PAR-2 - TRPV1 – InsP3R - Ca^{2+} - kératinocytes différenciés - neurones sensoriels - PC12 - eau thermale d'Uriage

Study of the role of PAR-2 in cutaneous neurogenic inflammation

Abstract:

Cutaneous neurogenic inflammation (CNI) is an inflammation of the skin induced by the activation of intraepidermal nerve fibers that release neuropeptides such as substance P (SP). CNI is involved in pruritic inflammatory skin disorders such as psoriasis, atopic dermatitis (AD) and Netherton syndrome (NS). A new concept is growing, suggesting that keratinocytes could also trigger INC. The proteases activated receptor 2 (PAR-2) is strongly incriminated in CNI associated with these dermatoses, which allow to understand the histamine-independent itching pathways. The therapeutic stakes are high since there is currently no effective treatment allowing the specific management of histamine-independent pruritus during skin disorders associated with CNI.

Although the role of PAR-2 in the secretion of neuropeptides from sensory neurons is clearly established, its involvement in the modulation of genes involved in the maintenance or amplification of CNI remains unknown. The inflammatory role of PAR-2 on keratinocytes has also been demonstrated through the production of cytokines in a Ca^{2+} -dependent mechanisms. The overexpression of PAR-2 and the loss of ORAI1 expression, a calcium channel following keratinocytes differentiation suggest different signaling pathways downstream to PAR-2 activation between undifferentiated and differentiated keratinocytes. In order to study the pro-inflammatory role of PAR-2 during pruritic dermatoses, we analyzed the effect of its activation on rat primary sensory neurons from dorsal spinal ganglia (DRG) and on differentiated human primary keratinocytes (DhPK) by screening the expression of inflammatory mediators. To deepen the Ca^{2+} pathways underlying PAR-2-mediated inflammatory mediator modulation in DhPK, we performed Ca^{2+} imaging experiments and different antagonists were used to analyze the involvement of intracellular actors. In a partnership with the dermatological laboratories of Uriage, we tested the effects of Uriage thermal water on PAR-2-induced gene modulation in DhPK. We also used a PC12 cell line differentiable in neurons by the NGF in order to use them as alternatives of rat primary sensory neurons from DRG for the study of INC. We also used a PC12 cell line differentiable in neurons by the NGF use them as alternatives of rat primary sensory neurons from DRG for the study of INC.

The results obtained during the screening of the PAR-2-modulated genes confirmed the pro-inflammatory role of PAR-2 in rat primary sensory neurons and in DhPK. The discovery of a new PAR-2-mediated Ca^{2+} pathway in DhPK offers new therapeutic pathways for pruritic dermatoses such as psoriasis, AD and NS. The results obtained with the thermal water of Uriage can present a therapeutic perspective for patients suffering from pruritic dermatoses refractory to conventional treatments. The use of a neuronal cell line as the PC12 for the study of INC would be an useful alternative in the development of cosmetic tests.

Mots-clés :

PAR-2 - TRPV1 – InsP3R - Ca^{2+} - differentiated keratinocytes – sensory neurones - PC12 – Uriage thermale water
