



HAL
open science

Mise en place d'un modèle in vitro 3D de dermatite atopique-like réinnervé

Flavien Huet

► **To cite this version:**

Flavien Huet. Mise en place d'un modèle in vitro 3D de dermatite atopique-like réinnervé. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2020. Français. NNT : 2020BRES0088 . tel-03562883

HAL Id: tel-03562883

<https://theses.hal.science/tel-03562883v1>

Submitted on 9 Feb 2022

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par

Flavien HUET

Mise en place d'un modèle *in vitro* 3D de dermatite atopique-like réinnervé

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Bretagne Occidentale, le 16 décembre 2020

Unité de recherche : Laboratoire Interactions Epithéliums-Neuronnes (LIEN, EA4685)

Rapporteurs avant soutenance :

Laurent MAGY PUPH, Service et Laboratoire de neurologie, Centre de Référence « Neuropathie Périphériques Rares, NNERf », CHU Limoges
Nicolas GAUDENZIO PhD, Investigateur principal Inserm - Head of Immception Lab, UMR 1056 INSERM, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Président du jury : Laurent MAGY PUPH, Centre de Référence « Neuropathie Périphériques Rares, NNERf »
Examineurs : Francis COUTURAUD PUPH, Université de Bretagne Occidentale
Nicolas GAUDENZIO Chercheur INSERM, Université de Toulouse
Jean-François NICOLAS PUPH, Université Lyon 1

Dir. de thèse : Pascale MARCORELLES PUPH, CHRU de Brest
Co-dir. de thèse : Christelle LE GALL-IANOTTO Ingénieur de Recherche, Université de Bretagne Occidentale

Invité(s)

Laurent MISERY PUPH, Université de Bretagne Occidentale

REMERCIEMENTS

« Tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais »

Je remercie chaleureusement le Pr Pascale Marcorelles pour avoir dirigé ma thèse, sa bienveillance et ses conseils.

Je remercie particulièrement le Dr Christelle Le Gall-Ianotto pour son aide et sa participation tout au long de ma thèse, nos discussions professionnelles mais également personnelles, pour m'avoir écouté et aidé dans mes réflexions. Merci de ta présence dans les bons comme dans les moments plus difficiles.

Je remercie également la Société Française de Dermatologie pour avoir financé une partie du projet.

J'adresse mes sincères remerciements au Pr Jean-François Nicolas et au Pr Francis Couturaud pour avoir participé à mon comité de suivi de thèse, suivi mon évolution au cours de ma thèse de sciences. Je les remercie pour leurs conseils et encouragements.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse, le Dr Nicolas Gaudenzio, le Pr Laurent Maggy, le Pr Francis Couturaud, le Pr Jean-François Nicolas, le Pr Pascale Marcorelles, le Dr Christelle La Gall-Ianotto et le Pr Laurent Misery qui m'ont fait l'honneur de lire et d'évaluer mon travail. Merci d'avoir pris de votre temps dans cette période si compliquée pour tout le monde.

Je souhaite remercier le Pr Laurent Misery pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire (LIEN). Tu as été un mentor tout au long de ma formation, de mon premier jour d'internat jusqu'à aujourd'hui. Tu m'as appris la dermatologie et tu m'as fait découvrir pour mon grand bonheur le monde de la recherche. J'avais imaginé poursuivre ma carrière à tes côtés, malheureusement il en sera autrement.

Un grand merci à mes compères de bureau à une époque où nous n'étions pas séparés par une glace ! Merci pour les surnoms que vous m'avez donnés qui nous ont bien fait rire (et que je tairai). Adeline Bataille, tu as été plus qu'une collègue de travail, tu es devenue une amie et a toujours été une écoute attentive pendant ces 3 années. Je sais que tu n'aimes pas être mise en lumière, mais je sais également que sans toi beaucoup de choses n'auraient pas pu être réalisées. En espérant que tu puisses rapidement venir manger à la maison. Ophélie Pierre, my ladie, et Peyman Najafi, merci pour ces moments passés ensemble, alternant réflexions scientifiques et moments plus détendus surtout en anglais. Jean-Christophe Leclerc, j'ai été ravi de t'accueillir dans notre équipe et te souhaite bon courage pour les années à venir.

Merci à Marie pour ton aide précieuse et ton travail dans ma thèse. Merci également à Mallorie pour ta participation.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de l'équipe du LIEN pour leur accueil, leur disponibilité et leur bienveillance. Je remercie plus particulièrement Nicolas Lebonvallet, Matthieu Talagas et Raphaël Leschiera pour leur aide et conseils au cours de mes 3 années de travail.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe du CHRU (secrétaires, aides-soignants, infirmiers et internes) qui m'ont aidé au cours de ces 2 dernières années.

Un immense merci à ma famille et ma belle-famille pour leur présence, leur soutien et leur compréhension au cours de ces 3 dernières années pendant lesquelles je n'étais pas autant présent auprès d'eux que je l'aurais souhaité. Merci à mes amis pour leur soutien.

Je termine bien évidemment par mes 2 amours, je ne pensais pas qu'on pouvait aimer autant.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	10
TABLE DES FIGURES.....	13
TABLE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION.....	16
Partie 1 : Peau, innervation et prurit	17
I. La peau	17
1. Généralités.....	17
2. Structure détaillée.....	19
a. L'épiderme	19
b. Le derme.....	22
c. L'hypoderme	23
3. Fonctions de la peau	23
a. La fonction barrière	24
b. L'hydratation cutanée.....	24
c. Rôle métabolique.....	26
d. Rôle sensoriel	27
e. Rôle immunitaire.....	27
4. Cellules souches	27
a. Généralités.....	27
b. Skin-derived precursors.....	28
II. L'innervation cutanée.....	30
1. Le système nerveux cutané	30
2. Les pruricepteurs	32
3. Le système neuro-immuno-cutané	35
4. Les neurones sensoriels humains à partir des skin-derived precursors	35
III. Le prurit.....	38
1. Définition	38
2. Prévalence du prurit	40
3. Evaluation prurit.....	41
4. Les prurits dermatologiques	46

Partie 2 : la dermatite atopique	50
I. Généralités – Aspects cliniques.....	50
II. Physiopathologie	53
III. Le prurit de la dermatite atopique	60
1. Caractéristiques, prévalence du prurit de la dermatite atopique et impact sur la qualité de vie	60
2. Physiopathologie du prurit de la dermatite atopique.....	71
IV. Traitements de la dermatite atopique	74
Partie 3 : Modèles <i>in vitro</i> de « DA-like ».....	87
I. Modèles animaux de dermatite atopique.....	87
II. Modèles <i>in vitro</i> de dermatite atopique.....	88
1. Modèles 2D	88
a. Généralités.....	88
b. Les kératinocytes.....	89
c. Autres modèles 2D	90
2. Modèles 3D	91
a. Peaux reconstruites.....	91
<i>Epiderme humain reconstruit</i>	92
<i>Human skin explant</i>	98
b. Explant cutané	99
3. Autres modèles <i>in vitro</i>	100
a. Cellules immunitaires.....	100
b. Innervation cutanée	100
CONTEXTE	101
OBJECTIFS.....	104
MATERIEL ET METHODES.....	106
I. Culture cellulaire	107
1. Conditions de culture cellulaire.....	107
2. Cultures primaires de kératinocytes humains.....	107
a. Obtention des kératinocytes	107
b. Entretien et différenciation des kératinocytes	108
3. Cultures primaires de neurones sensoriels	108
a. A partir de ganglions rachidiens dorsaux de rat	108
<i>Obtention des neurones sensoriels primaires de rats</i>	108

	<i>Entretien des neurones sensoriels primaires de rats</i>	109
	b. A partir de skin-derived precursors humains	109
	<i>Obtention des skin-derived precursors</i>	109
	<i>Entretien des skin-derived precursors humains</i>	110
	<i>Différenciation des skin-derived precursors humains en neurones sensoriels</i>	111
	<i>Maturation des neurones sensoriels</i>	112
4.	Co-cultures de neurones sensoriels-kératinocytes	114
	a. Co-culture en 2D	114
	b. Co-culture en 3D	114
	<i>Obtention d'explants cutanés humains</i>	114
	<i>Entretien d'explant cutané</i>	115
	<i>Co-culture d'explant cutané humain-neurones sensoriels de rats</i>	115
	<i>Induction de l'inflammation</i>	115
II.	Application de composés pharmacologiques : Les agonistes et antagonistes pharmacologiques	117
III.	Immunofluorescence	118
	1. Immunohistochimie	118
	2. Immunocytochimie	119
	3. Histologie	119
IV.	Etudes biochimiques et biomoléculaires	121
	1. Mesure de la viabilité cellulaire	121
	2. Cytotoxicité	122
	3. Extraction, dosage et analyse des acides riboxynucléiques (ARNs)	122
	a. Isolement et dosages des ARNs des biopsies cutanées	122
	b. Isolement et dosages des ARNs des kératinocytes et neurones sensoriels (skin-derived precursors)	123
	4. Reverse transcription et polymerase chain reaction (PCR) en temps réel	123
	a. Synthèse de l'ADN complémentaire (reverse transcription)	123
	b. PCR quantitative (qPCR)	124
	c. Analyse des résultats de qPCR	127
	5. Dosages biochimiques	127
	a. Dosage de la substance P et calcitonin gene-related peptide	127
	b. Dosage de la « Thymic stromal lymphopoietin »	128
	6. Analyses statistiques	129

RESULTATS & DISCUSSION	130
Chapitre 1 : Résultats préliminaires.....	131
I. Molécules du cocktail inflammatoire.....	132
1. Choix des molécules.....	132
a. Interleukines (IL)-4 et 13	132
b. Tumor necrosis factor (TNF)- α	132
c. Acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I :C)	132
2. Concentration des molécules.....	133
a. IL-4, IL-13 et TNF- α	133
b. Poly I :C	136
II. Temps d'activation du modèle	137
III. Discussion	139
1. Choix des molécules du cocktail inflammatoire	139
2. Choix des marqueurs d'étude.....	141
a. Marqueurs de l'inflammation.....	141
b. Marqueurs de l'altération de la barrière épidermique	141
IV. Conclusion.....	142
Chapitre 2 : Modèle <i>in vitro</i> humain de dermatite atopique-like réinnervé (article en cours de soumission au <i>British Journal of Dermatology</i>)	143
Chapitre 3 : Résultats complémentaires	174
I. Introduction	174
II. Résultats	176
1. La réinnervation n'est pas effective sur une culture longue.....	176
2. Etude de l'environnement inflammatoire.....	178
a. Analyse de l'expression de TSLP dans le modèle «DA-like » réinnervé	178
b. Analyse de l'expression du TLR-2 dans le modèle « DA-like » réinnervé ...	179
3. Etude de la barrière épidermique : analyse transcriptomique de l'expression des protéines de l'épiderme dans le modèle DA-like réinnervé	181
4. Apport de l'IL-1 β dans le cocktail inflammatoire.....	182
a. Marqueurs de l'inflammation.....	182
<i>Analyse en culture 2D sur kératinocytes humains différenciés.....</i>	<i>182</i>
<i>Analyse de la TSLP dans les surnageants de culture 3D.....</i>	<i>184</i>
b. Marqueurs de la barrière épidermique	185
1. Réinnervation et inflammation.....	187

2.	Etude de l'environnement inflammatoire.....	188
a.	Analyse de l'expression de TSLP dans le modèle DA-like réinnervé	188
b.	Apport de l'IL-1 β dans le cocktail inflammatoire.....	190
c.	Augmentation de l'expression d'un autre marqueur de l'inflammation : IL-8....	191
d.	Inflammation et marqueur de l'immunité innée : le TLR2	192
Chapitre 4 : Mise en place d'un modèle 3D d'explant cutané réinnervé à partir de neurones sensoriels issus de « skin-derived precursors » (projet soutenu par la Société Française de Dermatologie septembre 2019).....		
I.	Introduction	194
II.	Résultats	196
1.	Etude de la cytotoxicité lors du décollement-recollement des SKPs	196
2.	Etude de l'expression des marqueurs neuronaux après décollement	198
3.	Etude de l'expression des gènes des marqueurs de la voie de signalisation du prurit par les neurones sensoriels dérivés des SKPs	199
4.	Les neurones sensoriels humains dérivés de la SKP expriment des marqueurs spécifiques aux neurones sensoriels.....	201
5.	Effet de l'ajout du cocktail inflammatoire sur les neurones sensoriels issus de SKPs	202
a.	Etude de la toxicité (Test MTT).....	202
b.	Etude sur les marqueurs neuronaux et les protéines des voies du prurit.....	203
6.	Comparaison du phénotype des neurones sensoriels issus de SKPs entre le de culture SKP et le milieu de culture des GRDs.....	209
III.	Discussion	211
1.	Pas de cytotoxicité ni de dédifférenciation des neurones sensoriels lors du décollement-réensemencement avant la maturation ni après ajout d'un environnement inflammatoire.....	211
2.	Les neurones sensoriels dérivés des SKPs expriment des marqueurs de la voie de signalisation du prurit et sécrètent des neuropeptides.....	212
SYNTHESE ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE.....		216
Synthèse de l'étude		217
Perspectives de l'étude		221
I.	Modèle hétérologue de « dermatite atopique-like » réinnervé.....	221
II.	Modèle homologue de dermatite atopique-like réinnervé.....	222
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		224
ANNEXES.....		245

Annexe 1 : Milieux, solutions et supports de culture cellulaire utilisés.....	246
Annexe 2 : Réactifs utilisés	248
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SUPPLEMENTAIRES	249

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : anticorps

AhR : aryl hydrocarbon receptor

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide riboxynucléique

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

BSA : bovine sera albumin

Ca²⁺ : calcium

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CK : cytokératine

CMH : fibres C mécaniquement sensibles

CMI : fibres C mécaniquement insensibles

Ct : cycle threshold

DA : dermatite atopique

DAPI : 40,6-diamidino- 2-phénylindole

dbcAMP : dibutyryl cyclic-Adenosine monophosphate

DMEM : dulbecco's modified Eagle medium

DMEM-F12 : DMEM Ham's F12 medium

DO : densité optique

DPBS : dulbecco's phosphate buffered saline

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

EGF : epidermal growth factor

EHR : épidermes humains reconstruits

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FBS : foetal bovine serum

FGF : fibroblast growth factor

GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor

GRD : ganglions rachidiens dorsaux

H1R : récepteur H1 de l'histamine

HSE : human skin equivalent

Kg : kilogramme

IgE : immunoglobuline E

IF : immunofluorescence

IFN- γ : interferon- γ

IFSI : international forum for the study of itch

IL : interleukine

iPSC : cellules souches pluripotentes induites

JAK/STAT : janus kinase/signal transducer and activator of transcription

JEADV : Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology

KSFM : keratinocytes serum-free medium

LIEN : laboratoire interaction épithéliums-neurones

LIF : leukemia inhibitory factor

Lt : lymphocyte T

mm : millimètre

MTT : thiazolyl blue tetrazolium bromide

NB-21-A : neurobrew-21 without vitamin A

NFAT : nuclear factor of activated T-cells

NGF : nerve growth factor

NK1R : neurokinin-1 receptor

NMF : natural moisturizing factors

NS : neurone sensoriel

ORAI : calcium release-activated calcium channel protein

PAR : protease activated receptor

PAR2 : protease activated receptor 2

PCA : acide pyrrolidone carboxylique

PCR : polymerase chain reaction

PGP9.5 : protein gene product 9.5

PMA : promorphamine

Poly I :C : acide polyinosinique-polycytidylique

PSM : poste de sécurité microbiologique

qPCR : PCR en temps réel ou PCR quantitative

TH : T helper

TRPA1 : transient receptor potential ankyrin 1

TRPV1 : transient receptor potential vanilloid 1

TSLP : thymic stromal lymphopoietin

TYK : tyrosine kinase

RTX : resiniferatoxin

SKP : skin-derived precursors

SP : substance P

PAF : paraformaldéhyde

PDE 4 : phosphodiesterase 4

UCA : acide urocanique

UV : ultraviolet

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la peau

Figure 2 : Schéma de l'épiderme

Figure 3 : Gradient hydrique épidermique

Figure 4 : Biosynthèse de la vitamine D

Figure 5 : Voies de signalisation du prurit

Figure 6 : Localisation potentielle des cellules souches dans la peau

Figure 7 : Algorithme clinique de classification du prurit

Figure 8 : Critères diagnostiques de la dermatite atopique selon l'United-Kingdom Party

Figure 9 : Schéma résumant les principaux mécanismes physiopathologiques de la dermatite atopique

Figure 10 : Schématisation de l'hypothèse « outside-inside » de la dermatite atopique

Figure 11 : Schématisation de l'hypothèse « inside-outside » de la dermatite atopique

Figure 12 : Images des SKPs selon l'évolution de la culture cellulaire

Figure 13 : Modification de l'épiderme par les différentes concentrations du cocktail inflammatoire

Figure 14 : Modification de l'expression de l'ARNm de la TSLP des les kératinocytes primaires humains après ajout des différentes concentrations du cocktail inflammatoire.

Figure 15 : Toxicité cellulaire du TNF- α à 20ng/ml (test MTT)

Figure 16 : Augmentation de l'expression d'ARNm de TLR3 des kératinocytes primaires humains selon la concentration de Poly I:C.

Figure 17 : Test de différents temps d'activation d'explant cutané humain par le cocktail inflammatoire avec ou sans TNF- α

Figure 18 : Densité nucléaire après 7 jours de culture des explants cutanés selon les différents temps d'activation

Figure 19 : Absence de réinnervation effective sur la culture longue

Figure 20 : Augmentation de l'expression de l'ARNm de la TSLP en RT-qPCR des explants cutanés avec inflammation

Figure 21 : Expression de TLR2 à la fois protéique (A.) et transcriptomique (B.) après ajout du cocktail inflammatoire dans le modèle 3D réinnervé

Figure 22 : Expression des ARNm de la filaggrine, de la cytokératine 10 et de la loricrine dans des explants inflammés après réinnervation

Figure 23 : Expression de l'ARNm des marqueurs de l'inflammation TSLP et IL-8 en RT-qPCR des kératinocytes humains primaires en différenciation lors de l'ajout de l'IL-1 β

Figure 24 : Expression de l'ARNm du TLR2 en RT-qPCR des kératinocytes primaires humains en différenciation lors de l'ajout des différents composés du cocktail inflammatoire (A.) et avec ou sans IL-1 β dans le cocktail (B.)

Figure 25 : Concentrations de TSLP libérée dans les milieux de culture des explants cutanés non réinnervés en présence ou non d'IL-1 β

Figure 26 : Expression de l'ARNm des marqueurs de l'inflammation en RT-qPCR des kératinocytes humains primaires en différenciation lors de l'ajout de l'IL-1 β

Figure 27 : Absence de cytotoxicité de la trypsination avant la maturation au test ToxiLight™

Figure 28 : Expression des gènes neuronaux BRN3A et PRDM12 dans les SKPs à la fin de la maturation (A) et impact du décollement des neurones sensoriels dérivés des SKPs sur l'expression de ces gènes (B)

Figure 29 : Expression des marqueurs de la voie de signalisation du prurit dans les neurones sensoriels issus de SKPs à la fin de la maturation

Figure 30 : Expression des marqueurs de la voie de signalisation du prurit après décollement des cellules

Figure 31 : Caractérisation par immunofluorescence des neurones sensoriels dérivés de SKPs

Figure 32 : Absence de cytotoxicité du cocktail inflammatoire sur les neurones sensoriels

Figure 33 : Caractérisation des neurones sensoriels issus des SKPs dans un environnement inflammatoire

Figure 34 : Mesure du taux de Substance P libérée dans les surnageants de cultures de neurones sensoriels issus de SKPs activés ou non par le cocktail inflammatoire, la TSLP ou le RTX.

Figure 35 : Modifications morphologiques des neurones sensoriels lors de la culture avec le milieu des ganglions rachidiens dorsaux

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres nerveuses sensorielles

Tableau 2 : Liste des pruritogènes et leurs récepteurs

Tableau 3 : Classification du prurit selon la maladie sous-jacente

Tableau 4 : Principaux pruritogènes et leurs récepteurs dans la dermatite atopique

Tableau 5 : Protocole de différenciation des SKPs

Tableau 6 : Agonistes pharmacologiques

Tableau 7 : Anticorps primaires

Tableau 8 : Anticorps secondaires

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR

Tableau 10 : Synthèse du chapitre 1

INTRODUCTION

Partie 1 : Peau, innervation et prurit

I. La peau

1. Généralités

La peau est le plus grand organe du corps humain et un des plus complexes. Chez un individu de 70 kilogrammes (kg), elle pèse plus de 5 kg et couvre une surface d'environ 2 m². Sur le plan anatomique, la peau humaine mesure entre 1 à 30 millimètres (mm) d'épaisseur selon les zones de l'organisme et se compose (Dréno, 2009) (figure 1):

- D'un épiderme ;
- D'un derme sous-jacent de tissu conjonctif, séparé de l'épiderme par une membrane basale dermo-épidermique ou jonction dermo-épidermique (JDE) ;
- D'une couche de graisse sous-cutanée, l'hypoderme, séparée du reste du corps par une couche résiduelle de muscles striés ;
- D'annexes pilosébacées avec les poils et les glandes sébacées ;
- D'une innervation cutanée ;
- Ainsi que d'une vascularisation avec un réseau profond et un réseau superficiel.

Figure 1 : Schéma de la peau (soumis aux droits d'auteurs)

La peau est un organe complexe qui joue un rôle de barrière entre notre corps et le milieu extérieur dont le fonctionnement à deux finalités principales (Dréno, 2009) :

- La première, protéger notre organisme des agressions extérieures quelles soit physiques, chimiques ou infectieuses.
- La deuxième, assurer la communication entre notre organisme et le milieu environnant.

2. Structure détaillée

a. L'épiderme

L'épiderme mesure selon les zones de l'organisme entre 0,05 et 1,5 mm d'épaisseur. Il est le plus fin au niveau des paupières où il mesure 0,05 mm et le plus épais au niveau des paumes et des plantes des pieds où il mesure 1,5 mm. Le derme est en moyenne 20 fois plus épais, pouvant atteindre 3 à 4 mm au niveau du dos.

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié orthokératosique en constant renouvellement. Il est composé principalement de kératinocytes (environ 90% de la population cellulaire) qui ont un rôle primordial dans la barrière cutanée et également de mélanocytes (rôle principale de protection contre les ultra-violets (UV)), de cellules de Langerhans (cellules dendritiques présentatrices d'antigène) et de cellules de Merkel (fonctions de mécanorécepteurs).

Morphologiquement, l'épiderme se divise en 4 couches (Plotczyk & Higgins, 2019) (figure 2) :

- La couche basale (= stratum basale) est constituée d'une assise unique de kératinocytes cylindriques, directement en contact avec la JDE. Parmi les kératinocytes basaux se trouvent les cellules souches qui assurent le renouvellement de l'épiderme, d'où la présence de cellules en mitose dans la couche basale.
- La couche épineuse (= stratum spinosum) est constituée de plusieurs assises de kératinocytes polygonaux. Leurs contours apparaissent hérissés d'épines, d'où le nom de couche épineuse. Ces épines correspondent aux desmosomes qui accrochent les kératinocytes entre eux.
- La couche granuleuse (= stratum granulosum) est constituée de plusieurs assises de cellules aplaties, au grand axe parallèle à la JDE. L'apparition dans le cytoplasme des

kératinocytes de granulations basophiles est à l'origine de l'appellation couche granuleuse.

- La couche cornée est constituée de plusieurs assises de cellules aplaties, anucléées, appelées cornéocytes. La couche cornée est compacte en profondeur au contact de la couche granuleuse, et desquamant en superficie.

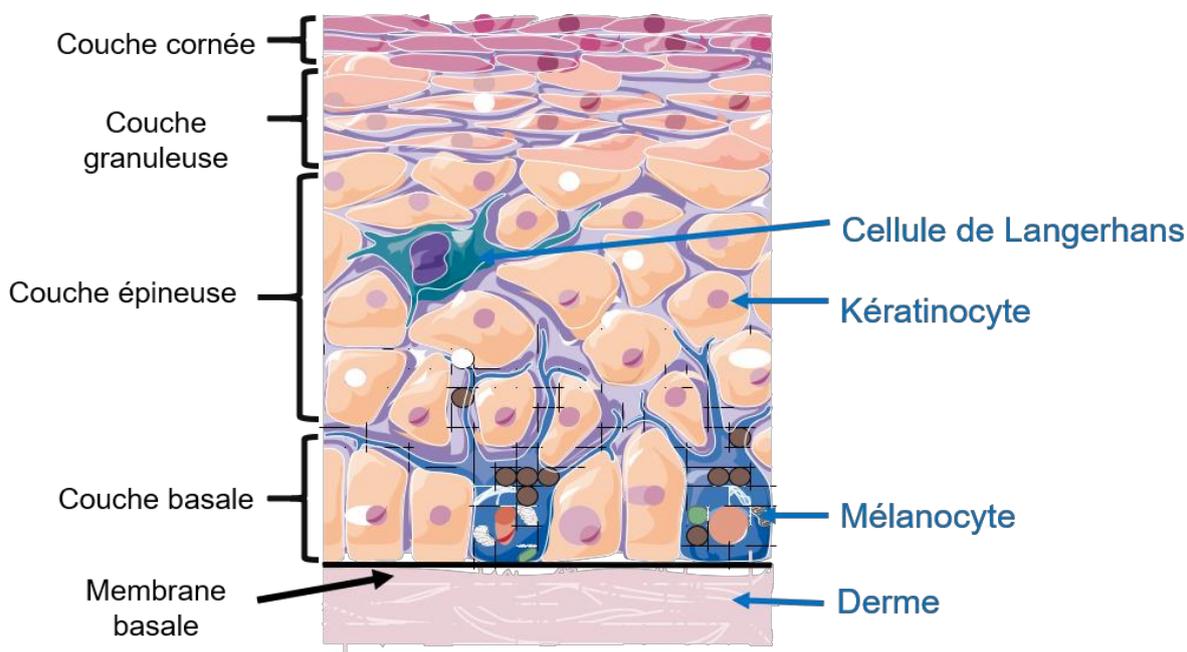


Figure 2 : Schéma de l'épiderme. L'épiderme se compose d'une membrane basale sur laquelle repose une monocouche cellulaire composée majoritairement de kératinocytes et de quelques mélanocytes : la couche basale. Les kératinocytes migrent vers le pôle supérieur de l'épiderme pour former successivement la couche épineuse, la couche granuleuse puis la couche cornée.

La migration cellulaire de la couche basale à la couche cornée prend 14 jours, puis 14 jours pour la desquamation. L'équilibre entre la prolifération kératinocytaire et la desquamation permet le maintien de l'intégrité et la cohésion de l'épiderme. La prolifération peut être accélérée dans certaines maladies comme le psoriasis. Au cours de leur migration les kératinocytes vont se différencier pour devenir des cornéocytes et former une enveloppe

cornée. Parmi les très nombreuses molécules composant les structures caractéristiques de la différenciation kératinocytaire de la peau, voici quelques exemples significatifs (Dréno, 2009).

- Les molécules des tonofilaments (filaments intermédiaires de 10 nm de diamètre rassemblés en trousseaux) sont des cytokératines (CK) presque toujours associées en paires. Il s'agit des CK5, CK14 et CK15 dans la couche basale et des CK1 et CK10 dans les couches supra-basales.
- Les hémidesmosomes et les desmosomes sont les systèmes de jonction sur lesquels s'ancrent les tonofilaments : les hémidesmosomes accrochent les kératinocytes basaux à la matrice extra-cellulaire alors que les desmosomes accrochent les kératinocytes entre eux. Les desmosomes très nombreux dans la couche spinieuse au niveau des interdigitations de la membrane cytoplasmique des kératinocytes, expliquent les "épines" vues en optique. Ils deviennent des cornéodesmosomes avec une ligne dense très épaisse au niveau de la couche cornée. Ces derniers sont finalement lysés ce qui aboutit à la desquamation des cornéocytes les plus superficiels.
- Les grains de kératohyaline et les kératinosomes sont caractéristiques et spécifiques des kératinocytes de la couche granuleuse de l'épiderme. Ce sont des marqueurs de la différenciation épidermique terminale. Ils disparaissent dans la couche cornée. Ils libèrent dans l'espace extra-cellulaire leur contenu, qui est à l'origine du ciment intercornéocytaire.
- La molécule des grains de kératohyaline de la couche granuleuse est la profilaggrine. Dans la couche cornée, la profilaggrine se transforme en filaggrine qui, comme l'indique son nom, est capable d'agréger des filaments ; filaggrine et filaments intermédiaires de kératine organisés en réseau forment ainsi la matrice cytoplasmique des cornéocytes. Finalement la filaggrine est protéolysée en acides aminés polaires libres, en acide urocanique (UCA) et en acide pyrrolidone carboxylique (PCA) qui constituent les

« facteurs hydratant naturels » (= « natural moisturizing factors » (NMF)) de la couche cornée en surface.

- La couche cornée est formée de cornéocytes (kératinocytes de la couche cornée), avec leur enveloppe cornée caractéristique, et du ciment intercornéocytaire ; l'ensemble est souvent comparé à un mur dont les cornéocytes sont les briques assemblées par le ciment intercornéocytaire. Celui-ci est formé de lamelles lipidiques provenant de la transformation des lamelles lipidiques des kératinosomes. L'enveloppe cornée apparaît sous forme d'un épaissement de 15 à 20 nm d'épaisseur à la face interne de la membrane cytoplasmique alors que le noyau des kératinocytes et tous les organites cytoplasmiques ont disparu (Van Smeden & Bouwstra, 2016). Parmi les molécules de l'enveloppe cornée, les plus connues et les plus étudiées sont la filaggrine, la loricine et l'involucrine. Toutes ces molécules forment l'enveloppe cornée en s'associant grâce à des transglutaminases dont l'activité ne se manifeste que dans la couche granuleuse puis la couche cornée.

L'innervation cutanée fait l'objet d'un paragraphe spécifique (Introduction, II).

b. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif vascularisé et innervé. Il est constitué de fibroblastes synthétisant des fibres de collagène, d'élastine et de fibronectine conférant la souplesse de la peau et de cellules d'origine hématopoïétiques. Le derme se sépare en derme papillaire, partie superficielle, mince et composée des fibres de collagène, fines, isolées et orientées le plus souvent perpendiculairement ou obliquement par rapport au plan de la membrane basale ; et en derme réticulaire formé d'un tissu conjonctif dense constitué essentiellement de fibres de

collagène épaisses en gros faisceaux et élastiques qui s'entrecroisent dans toutes les directions dans des plans grossièrement parallèles à la surface cutanée.

Le derme est très bien vascularisé avec un plexus profond et superficiel mais aucun vaisseau ne passe par la JDE. Le derme contient également des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires comme les mastocytes ou les cellules de Langerhans (Plotczyk & Higgins, 2019).

c. L'hypoderme

L'hypoderme est situé sous le derme sans limite nette. Il est constitué d'adipocytes organisés en lobules et séparés par des septums interlobulaires servant de passage aux vaisseaux et aux nerfs allant dans le derme (Plotczyk & Higgins, 2019).

3. Fonctions de la peau

Le rôle clé de la peau est la fonction barrière vis-à-vis de l'environnement extérieur. Mais la peau a également d'autres fonctions (Lee & Lee, 2018; Plotczyk & Higgins, 2019; Proksch, 2018) :

- Maintien de l'hydratation cutanée
- Gradient de calcium (Ca^{2+})
- Sensorielle
- Immunitaire
- Métabolique

a. La fonction barrière

Il s'agit du rôle le plus important de la peau. La barrière cutanée correspond à la barrière épidermique. Les principaux composants de la barrière sont les cornéocytes avec leur enveloppe cornée et les lipides bi-lamellaires intercellulaires (Van Smeden et al., 2014). Les cornéocytes incorporées dans une enveloppe cornée composée de protéines fortement réticulées (loricrine, involucrine et filaggrine) confèrent principalement la résistance mécanique de la peau. Les bi-couches lipidiques adjacentes assurent la rétention de l'eau et régulent le mouvement des électrolytes.

Le pH joue également un rôle important. Le pH de la surface cutanée, neutre à la naissance, devient acide au cours des premières semaines de vie. Ainsi l'absence de pH acide à la naissance a été associée à un accroissement du risque d'infection par des bactéries et des champignons (Proksch, 2018).

Le gradient de Ca^{2+} est important pour la restauration de la barrière épidermique après une rupture. Effectivement, le taux de Ca^{2+} est bas dans la couche basale et maximum au niveau de la jonction couche granuleuse-couche épineuse. Après une rupture de la barrière épidermique, la diminution de la concentration du Ca^{2+} stimule la sécrétion des corps lamellaires d'Odland, ce qui permet l'apport des composants requis pour la restauration (Lee & Lee, 2018). Les corps lamellaires d'Odland vont déverser leurs lipides (céramides et cholestérol) dans l'espace inter-cellulaire et permettre la cohésion des cornéocytes.

b. L'hydratation cutanée

L'hydratation cutanée confère à la peau à la fois sa souplesse et son élasticité. La rétention d'eau est réalisée par la couche cornée. Il existe un gradient hydrique dans

l'épiderme : 15 % à 20 % d'eau dans la couche cornée, 40 % à l'interface entre couche cornée et couche granuleuse et le taux augmente pour aboutir à une valeur d'environ 70 % dans l'épiderme viable (Duplan & Nocera, 2018) (figure 3). La présence d'eau dans l'épiderme est nécessaire au fonctionnement de certaines enzymes, en particulier celles impliquées dans la desquamation. La production de filaggrine dépend également de la teneur en eau dans la couche cornée. Une forte hydratation de celle-ci s'oppose à la production de NMF par protéolyse de la filaggrine alors qu'une diminution de la teneur en eau déclenche cette protéolyse et la production de NMF (Angelova-Fischer et al., 2014).

Figure 3 : Gradient hydrique épidermique (soumis aux droits d'auteurs). Représentation schématique des gradients physiologiques au sein de l'épiderme considérés comme majeurs au plan fonctionnel pour le maintien d'une barrière cutanée efficace (gradients hydriques, de pH et ionique, Ca^{2+}). SC : stratum corneum ; SG : stratum granulosum (D'après Duplan H et Nocera T).

c. Rôle métabolique

La peau joue également un rôle métabolique. Effectivement, elle est le lieu de synthèse de la vitamine D (figure 4) qui permet l'absorption de Ca^{2+} par l'intestin, la réabsorption du Ca^{2+} et du phosphore par les reins et la résorption osseuse par les ostéoclastes (Kechichian & Ezzedine, 2018).

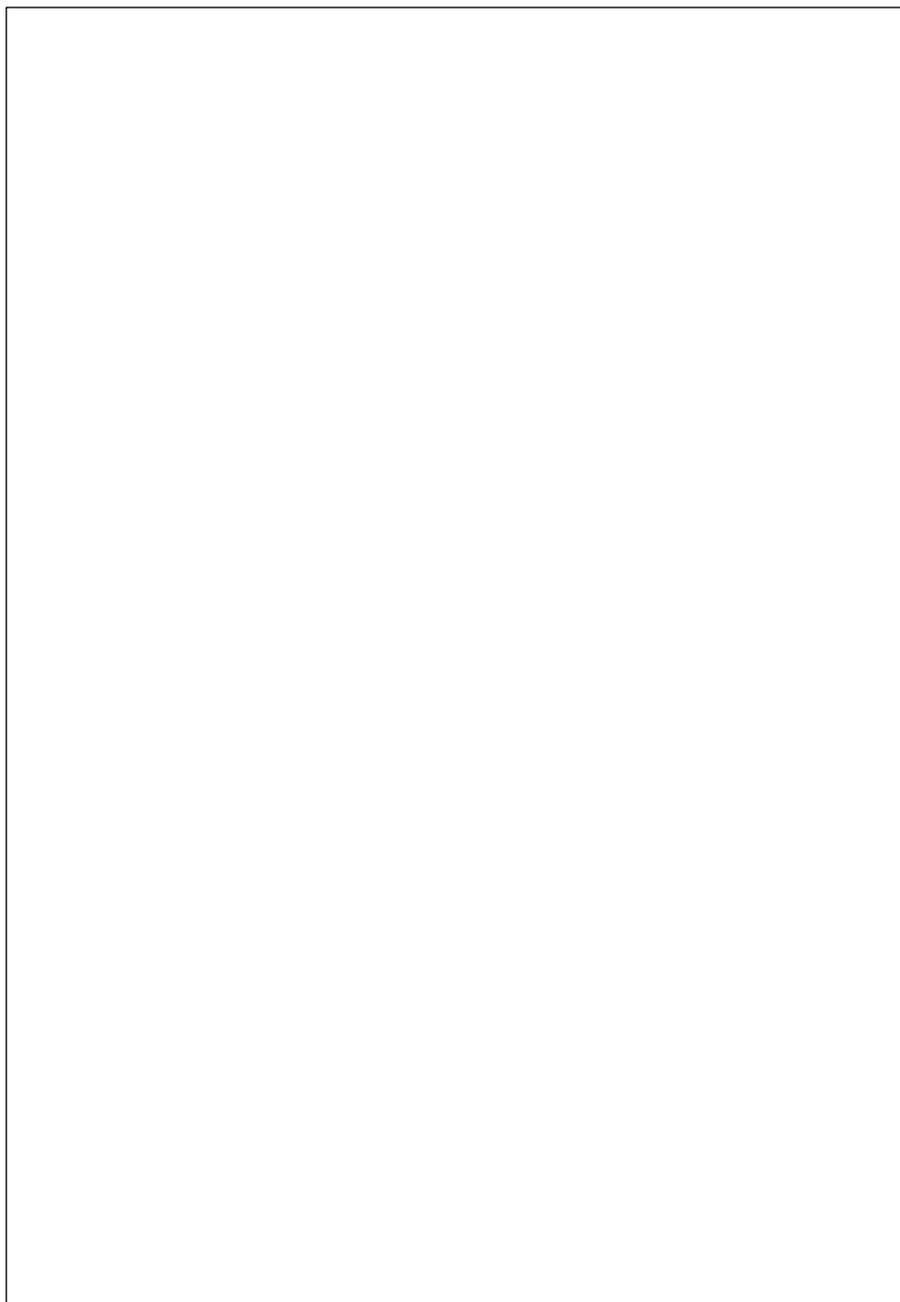


Figure 4 : Biosynthèse de la vitamine D (soumis aux droits d'auteurs). (D'après Ernandez & Stoermann-Chopard, 2012)

d. Rôle sensoriel

Le toucher est un des cinq sens. La peau via les terminaisons nerveuses permet l'exploration du monde extérieur à travers le toucher. Parmi les terminaisons nerveuses, les terminaisons libres traversent la JDE et pénètrent dans l'épiderme. Elles comprennent des mécanorécepteurs, des thermorécepteurs, des nocicepteurs et des pruricepteurs (McGlone & Reilly, 2010). Un chapitre plus complet détaillera l'innervation cutanée (Introduction, II).

e. Rôle immunitaire

La peau est aussi un organe immunitaire. D'une part, il contient des cellules de Langerhans, cellules présentatrices d'antigène qui vont une fois l'antigène internalisé, l'apprêter puis migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour le présenter aux lymphocytes T (Lt) naïfs.

D'autres part, les kératinocytes jouent un rôle dans la défense de l'organisme par la sécrétion de peptides antimicrobiens (psoriasine, dermcidine...), la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (interleukines (IL)-6, 8...) et la présentation d'antigènes aux cellules de Langerhans (Noske, 2018).

4. Cellules souches

a. Généralités

Une cellule souche se définit par une "cellule dans un tissu qui, dans des circonstances normales, maintient sa propre population, sans diminuée en fonction et en taille, et fournit des cellules filles pour fournir de nouvelles cellules fonctionnelles de ce tissu" (Schofield, 1983). Qu'elles soient fœtales, embryonnaires, adultes, uni-, pluri- ou multipotentes, les cellules

souches sont au centre de l'attention des chercheurs depuis plus d'un siècle. Les cellules souches adultes sont des cellules indifférenciées qui ont la capacité de se multiplier afin de générer des cellules différenciées de même lignée que leur tissu d'origine. Dans les années 1970, la découverte d'un réservoir de cellules souches dans l'épiderme est apparue après la première identification de cellules souches épidermiques (Potten, 1974). Au cours des trois dernières décennies, les cellules souches adultes ont été isolées à partir de différents tissus (système nerveux central, moelle osseuse, rétine et muscle). Différentes publications rapportent que certaines cellules souches peuvent générer des cellules d'une autre lignée embryonnaire dans des conditions de culture spécifiques (Bergeron et al., 2020; Bjornson et al., 1999; Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Parmi ces cellules souches, nous nous sommes intéressés aux cellules souches présentes au niveau cutané : les «skin-derived precursors » ou SKPs.

b. Skin-derived precursors

Au début des années 2000, les précurseurs dérivés de la peau appelée SKP sont devenues une nouvelle population de cellules souches (Muller et al., 2018; Toma et al., 2001). Les SKPs sont des cellules précurseurs multipotentes dérivées de la crête neurale qui possèdent des caractéristiques des cellules souches telles qu'un auto-renouveaulement indéfini et une capacité à générer différentes lignées cellulaires (Toma et al., 2001; Toma et al., 2005). Ces cellules souches multipotentes ont d'abord été isolées et décrites à partir de la peau de rongeurs (Reynolds & Weiss, 1992).

Ces cellules souches peuvent être isolées de la peau humaine adulte et possèdent une capacité d'auto-renouveaulement. Plusieurs études ont démontré qu'une grande variété de types de cellules pouvait être dérivée des SKPs, telles que les cellules exprimant des marqueurs de

lignées neuronales, gliales, ostéoblastiques, musculaires lisses, chondrocytaires et mélanocytaires (Biernaskie et al., 2007; Fernandes et al., 2004, 2006; Toma et al., 2005; Wong et al., 2006). De plus, les SKPs expriment certains marqueurs communs aux cellules souches la crête neurale telles que le progéniteur neuronal NESTIN, le p75NTR (récepteur à faible affinité aux neurotrophines p75) et les facteurs de transcription, tels que SOX9, SOX10, PAX3, SLUG et SNAIL (Fernandes et al., 2004; Wong et al., 2006).

Leur capacité à se différencier en neurones sensoriels fait l'objet d'un paragraphe complet (Introduction, II, 4).

II. L'innervation cutanée

1. Le système nerveux cutané

Le système nerveux périphérique se compose de nerfs périphériques. Ces derniers ont leur corps cellulaire dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD) ou les ganglions trigéminés pour les nerfs de la face. Les nerfs périphériques se composent de 2 types : les nerfs afférents (dirigés vers le système nerveux central) et les nerfs moteurs (vers le système nerveux périphérique).

La peau contient un réseau complexe de fibres nerveuses sensorielles qui constitue une barrière vitale en contact direct avec le système nerveux central (Ashrafi et al., 2016). Ces nerfs sont essentiels pour influencer les fonctions physiologiques cutanées (Roosterman et al., 2006). Les mécanorécepteurs, répondant à des stimulations mécaniques (i.e à la pression, vibration et toucher), les thermorécepteurs, répondant à des stimulations thermiques (i.e chaud et froid) et les nocicepteurs, répondant à des stimuli nocifs (i.e pression, étirement, température...) se trouvent dans l'épiderme et le derme. Concernant les mécanorécepteurs, l'épiderme comprend des corpuscules de Merkel (association entre les cellules de Merkel et les terminaisons des fibres A β) et des terminaisons nerveuses libres alors que le derme comprend des corpuscules de Ruffini, Meissner ou de Pacini et des terminaisons nerveuses libres (Roosterman et al., 2006).

Il existe 3 principaux types de fibres nerveuses cutanées (A β , A δ et C) caractérisées par leur corps cellulaire, le diamètre des axones, le degré de myélinisation et la vitesse de conduction (Basbaum et al., 2009) (tableau 1). Les fibres A β sont larges avec une conduction tandis que les fibres C sont petites avec une conduction lente. Les fibres A δ constituent 80 % des nerfs sensoriels primaires émergeant des ganglions de la racine dorsale, tandis que les

fibres C constituent 20 % des terminaisons nerveuses (Ashrafi et al., 2016). Ces nerfs sensoriels, qui s'étendent à travers toutes les couches de la peau, transfèrent les signaux des mécanorécepteurs, des thermorécepteurs et des nocicepteurs dans les ganglions de la racine dorsale. Les stimuli mécaniques sont détectés par les mécanorécepteurs associés aux corpuscules sensoriels grâce aux fibres $A\beta$ ou aux fibres $A\delta$; la température par les thermorécepteurs grâce aux fibres $A\delta$ et C ; et la douleur par les nocicepteurs grâce aux fibres $A\delta$ et C (Roosterman et al., 2006). A partir de là, des sensations comme la douleur, la brûlure et les démangeaisons sont transmises à des zones spécifiques du cerveau.

Le deuxième groupe de nerfs comprend les fibres nerveuses autonomes qui ne constituent qu'une minorité des fibres nerveuses cutanées par rapport aux nerfs sensoriels. Elles se limitent au derme et sont impliquées dans la régulation de la circulation sanguine, la fonction lymphatique et la régulation des annexes de la peau (glandes sudoripares, glandes apocrines et follicules pileux).

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres nerveuses sensorielles

<u>Nerfs sensoriels</u>	<u>Myéline</u>	<u>Diamètre (µm)</u>	<u>Vitesse (m/s)</u>	<u>Fonction</u>
Aα	Épaisse	12-22	70-120	Mécanique
Aβ	Modérée	6-12	50	Tact, pression et vibrations
Aδ	Fine	1-5	4-30	Mécaniques avec un seuil bas, thermiques
C	Absente	0,2-1,5	0,5-2	Mécaniques avec un seuil bas, thermiques et chimiques

2. Les pruricepteurs

La conception classique des récepteurs sensoriels cutanés définit les trois types fonctionnels décrits précédemment : les thermorécepteurs, les mécanorécepteurs et les nocicepteurs. Aujourd'hui, nous pouvons en ajouter un quatrième type : les pruricepteurs, spécialisés dans la perception du prurit.

Les pruricepteurs sont localisés au niveau des terminaisons nerveuses libres épidermiques ou de la JDE, principalement des fibres nerveuses non myélinisées (fibres C), mais également les fibres Aδ (Ringkamp et al., 2011; Ringkamp & Meyer, 2014; Schmelz et al., 1997). Au cours du prurit, différents agents cellulaires (kératinocytes, cellules immunitaires ou mastocytes) sont activés et libèrent de nombreux médiateurs du prurit (médiateurs inflammatoires, neuromédiateurs et neuropeptides). Ces médiateurs se lient à leurs récepteurs (pruricepteurs), entraînant une activation des neurones sensoriels spécifiques.

Deux sous-groupes de fibres nerveuses pruriceptives totalement indépendants peuvent être distingués : les fibres nerveuses histaminergiques et non-histaminergiques (Ikoma et al.,

2006). Les signaux sont transférés (à partir de fibres C mécaniquement insensibles (CMi) pour la voie histaminergique ou fibres de type C mécaniquement sensibles (CMH), pour la voie de signalisation non histaminergiques) à travers le GRD de la moelle épinière puis remonte par le tractus spinothalamique jusqu'au thalamus, atteignant finalement le cortex cérébral (Yosipovitch et al., 2018) (figure 5).

Les fibres nerveuses histaminergiques sont activées par l'histamine. Les fibres nerveuses non-histaminergiques réagissent à divers pruritogènes autres que l'histamine principalement des protéases se liant à la protéine « protease activated receptor » (PAR2) mais pas seulement (Yosipovitch & Bernhard, 2013). Les différents pruritogènes et leurs récepteurs sont listés dans le tableau 2. L'existence de 2 voies de signalisation distinctes et l'implication de nombreux pruricepteurs et médiateurs différents expliquent la variabilité de l'efficacité des différents traitements anti-prurigineux.

Figure 5 : Voies de signalisation du prurit (soumis aux droits d'auteurs) (D'après Yosipovitch G et *al.*, 2018). Déclenchement de la voie de signalisation du prurit par des facteurs externes, des pruritogènes exogène ou endogènes sécrétés par les cellules immunitaires (par exemple, les mastocytes, les cellules T, les éosinophiles, les neutrophiles, et les basophiles) et les kératinocytes. Ces pruritogènes stimulent leurs pruricepteurs localisés sur les terminaisons libres des fibres C non-myélinisés situées dans l'épiderme et de la jonction dermo-épidermique.

Tableau 2 : liste des pruritogènes et leurs récepteurs

Famille de pruritogènes		Récepteur
Amines	Histamine	H1/H4 R
	Sérotonine (5-HT)	5-HT2 et 3
Protéases	Tryptase/trypsine	PAR-2
	Cathepsine S	PAR-2, PAR-4, MgrprC11
	Kallicréines	PAR-2
	<u>Mucunaine</u>	PAR-2, PAR-4
	<u>Acariens</u>	PAR-2
Neuropeptides	SP	NK-1R
	NK-A	NK-2R
	Endothéline 1	ET-A
	VIP	VIP-R
	Bombésine (GRP)	GRPR
Médiateurs lipidiques	PAF	PAF-R
	Leucotriènes (B4)	BLT1 R
	Prostaglandines (E2)	Pg-R
	Thromboxanes (A2)	TP R
Kinines	Bradykinine	B1/B2
Cytokines	IL-2	
	IL-6	
	IL-4	IL-R
	IL-22	
	IL-31	OSMR/IL-31RA
Agonistes des Mrgpr	B-alanine	MrgprD
	BAM8-22 (dérivé de proenkephaline A)	MrgprC11, TRPA1
	Chloroquine	MrgprA3, TRPA1
Autres pruritogènes	<u>Chaleur (>42°C)</u>	TRPV1
	Stress oxydatif	TRPA1
	<u>Stress mécanique (grattage)</u>	TRPV1
	Protons (H ⁺)	TRPV1
	<u>Capsaïcine</u>	TRPV1
	Acides biliaires	TGR5
	<u>Substances chimiques (peinture, solvants...)</u>	
	<u>Piqures d'insectes</u>	H1-R ou MrgprA3

BLT-1, Block lipid transport 1; B1/B2, Bradykinin receptor; CGRP, calcitonin gene-related /peptide ; ET, endothelin ; GRP, gastrin releasing peptide ; H1R/H4, histamin receptor ; HT, hydroxytryptamine; IL, interleukine; Mgrpr, Mas-related G protein; NK-1R/NK-2R, neurokinin receptor; OSMR, Oncostatin M receptor; PAF, platelet activating factor; PAR, protease activated receptor; SP, Substance P; TGR5, Takeda G protein-coupled receptor 5; TRPA1, Transient Receptor Potential Ankyrin 1; TRPV1, Transient Receptor Potential Vanilloid 1; TSLP, thymic stromal lymphopoeitin

3. Le système neuro-immuno-cutané

La peau est un organe central vis-à-vis du monde extérieur par l'intermédiaire de ses fonctions sensorielle et immunitaire. Les fibres nerveuses cutanées ont un rôle afférent en transmettant les informations au système nerveux central mais également un rôle efférent en libérant des neuropeptides. Elles agissent activement dans le système neuro-endocrino-immuno-cutané via les neuropeptides, les cytokines, les neurotransmetteurs, les petites molécules et des processus moins définis comme le stress psychologique (Misery, 2011). La peau est donc particulièrement sensible au stress. Les voies du stress ont des conséquences importantes sur l'homéostasie de la peau, en particulier les fonctions immunes, la fonction barrière cutanée, la cicatrisation ou la susceptibilité aux infections (Misery, 1997).

Sur le plan immunitaire, le stress aigu et le stress chronique agissent différemment. Le stress aigu, via les glucocorticoïdes et les catécholamines, va stimuler le système immunitaire et orienter vers une réponse T helper (Th) 1. A l'opposé, le stress chronique entraîne un basculement de la voie Th1 vers la voie Th2 (Elenkov & Chrousos, 1999). L'inflammation périphérique a des effets « feedback » sur le cerveau via les cytokines ; l'inflammation et les cellules immunitaires retentissent sur le psychisme, comme par exemple l'interféron- α sur la dépression (Su et al., 2019).

4. Les neurones sensoriels humains à partir des skin-derived precursors

Les SKPs sont des cellules souches de la crête neurale qui persistent dans certains tissus adultes et se trouvent dans différentes "niches" de la peau et plus particulièrement dans la région péri-vasculaire et le follicule pileux (Bergeron et al., 2020; Dai et al., 2018; Sieber-Blum & Grim, 2004) (figure 6). Les cellules souches neuronales ont la capacité de générer

une grande partie du système nerveux périphérique, en particulier les neurones sensoriels (Le Douarin & Dupin, 2003).

Figure 6 : Localisation potentielle des cellules souches dans la peau (soumis aux droits d'auteurs) (Modifié et adapté à partir de Dai et al., 2018).

Récemment, des travaux menés dans notre laboratoire ont permis de mettre au point un protocole de différenciation des SKPs en neurones sensoriels (Bataille et al., 2020). À la fin du protocole de différenciation, les neurones sensoriels issus des SKPs montraient une sur-régulation des neurogènes. L'analyse transcriptionnelle montrait une nette augmentation de l'expression de marqueurs de gènes neuronaux BRN3A (marqueur de neurones sensoriels) et PRDM12 (marqueurs de cellules nerveuses sensibles à la douleur) par rapport aux SKPs non différenciés. En immunohistochimie, 65 % et 80 % des cellules exprimaient les marqueurs des neurones périphériques BRN3A et périphérine, respectivement. De plus, les cellules différenciées exprimaient les récepteurs présents dans les neurones sensoriels périphériques tels que le « transient receptor potential vanilloid 1 » (TRPV1), le PAR2, le « transient receptor potential ankyrin 1 » (TRPA1), la substance P (SP), le « calcitonin gene-related peptide » (CGRP), le récepteur de H1 de l'histamine (H1R). Ces récepteurs étaient fonctionnels comme montré par les signaux de Ca^{2+} enregistrés à la suite d'une stimulation avec leurs agonistes spécifiques. Le TRPV1 est largement exprimée dans les neurones sensoriels de la peau et joue un rôle important dans la sensation de douleur et l'inflammation, principalement par plusieurs neuropeptides libérés localement comme la SP. Le TRPA1 est également exprimé dans les neurones sensoriels et est impliqué dans la douleur et l'inflammation également (Gouin et al., 2017). Le H1R est le principal récepteur de la voie du

prurit dépendante de l'histamine. Le PAR2 est connue pour être impliquée dans l'inflammation neurogène et le prurit (Cottrell et al., 2003).

III. Le prurit

1. Définition

Le prurit, terme clinique pour évoquer la démangeaison, est défini comme une sensation désagréable qui entraîne un besoin de se gratter. Ce prurit peut être localisé ou généralisé, aigu ou chronique. Il s'agit du signe fonctionnel le plus fréquemment décrit en dermatologie avec un retentissement important sur la qualité de vie.

L'« International Forum for the Study of Itch » (IFSI) a proposé une classification du prurit basée sur la présentation clinique du patient et distingue les affections avec et sans lésion cutanée primaire ou secondaire (Misery & Ständer, 2016; Ständer et al., 2007). Trois groupes sont ainsi définis (figure 7) :

- Groupe 1 : prurit avec maladie dermatologique.
- Groupe 2 : prurit avec peau saine ou prurit *sine materia*. Ce groupe inclut les prurits liés à une maladie systémique, une néoplasie, induits par un médicament ou d'origine neurologique ou psychiatrique.
- Groupe 3 : prurit avec lésions de grattage chronique comme le prurigo nodulaire ou le lichen simplex

L'étape suivante consiste à classer le patient en fonction de la maladie sous-jacente correspondante. À cette fin, plusieurs catégories ont été définies (tableau 3).

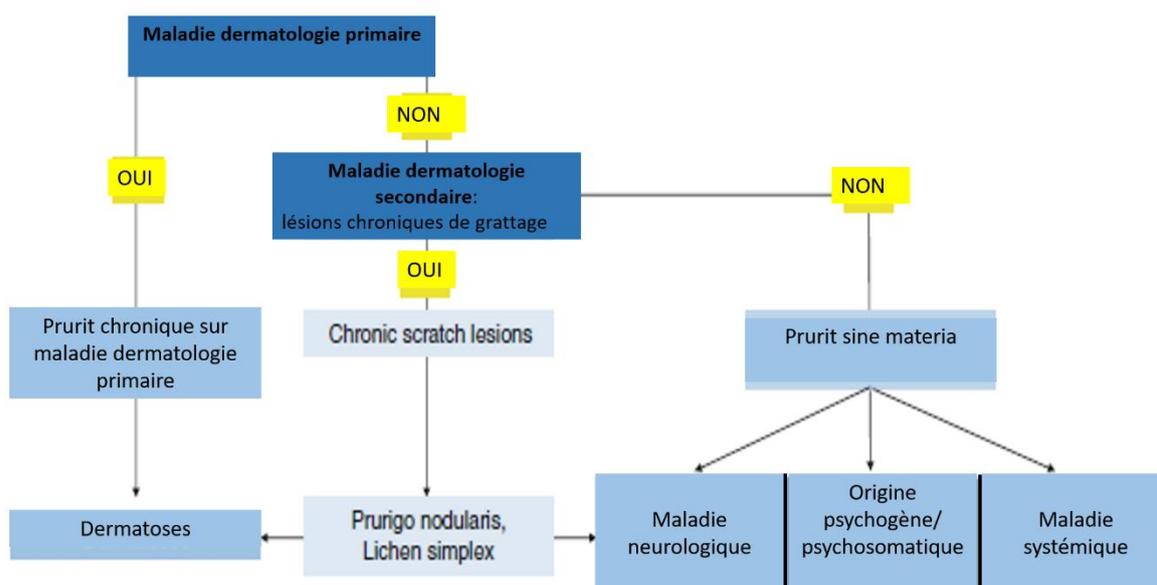


Figure 7 : Algorithme clinique de classification du prurit (Modifié et adapté d'après Pruritus, Misery and Stander, 2016)

Tableau 3 : Classification du prurit selon la maladie sous-jacente (D'après Misery and Ständer 2016).

<u>Catégorie</u>	<u>Maladies</u>
1. Dermatologique	Maladies de la peau telles que le psoriasis, la dermatite atopique, la gale et l'urticaire
2. Systémique	Maladie de systèmes autre que la peau, telles qu'une atteinte hépatique, rénale, sanguine ou médicamenteuses
3. Neurologique	Maladie du système nerveux central ou périphérique (i.e compression nerveuse, irritation nerveuse)
4. Psychologique / psychosomatique	Prurit somatoforme avec comorbidités constaté dans les "maladies psychiatriques et psychosomatiques".
5. Mixte	Coexistence et superposition de différentes maladies
6. Autres	Origine indéterminée

2. Prévalence du prurit

Le prurit est inclus dans la définition de certaines dermatoses, telles que la dermatite atopique (DA) ou l'urticaire, mais il n'est pas ou peu associé à d'autres maladies de la peau, telles que la rosacée ou les verrues (Hanifin & Rajka, 1980). Le psoriasis a longtemps été considéré comme une maladie non prurigineuse, mais il existe actuellement un consensus dans l'évaluation des patients atteints de psoriasis sur le fait qu'ils souffrent fréquemment de prurit. De manière globale, le prurit altère profondément la qualité de vie et le sommeil des patients et induit une énorme charge psychosociale (Gowda et al., 2010; Jeon et al., 2017; Kaaz et al., 2019). Dans une récente étude transversale, le prurit avait un effet négatif sur la vie quotidienne chez 2 patients sur 3, une insomnie était observée chez plus de 88 % des patients (Kopyciok et al., 2016).

Malgré ces connaissances, il est surprenant de constater qu'il existe peu d'études évaluant la prévalence du prurit dans les maladies de peau les plus courantes. Dans ce contexte, la société française de dermatologie, le Collège français des enseignants en dermatologie et la Fédération française de formation médicale continue en dermatologie ont décidé de mener une enquête auprès de la population adulte pour évaluer la prévalence des maladies de peau en France ; cette enquête a été appelée le projet "Objectifs Peau" (Richard et al., 2018). Nous avons réalisé une étude annexe qui s'est concentrée sur la fréquence du prurit et de la douleur dans les dermatoses les plus courantes, ainsi que sur leurs impacts psychologiques. Ces données ont fait l'objet d'une communication au « World Congress of Itch » à Sydney fin 2019 (l'article est soumis au Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (JEADV)).

3. Evaluation prurit

La prévalence du prurit est élevée avec un fort retentissement sur la qualité de vie des patients atteints. Le prurit est un symptôme subjectif et son évaluation reste un défi car aucune méthode objective de sa mesure n'a encore été conçue. L'évaluation du prurit a fait l'objet de la publication du chapitre « Assessment of pruritus and sensitive skin » dans le livre « Practical Aspects of Cosmetic Testing » paru en 2020.

Assessment of Pruritus and Sensitive Skin

Flavien Huet ¹ [✉],² Email flavien.huet@chu-brest.fr

Laurent Misery ^{1,2}

¹ Department of Dermatology University Hospital of Brest Brest France

² Univ Brest, LIEN Brest France

Abstract

Pruritus is a common and complex symptom in dermatology but also in general population. Measuring pruritus is essential for patient assessment but also to raise awareness of the impact of chronic pruritus in health care. Mono-dimensional scales, such as the numerical rating scale, the visual analog scale, and the verbal rating scale, are available and easy to use to measure pruritus intensity. Multidimensional scales can be an alternative but are not used in clinical practice. These scales (such as the 5-D itch scale, the Pruritus Severity Scale or the 12-Item Pruritus Severity Scale) combine several dimensions such as itch intensity, sleep disturbance, or duration. The Dermatology Life Quality Index (DLQI) is a widely used health-related quality of life scale specific for dermatologic disorders. Sensitive skin is a frequent complaint in the general population and can impair the quality of life. The Sensitive Scale is a validated questionnaire including 10 items and correlated with the DLQI. The lactic acid sting test is also used in studies of sensitive skin and consists in application of lactic acid to the nasolabial fold, followed by evaluation of the intensity of the subjective symptoms. Assessment of burden in sensitive skin can be achieved by the Boss (Burden of Sensitive Skin) questionnaire.

24.1.

Pruritus

24.1.1.

Introduction

Pruritus is defined as an unpleasant sensation that provokes the need to scratch [1]. Pruritus is the most frequent symptom in dermatology and is responsible for a huge psychosocial burden: pruritus is listed by the Global Burden of Disease project as one of the 50 most common interdisciplinary symptoms leading to high burden levels [2]. Pruritus is also frequent in the general population. In a recent study, pruritus was reported in 32% of the general population [3]. Furthermore, chronic pruritus, i.e., pruritus lasting longer than 6 weeks, deeply alters the quality of life and sleep of patients [45]. In a recent cross-

sectional study, pruritus had a negative effect on daily life in two out of three patients, and sleeplessness was observed in more than 88% of pruritus patients [6]. It should be investigated, because not only dermatological conditions cause chronic itch but also systemic, neurological, or psychiatric diseases. Since pruritus is a subjective symptom, assessing pruritus remains a challenge because an objective method of measuring symptoms has yet to be designed [7]. The International Forum for the Study of Itch (IFSI) established a classification dividing chronic pruritus into three categories upon physical examination:

1. Chronic pruritus on inflamed skin
2. Chronic pruritus on normal skin
3. Chronic pruritus with severe scratch lesions [8]

Measuring pruritus is essential for patient assessment but also to raise awareness of the impact of chronic pruritus in health care. Furthermore, a standardized manner of assessment of pruritus to allow comparisons between studies and ensure the highest medical and professional standards is necessary in randomized clinical trials (RCT) [9]. Different types of scales for measuring pruritus intensity are available. Sleep disturbance, anxiety, and depression are other factors that should be taken into account.

24.1.2.

Pruritus Intensity

Mono- and multidimensional scales are available for measuring pruritus. The intensity can be quickly measured with mono-dimensional scales that are routinely used in clinical care and RCTs.

The *numerical rating scale* (NRS) is used to measure subjective symptom intensity. Patients can be asked to rate their itch intensity from 0 ("absence of symptoms") to 10 ("the worst imaginable itch").

Another mono-dimensional scale, the *visual analog scale* (VAS), offers a rapid method for appraising intensity, thus making them especially useful in RCTs. The VAS is currently the most popular instrument. VAS provides patients the opportunity to indicate the intensity of their itch by marking on a 10-cm-long, ruler-shaped scale [1011]. Both endpoints are marked with a number corresponding to the intensity, the left endpoint with 0 representing "no itch" and the right endpoint with 10 representing the "worst imaginable itch". Scores below 3.0 VAS/NRS points are generally associated with mild itch, whereas scores higher than 6.9 illustrate severe itch. Scores above 9.0 represent very severe itch [11].

The *verbal rating scale* (VRS) is a further mono-dimensional scale that provides patients the option of choosing their itch intensity by means of gradually rising adjectives (0-no itch, 4-very severe itch) [10].

The NRS, VAS, and VRS have been validated in large-scale studies consisting of chronic pruritus patients with pruritic dermatoses or pruritus of various origins. These instruments have high reproducibility and a high correlation between different scales [101112]. NRS, VAS, and VRS are used in RCTs but there is still a debate on the optimum recall period (12 h, 24 h, 3 days, or 7 days). Usually, the past 24 h are taken into consideration. It is important to keep in mind that these scales only provide the itch intensity at a specific point in time, being susceptible to be perturbed by factors such as stress, anxiety, and comorbidities.

Multidimensional scales, such as 5-D itch scale, can be alternatively used. The *5-D itch scale* is a reliable, multidimensional measure of itching that has been validated in patients with chronic pruritus to detect changes over time [13]. The five dimensions are degree, duration, direction, disability, and distribution. The 5-D itch scale is useful as an outcome measure in clinical trials.

The *Pruritus Severity Scale*, a self-reported seven-item scale, combines itch intensity, sleep disturbance, and burden by the symptom (pruritus) aiming to give a comprehensive rating of the itch impact [14].

The *12-Item Pruritus Severity Scale* (12-PSS) has been developed as a simple, multidimensional method for assessing pruritus intensity [15]. This scale assesses pruritus intensity (two questions), pruritus extent (one question) and duration (one question), influence of pruritus on concentration and patient psyche (four questions), and scratching as a response to pruritus stimuli (four questions). 12-PSS has a significant correlation with the VAS and quality of life level, and a high reproducibility.

Other scales such as the Dynamic Pruritus Score (DPS) (measuring the change in pruritus intensity, compared with a defined earlier time-point, enabling a more precise interpretation of the course of pruritus), Itch Severity Scale, ItchyQuant, and the Eppendorf Pruritus Questionnaire exist to evaluate pruritus [16]. Scratch lesions can be also considered with two additional scales: Scratch Symptom Score or Prurigo Activity Score [17].

24.1.3.

Quality of Life

Chronic pruritus alters the quality of life and has a huge psychosocial burden. Especially, pruritus impacts negatively sleep of patients and increases the risk of anxiety or depression.

The *DLOI* (Dermatology Life Quality Index) is a health-related quality of life scale specific for dermatologic disorders and is widely used [18]. It comprises ten items focusing on the following eight dimensions: "symptoms," "daily activities," "leisure," "work," "personal relationships," "feeling," "school," and "treatment." A total score (between 0 and 30) is calculated and can be expressed as a percentage. The higher the score is, the greater the impairment in quality of life is. Generally, quality of life is considered moderately impaired

in patients who score between 6 and 11, very impaired in those scoring between 11 and 21, and extremely impaired in those with a score of 21 or greater [19].

The *36-item short form (SF-36)* may be used to measure the effect of chronic pruritus on patient's quality of life. The SF-12 is a short version of the SF-36 that is composed of 12 items. It is a health-related generic quality of life questionnaire that can be used in the general population to assess its health status [20]. Responses to questions are dichotomous (yes/no) or ordinal (excellent to poor), or they express a frequency (always to never). The following two scores can be calculated from these 12 questions: a Physical Component Summary (PCS-12) and a Mental Component Summary (MCS-12). There is no overall score. If there was no response to a question from one of these subscales, the score cannot be calculated. Thus, a given subject can have a PCS-12 score but no MCS-12 score. After the abnormal responses and reversed items were processed, each response was assigned a coefficient. PCS-12 and MCS-12 scores were obtained by summation. The higher the score, the better the quality of life [21].

The ItchyQoL has been developed to assess the impairment to health-related quality of life (HRQoL) in patients with CP. It is a pruritus-specific instrument that measures the impact of CP on patients' HRQoL. This 22-item questionnaire describes certain areas of focus such as "symptoms," "functioning," and "emotions" and is strongly correlated with DLQI [22].

Less specific scales of skin diseases can also be used in addition, for example, the EuroQol 5-dimensions (EQ-5D) questionnaire, which is known to be a valuable instrument to assess the impairment of health-related quality of life in skin diseases [23,24]. EQ-5D is a standardized generic instrument consisting of two parts [25]. The EQ visual analog scale (EQ-VAS) records respondents' self-rated health on a visual analog scale, from "0" to "100" (i.e., worst to best imaginable health state). This information can be used as a quantitative measure of health outcome as judged by the individual respondent. The EQ-5D further assesses the health status across dimensions of mobility, self-care, usual activities, pain/discomfort, and anxiety/depression. EQ-5D reflects the current general health status.

To complete the evaluation of the impact of pruritus, *specific scales of sleep impairment or psychiatric comorbidities* (anxiety, depression) can be used.

4. Les prurits dermatologiques

Le prurit est le principal signe fonctionnel des pathologies dermatologiques et est un motif fréquent de consultation. Les caractéristiques et la prise en charge des prurits dermatologiques ont fait l'objet d'un article dans la revue « Réalités thérapeutiques en dermato-vénérologie » en 2019.

Le dossier – Prurits

Prurits dermatologiques

RÉSUMÉ : Le prurit est un motif fréquent de consultation en dermatologie. Il est associé à la plupart des dermatoses. Le diagnostic étiologique est facile lorsque le prurit est associé à des signes cutanés spécifiques. Il est plus difficile lorsque le prurit est isolé ou seulement accompagné de lésions de grattage.

La prise en charge thérapeutique est basée sur le traitement de la dermatose sous-jacente associé à l'application d'émollient.

Dans les années futures, l'amélioration des connaissances de la physiopathologie complexe du prurit va permettre d'enrichir l'arsenal thérapeutique.



F. HUET^{1, 2}

¹ Service de Dermatologie, CHRU de BREST.

² Laboratoire Interactions Épithéliums Neurones, LIEN, Université de BREST.

Le prurit est défini comme "une sensation désagréable conduisant au besoin de se gratter". Il est le symptôme fonctionnel le plus fréquent en dermatologie et par conséquent un motif fréquent de consultation. Le prurit est retrouvé chez 54 % des patients de dermatologie [1]. Sa prévalence dans la population générale est de 8,4 % pour le prurit aigu et de 13,5 % pour le prurit chronique [1, 2].

Les causes dermatologiques de prurit sont fréquentes et nombreuses. Le prurit fait partie intégrante de certaines dermatoses (dermatite atopique ou gale) et peut être présent de manière variable dans certaines autres (lupus, pityriasis lichénoïde...).

En pratique, 2 cas de figure se présentent en consultation :

– dans le premier, le patient consulte avec des lésions cutanées associées à des démangeaisons ;

– dans le second, le prurit est le motif de consultation. Dans cette situation, le dermatologue caractérise le prurit pour orienter sa démarche diagnostique puis effectue un examen du tégument à la recherche d'une dermatose sous-jacente. En l'absence de signe dermatologique, le prurit peut être le premier symptôme d'une pathologie dont les lésions cutanées surviennent secondairement.

Dans cet article nous abordons les prurits dermatologiques qui sont classiquement classés en 2 groupes : les formes généralisées et les formes localisées.

Démarches diagnostiques

1. Sémiologie

L'interrogatoire est la pierre angulaire de l'examen clinique pour le diagnostic étiologique du prurit. Il permet tout d'abord d'éliminer facilement les diagnostics différentiels que sont les paresthésies et dysesthésies. Les caractéristiques sémiologiques et le retentissement du prurit sont également définis et orientent dans une grande partie des cas le diagnostic (**tableau I**). L'intensité du prurit est parfois difficile à évaluer, l'aide d'une grille d'évaluation peut être utile (échelle de visualisation analogique ou échelle 5-D *itch*) [3]. Certains éléments orientent l'étiologie (prurit familial pour une gale) mais d'autres sont à interpréter avec prudence comme le caractère diurne (la plupart des prurits sont majorés le soir).

Il existe "différents types de prurit" selon la pathologie sous-jacente. Ces différences ne sont pas encore élucidées mais pourraient être liées aux différents médiateurs et voies de signalisation

Le dossier – Prurits

Sémiologie du prurit
Date et mode de début (brutal ou progressif)
Facteurs déclenchants (stress, irritants...)
Évolution (aiguë, paroxystique ou chronique)
Chronologie (heure de la journée, période de l'année)
Intensité (gêne dans le travail, la vie quotidienne, la vie affective ou le sommeil)
Topographie et extension, facteurs aggravants (hypersudation, sport, bains, douches, repas) ou calmants (froid, détente)
Contexte associé (maladies, toxiques)
Liens avec des signes objectifs (avant, pendant ou après signes cutanés)
Existence ou non d'un prurit collectif
Effets des traitements
Retentissement sur la qualité de vie, retentissement psychique et social

Tableau I : Les différentes caractéristiques du prurit à rechercher à l'interrogatoire pour orienter le diagnostic et évaluer le retentissement.

du prurit. Par exemple, le prurit d'une urticaire et d'une dermatite atopique ne sont pas semblables. Lors d'une dermatite atopique le patient va se gratter "jusqu'au sang" alors que dans l'urticaire les lésions de grattage ne seront parfois pas visibles. Dans une étude évaluant les caractéristiques du prurit de patient atteint soit de dermatite atopique, d'eczéma non atopique, de psoriasis, de gale ou d'urticaire, la sudation, les maux de tête et la douleur étaient plus fréquemment associés au prurit de la dermatite atopique que dans les autres maladies [4].

2. Examen dermatologique

L'examen dermatologique permet de mettre en évidence des lésions de grattage : excoriations et stries linéaires, ulcérations, papulo-vésicules, papules excoriées ou croûteuses dans le cadre d'un prurigo. Dans le cadre d'un prurit chronique, une lichénification ou un épaissement cutané traduisent des démangeaisons chroniques, de même qu'un aspect vernissé des ongles est en faveur d'un prurit ancien et intense. Enfin, un impétigo peut compliquer des lésions de grattage comme dans les pédiculoses. À noter que les lésions de grattage peuvent être absentes comme dans l'urticaire.

3. Diagnostic

Les causes dermatologiques sont nombreuses et classées en prurits diffus (**tableau II**) et prurits localisés.

● Prurit diffus

Dans de nombreux cas, l'examen minutieux du tégument retrouve des lésions spécifiques et permet de poser le diagnostic : papules ortiées pour une urticaire, bulles tendues pour une pemphigoïde bulleuse ou plaques de psoriasis, etc.

Certaines situations peuvent poser des difficultés diagnostiques :

– le prurit est parfois le premier signe clinique d'une maladie dermatologique, les lésions dermatologiques spécifiques de la maladie apparaissant secondairement.



Fig. 1 : Image dermoscopique d'un sillon avec sarcophte.

Par exemple, un prurit nu peut être la seule manifestation d'une pemphigoïde bulleuse ou d'un lymphome cutané pendant plusieurs mois ;

– la gale est le piège diagnostique le plus fréquent. Il existe de nombreuses formes atypiques (eczématiformes, érosives...). La visualisation d'un sillon avec un sarcophte (**fig. 1**) en dermoscopie permet de poser avec certitude le diagnostic dans ces cas ;

– les diagnostics différentiels de prurit nu sont les causes systémiques, neurogènes ou psychogènes ;

– l'analyse d'un prurit lors d'une dermatose réputée non prurigineuse est difficile. Le grattage peut survenir lors d'affections comme l'acné, l'impétigo ou les *molluscum contagiosum* ayant pour conséquences une dissémination de l'infection et la formation de cicatrices. S'il existe une eczématisation ou une infection, il peut être difficile de connaître le caractère prurigineux de l'affection ini-

Principales dermatoses prurigineuses	
Dermatite atopique	Dermatoses bulleuses auto-immunes
Eczéma de contact	Épidermolyse bulleuse
Lichen	Dermatoses prurigineuses de la grossesse
Psoriasis	Gale, pédiculose
Urticaire	Prurigo
Mastocytose	Lymphomes
Toxidermie	

Tableau II : Principales causes dermatologiques de prurit généralisé.

Cuir chevelu	Teigne Pédiculose Dermatite séborrhéique Psoriasis Irritation (soins d'hygiène excessifs)
Visage	Dermatite séborrhéique Eczéma Photodermatose Acné
Génital	Lichen scléreux Dermite de contact (vulvite chez la femme) Balanites/vulvites infectieuses Psoriasis génital Tumeur maligne

Tableau III : Prurit localisé selon la région.

tiale ; dans ce cas, il faut mettre en œuvre un traitement symptomatique de l'infection ou de l'eczéma associés.

● Prurit localisé

Un prurit peut être localisé à une région du corps pour plusieurs raisons :

- localisation élective d'une dermatose, au moins au début. Les pièges classiques sont un prurit séquellaire d'un zona ou encore un prurit du cuir chevelu d'une pédiculose ;
- particularités écophysiologiques de la région, en particulierité du visage, du cuir chevelu ou génito-anale (**tableau III**) ;
- anomalies neurologiques.

4. Examens complémentaires

Le plus souvent, les examens complémentaires sont inutiles. Cependant, certains examens orientés par le contexte pourront aider au diagnostic étiologique (biopsie cutanée, prélèvement mycologique, biologie ou immunologie, etc).

■ Pathophysiologie

Jusqu'à maintenant la pathogénie exacte du prurit reste inconnue. Dans les atteintes dermatologiques, la perception du prurit résulte de l'activation de pruricepteurs localisés au niveau des terminaisons nerveuses libres épidermiques ou de la jonction dermo-épidermique.

Au cours du prurit, différents agents cellulaires (kératinocytes, cellules immunitaires ou mastocytes) sont activés et relarguent de nombreux médiateurs du prurit (médiateurs inflammatoires, neuromédiateurs et neuropeptides). Ces médiateurs se lient à leurs récepteurs (pruricepteurs), entraînant une activation des neurones sensoriels spécifiques [5]. Les signaux sont transférés à partir de fibres C mécaniquement insensibles (CMi) pour la voie histaminergique. Ces signaux sont médiés *via* les fibres de type C mécaniquement sensibles (CMH) pour la voie de signalisation non histaminergique à travers le ganglion de la racine dorsale (GRD) de la moelle épinière puis remontent par le tractus spinothalamique jusqu'au thalamus, atteignant finalement le cortex cérébral [6].

L'existence de 2 voies de signalisation distincte et l'implication de nombreux pruricepteurs et médiateurs différents expliquent la variabilité de l'efficacité des différents traitements antiprurigineux [7].

■ Approches thérapeutiques

L'approche thérapeutique du prurit reste un challenge pour le clinicien. La base du traitement repose sur la prise en charge de la dermatose sous-jacente. Cependant, lors de l'enquête étiologique et/ou en attendant l'efficacité du traite-

ment, des soins locaux sont à mettre en place. L'éducation des patients à l'utilisation quotidienne des émoullients hydratants permet de lutter contre la xérose. Il convient également d'éviter les produits d'hygiène agressifs. Des émoullients contenant des substances antiprurigineuses telles que l'urée, le menthoxypropanediol ou le polidocanol peuvent être utilisés en complément [8]. En parallèle de la prise en charge du prurit lui-même, les troubles du sommeil ou la dépression doivent aussi être pris en compte.

Dans les années à venir, plusieurs molécules en cours d'essai (anti-IL31, anti-récepteur de la neurokinine 1) ou venant d'arriver sur le marché (anti-IL4) vont enrichir l'arsenal thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

1. WEISSHAAR E. Epidemiology of Itch. *Curr Probl Dermatol*, 2016;50:5-10.
2. DALGARD F, SVENSSON A, HOLM JO *et al*. Self-reported skin morbidity in Oslo. Associations with sociodemographic factors among adults in a cross-sectional study. *Br J Dermatol*, 2004;151:452-457.
3. REICH A, SZEPETOWSKI JC. Measurement of Itch Intensity. *Curr Probl Dermatol*, 2016;50:29-34.
4. BRENAUT E, GARLANTEZEC R, TALOUR K *et al*. Itch characteristics in five dermatoses: non-atopic eczema, atopic dermatitis, urticaria, psoriasis and scabies. *Acta Derm Venereol*, 2013;93:573-574.
5. SONG J, XIAN D, YANG L *et al*. Pruritus: Progress toward Pathogenesis and Treatment. *BioMed Res Int*, 2018; 2018: 9625936.
6. JOHANEK LM, MEYER RA, FRIEDMAN RM *et al*. A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J Neurosci*, 2008;28:7659-7669.
7. WONG LS, WU T, LEE CH. Inflammatory and Noninflammatory Itch: Implications in Pathophysiology-Directed Treatments. *Int J Mol Sci*, 2017;18.
8. PEREIRA MP, STÄNDER S. Chronic Pruritus: Current and Emerging Treatment Options. *Drugs*, 2017;77:999-1007.

L'auteur a déclaré ne pas avoir de conflits d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

Partie 2 : la dermatite atopique

I. Généralités – Aspects cliniques

La DA est une maladie inflammatoire chronique et récurrente caractérisée par des lésions cutanées érythémateuses et prurigineuses en phase aiguë et des lésions de lichénification en phase chronique (Weidinger & Novak, 2016). Elle est l'une des maladies cutanées les plus courantes et affecte jusqu'à 20 % des enfants et 5 % des adultes (Barbarot et al., 2018; Roduit et al., 2017). La DA est associée à d'autres maladies atopiques comme la rhinite allergique, la conjonctivite ou l'asthme. Les critères diagnostiques de la DA sont fondés sur l'examen clinique et, à l'heure actuelle, il n'existe aucun biomarqueur pathognomonique de laboratoire pour le diagnostic (Hanifin & Rajka, 1980; Williams et al., 1994).

La DA commence dès les premiers mois de vie, généralement vers 3 mois mais parfois plus tôt. L'atteinte est approximativement symétrique et touche les convexités des membres et du visage. Dans la 2^{ème} année, la xérose cutanée est plus constante. Les lésions aiguës sont suintantes puis croûteuses, le plus souvent mal limitées. Le prurit est souvent important et se traduit par des excoriations et des troubles du sommeil. Il peut se manifester par des mouvements type frottement contre les draps, agitation, trémoussement des membres et du tronc (Weidinger & Novak, 2016).

Chez l'enfant (après 2 ans), les lésions sont plus localisées au niveau des plis de flexions (coude, genou et cou) ou au niveau de zones « bastions » (mains, poignets, chevilles et zones sous auriculaire) qui peuvent persister de manière chronique. La xérose est quasiment constante (Weidinger & Novak, 2016).

Chez l'adulte, la DA peut faire suite à une période d'accalmie pendant l'adolescence ou arriver de « novo ». Les formes graves peuvent se manifester par une érythrodermie (atteinte de plus de 90 % du corps pendant plusieurs jours voire semaines). Les aspects sont semblables à ceux décrits pendant l'enfance avec des lichénifications très importantes et un prurit majeur (Weidinger & Novak, 2016).

Les complications cliniques de la DA sont en particuliers infectieuses. Les surinfections herpétiques (« eczema-herpeticum ») peuvent être dramatiques. Les surinfections bactériennes à *staphylococcus aureus* sont fréquentes tout comme des infections à *molluscum contagiosum*.

Dans tous les cas, la DA se caractérise par des lésions cutanées érythémateuses, vésiculeuses associées à un prurit qui peuvent toucher l'ensemble du tégument (Huet et al., 2019). Les critères cliniques de de Hanifin et Rajka ont été simplifiés et validés par l'United-Kingdom Party (Hanifin & RajKa, 1980; Williams et al., 1994) (figure 8).

Critère obligatoire : dermatose prurigineuse ou parents rapportant que l'enfant se gratte ou se frotte.

Associé à trois ou plus des critères suivants :

1. Antécédents personnels de dermatite des plis de flexion (fosses antécubitales, creux poplitée, face antérieure des chevilles, cou) et/ou des joues chez les enfants de moins de 10 ans.
2. Antécédents personnels d'asthme ou de rhume des foins (ou antécédents de maladie atopique chez un parent au premier degré chez l'enfant de moins de 4 ans).
3. Antécédents de peau sèche généralisée au cours de la dernière année.
4. Eczéma des grands plis visible ou eczéma des joues, du front et des convexités des membres chez l'enfant au-dessous de 4 ans.
5. Début des signes cutanés avant l'âge de 2 ans (critère utilisable chez les plus de 4 ans uniquement).

Figure 8 : Critères diagnostiques de la dermatite atopique selon l'United-Kingdom Party.

Une partie des patients étant en échec thérapeutique, la DA peut avoir un impact important sur la qualité de vie des patients, avec un fardeau élevé, surtout dans les formes sévères (Dalgard et al., 2015; Misery et al., 2018) (Chapitre 2-IV Introduction). Par conséquent, il y a un besoin urgent de mieux comprendre la physiopathologie de la DA et de développer de nouvelles thérapies pour prendre en charge ces patients (Huet et al., 2019).

II. Physiopathologie

La DA est une maladie multifactorielle à fort déterminisme génétique (72 % de concordance chez les jumeaux monozygotes, 23 % chez les jumeaux hétérozygotes) mais non héréditaire (Schultz Larsen, 1993). Environ 70 % des patients atteints de DA ont un antécédent familial d'atopie (Wen et al., 2009). Les principaux mécanismes physiopathologiques (figure 9) peuvent être résumés ainsi (Wollenberg et al., 2018) :

(1) une déviation immunitaire vers la voie Th2 dans la phase d'initiation avec pour conséquence une augmentation de la production d'immunoglobuline E (IgE),

(2) un défaut de la fonction « barrière cutanée » due à une anomalie du métabolisme lipidique et/ou à la production des protéines de la différenciation épidermique,

(3) une colonisation microbienne anormale par des organismes pathogènes (e.g. *Staphylococcus Aureus*),

(4) une inflammation neurogène cutanée.

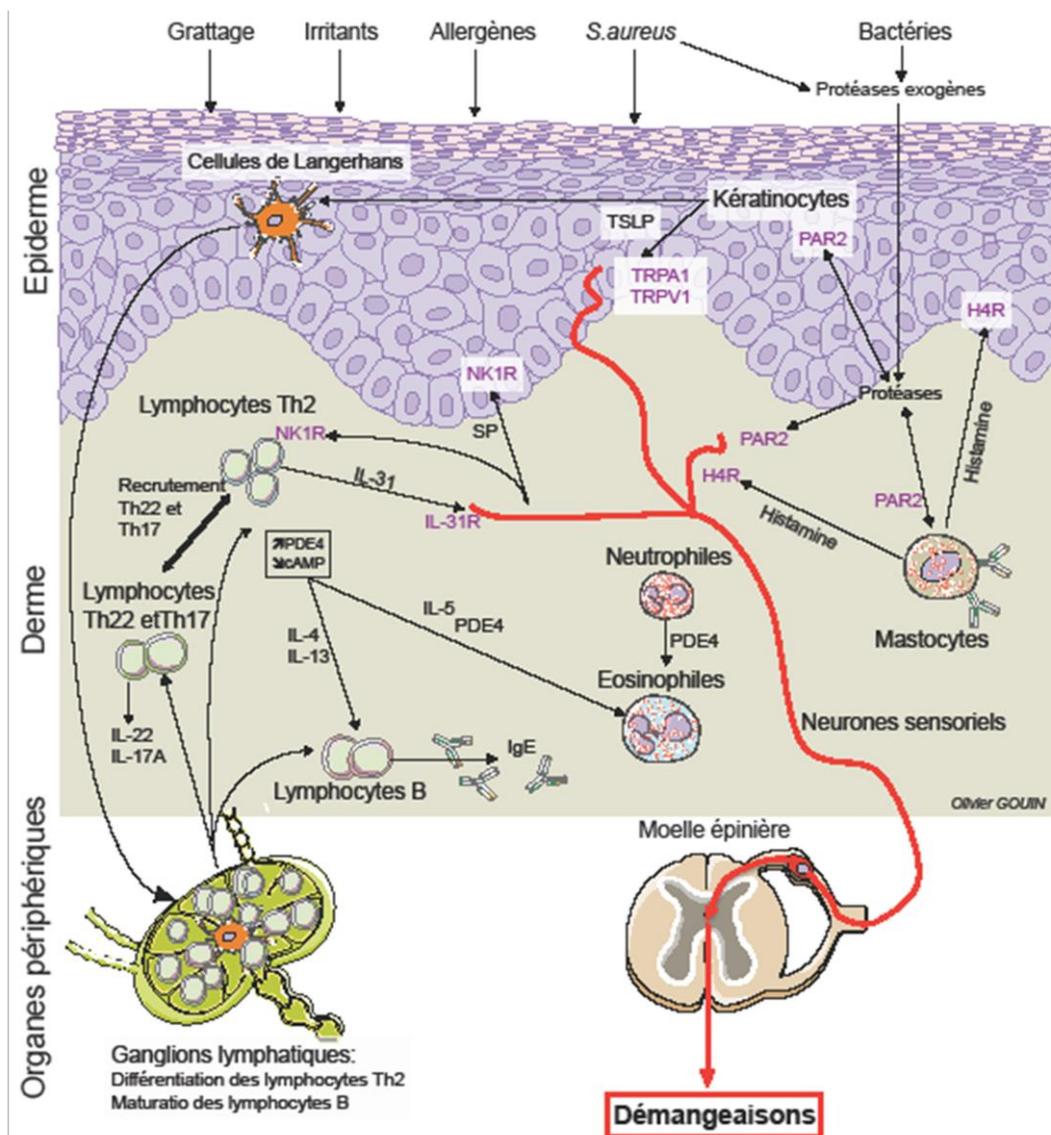


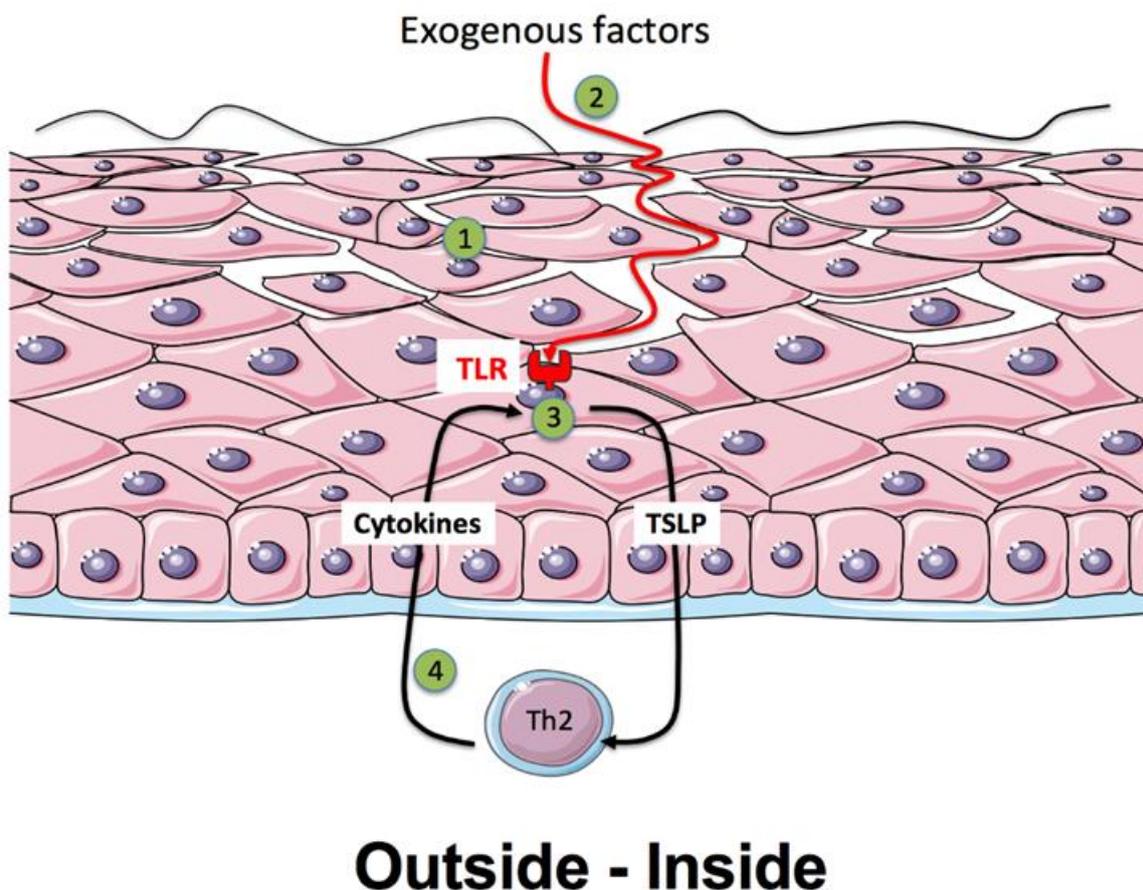
Figure 9 : Schéma résumant les principaux mécanismes physiopathologiques de la dermatite atopique. La DA se caractérise par une inflammation cutanée, principalement via la voie Th2 avec sécrétions des interleukines (IL)-4 et IL-13. Sur le plan immunitaire, les lymphocytes Th22 et Th17 sont également recrutés. De nombreux médiateurs rentrent en jeu avec à la fois une production d'immunoglobuline E (IgE), de thymic stromal lymphopoietin (TSLP) mais aussi de substance P (SP) et de l'IL-31. Que ce soit la TSLP via le TSLPR, l'IL-31 via l'hétérodimère IL-31R/OSMR β ou la SP via le NK-1R, récepteurs tous présents sur les terminaisons nerveuses cutanées, ces molécules vont être responsable de l'induction du prurit. Une autre voie de signalisation du prurit implique la voie du PAR2 (protease activated receptor 2). Les démangeaisons vont engendrer un grattage qui va entraîner des lésions cutanées et induire une rupture de la barrière cutanée permettant aux allergènes de pénétrer la barrière cutanée et activer une inflammation cutanée. Le microbiote est aussi modifié avec une surreprésentation du *Staphylococcus Aureus*.

Bien que la physiopathologie de la DA ne soit pas complètement comprise, de nombreuses études ont démontré que le dysfonctionnement de la barrière cutanée et le dérèglement immunitaire sont les 2 principaux éléments (Brunner et al., 2018; Kim & Leung, 2012; Lowe et al., 2018).

Le dysfonctionnement de la barrière cutanée a été considéré comme la première étape dans le développement de la marche atopique qui désigne une évolution assez stéréotypée des patients atopiques (Dharmage et al., 2014) :

- 1) Apparition de la DA au cours du premier semestre de vie,
- 2) Puis de l'asthme entre 2 et 4 ans,
- 3) Et d'une rhino-conjonctivite.

La filaggrine, la loricrine, l'involucrine, les transglutaminases ou les kératines sont des protéines clés responsables de la fonction épidermique. Une mutation du gène codant pour la filaggrine est présente chez environ 30 % des patients ayant une DA (Palmer et al., 2006). La présence de cette mutation augmenterait par 3 le risque d'avoir une DA. A noter que la mutation de la filaggrine est présente chez environ 10 % de la population. Les défauts de ces protéines facilitent la pénétration des allergènes et des pathogènes microbiens dans la peau. Cette augmentation de la perméabilité cutanée active l'inflammation cutanée et le système immunitaire, en particulier la voie Th2 (hypothèse « outside-inside ») (Jakasa et al., 2011; Taïeb, 1999) (figure 10).



Outside - Inside

Figure 10 : Schématisation de l'hypothèse « outside-inside » de la dermatite atopique.

(1) Défaut de l'épiderme avec altération des protéines de la différenciation épidermique (filaggrine, loricrine, involucrine et kératine 10) et altération de la composition des lipides. (2) Cette altération entraîne une augmentation de la pénétration de facteurs exogènes. (3) Les facteurs exogènes stimulent les kératinocytes (en particulier par les TLR) entraînant la sécrétion de TSLP et l'activation des cellules dendritiques. (4) Cette activation induit une inflammation cutanée avec stimulation des cytokines Th2.

Toutefois, il est également évident aujourd'hui que la dysrégulation immunitaire, en particulier l'activation de la voie Th2, entraîne une altération des réponses immunitaires et une altération de la barrière épidermique (figure 11).

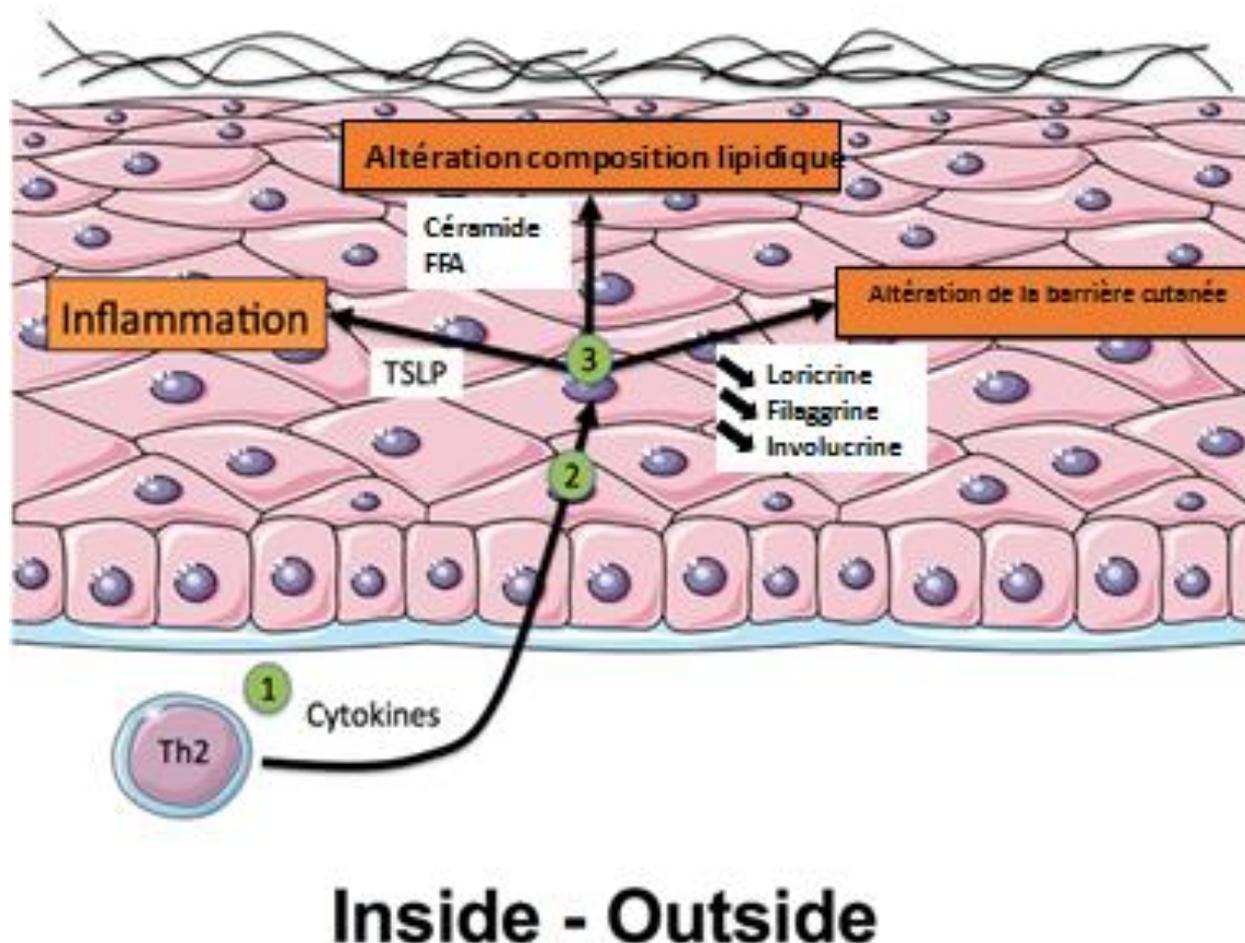


Figure 11 : Schématisation de l'hypothèse « inside-outside » de la dermatite atopique.

(1) L'environnement pro-inflammatoire est lié à une production de cytokines Th2 par les cellules immunitaires. (2) Les cytokines Th2 agissent sur l'épiderme et en particulier sur les kératinocytes. (3) Cette interaction entraîne la sécrétion de TSLP par les kératinocytes, un défaut de l'épiderme avec une altération de l'organisation et de la composition des lipides, et une altération de la différenciation des protéines de la différenciation épidermique.

L'interaction entre les facteurs environnementaux et l'altération de la barrière cutanée entraîne une hyperactivation de l'immunité innée avec la sécrétion par les kératinocytes et les cellules présentatrices d'antigènes de cytokines telles que la TSLP, l'IL-25 et l'IL-33 (Kezic et al., 2012; Oyoshi et al., 2010). Ces cytokines favorisent l'orientation des lymphocytes Th-naïfs vers le phénotype Th2 et la sécrétion de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 et IL-31) (Soumelis et al., 2002). Il est intéressant de noter que la peau non lésionnelle des patients atteints de DA présente également des signes d'inflammation de faible degré avec la présence de Th2, Th22 et, à un niveau inférieur, d'infiltration de cellules Th17 et de cytokines pro-inflammatoires (Eller et al., 2009; Suárez-Fariñas et al., 2011). En phase chronique, l'infiltration cellulaire est composée à la fois de cellules Th2 et Th1 avec moins de Th22 et Th17 que dans les lésions aiguës (Weidinger & Novak, 2016). Il a été démontré que l'axe de signalisation « Janus kinase/signal transducer and activator of transcription » (JAK/STAT) joue un rôle essentiel dans la dysrégulation des réponses immunitaires dans la DA, impliquant l'amplification de la réponse des cellules Th2 et la suppression des cellules T régulatrices (Pesu et al., 2008; Shreberk-Hassidim et al., 2017). En outre, la voie JAK/STAT, lorsqu'elle est activée par l'IL-4, l'IL-13, l'IL-31 et la TSLP, joue un rôle important dans la pathogénie de la DA en régulant à la hausse l'expression des chimiokines dérivées de l'épiderme et d'une cascade de cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'en régulant à la baisse les protéines structurelles de l'épiderme (Bao et al., 2013).

La réponse inflammatoire Th2 aggravera à son tour les défauts de la barrière épidermique et contribuera à l'augmentation du prurit, le grattage altérant davantage la barrière épidermique et stimulant l'immunité innée, réalisant un cercle vicieux : le cycle grattage-démangeaison (Huet et al., 2018; Murota & Katayama, 2017).

Dans le même temps, l'interface peau-nerfs est altérée et provoque une expression accrue de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. Divers neurotransmetteurs, en particulier

la SP, et les facteurs de croissance neuronaux libérés par les terminaisons nerveuses dans le sang ou la peau sont impliqués dans l'inflammation neurogène, ce qui renforce et maintient l'inflammation induite par les cellules immunitaires (Choi & Di Nardo, 2018).

Récemment, de nouvelles perspectives sur la pathophysiologie du développement de la DA, axées sur un rôle important des anomalies des lipides de l'épiderme ainsi que les interactions neuro-immunes et le rôle du microbiote ont été évoqués (Danso et al., 2014; Janssens et al., 2012; Weidinger & Novak, 2016).

III. Le prurit de la dermatite atopique

1. Caractéristiques, prévalence du prurit de la dermatite atopique et impact sur la qualité de vie

Le prurit est un symptôme majeur de la DA et constitue l'un des principaux critères de diagnostic, de Hanifin & Rajka et de l'United-Kingdom Working Party (Hanifin & Rajka, 1980; Williams et al., 1994). Les patients atteints de DA souffrent pour la quasi-totalité de prurit (de 87 % à 100 %) (Dawn et al., 2009). Le prurit dans la DA est grave, persistant et en corrélation avec la gravité de la maladie comme nous l'avons montré dans une étude qui avait pour but de caractériser le prurit selon la sévérité de la DA (Huet et al., 2019).

Characteristics of Pruritus in Relation to Self-assessed Severity of Atopic Dermatitis

Flavien HUET^{1,2*}, Marie-Sarah FAFFA^{1*}, Florence POIZEAU^{3,4}, Stéphanie MERHAND⁵, Laurent MISERY^{1,2} and Emilie BRENAUT^{1,2}
¹Department of Dermatology, University Hospital, ²Laboratory on Interactions Neurons-Keratinocytes (LINK), University of Western Brittany, Brest, ³Rennes University, UPRES EA 7449 REPERES Pharmacoepidemiology and Health Services Research, ⁴Department of Dermatology, University Hospital, Rennes, and ⁵French Association of Eczema, Redon, France
 *These authors contributed equally to this work.

The objective of this study was to explore characteristics of pruritus in atopic dermatitis (AD) in relation to the severity of AD. A web-questionnaire was used, which included the Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis index, the 5-D itch scale and the Brest questionnaire. A total of 170 participants were included (86.5% women, mean age 30.9 years). Severity of AD was mild for 8.2% of patients, moderate for 38.2% and severe for 53.5%. Mean 5-D itch scale was 13.2. The mean intensity of pruritus was 5.8, and mean sleep loss was 4.7 (from 0 to 10). The participants frequently described burning (61.8%) and stinging (58.8%); these symptoms suggest a neuropathic component. Pruritus was worse in severe AD compared with moderate AD, exhibiting a higher impact on sleep and more associated symptoms. The majority of participants reported sleep disturbance as a result of pruritus. The characteristics of pruritus varied depending on the severity of AD.

Key words: atopic dermatitis; pruritus; questionnaire; itch; web questionnaire; PO-SCORAD; 5-D itch scale.

Accepted Sep 27, 2018; Epub ahead of print xx

Acta Derm Venereol 2018; XX: XX-XX.

Corr: Emilie Brenaut, Department of Dermatology, University Hospital, FR-29609 Brest, France. E-mail: emilie.brenaut@chu-brest.fr

Pruritus is defined as an unpleasant sensation that provokes the desire to scratch (1, 2). It is a frequent symptom in many skin diseases, as well in systemic diseases (3, 4). Pruritus is a primary symptom of atopic dermatitis (AD) and constitutes one of the major diagnostic criteria, according to Hanifin & Rajka's (5) and the UK Working Party's diagnostic criteria for AD (6). AD is a common, chronic, pruritic, relapsing inflammatory skin condition, which is an increasingly important public health problem worldwide, with a prevalence of 10–30% in children and 2–10% in adults (7). In France, the prevalence of AD is estimated at 3.6–4.7% in adults (8, 9). The condition has a high burden, with serious psycho-social impact and impaired quality of life (10–12). However, only a few studies have explored the characteristics of pruritus in AD (4, 11, 13–15), and none have analysed the correlation of pruritus with severity of AD. The aim of the current study was to characterize pruritus in relation

SIGNIFICANCE

Pruritus is a frequent symptom in atopic dermatitis and it has a major impact on quality of life. Only a small number of studies have explored the characteristics of pruritus in atopic dermatitis. The aim of our study was to characterize pruritus while considering the severity of atopic dermatitis, thanks to a web-questionnaire. One hundred and seventy participants were included. The mean intensity of pruritus was 5.8, and the mean sleep loss was 4.7 (from 0 to 10). The participants frequently described burning (61.8%) and stinging (58.8%). In severe atopic dermatitis compared to moderate atopic dermatitis, pruritus was more severe, exhibiting a higher impact on sleep and more associated symptoms.

to the severity of AD, using Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis (PO-SCORAD).

PATIENTS AND METHODS

A web questionnaire on pruritus in AD was available on the website of the French Association of Eczema (*Association Française de l'Eczéma*) between January 2015 and March 2016. This association was established in 2011 for patients with AD or contact eczema and provides information and advice regarding these diseases via its website and social networks.

The initial questions were related to age, sex and eczema type (atopic dermatitis, contact eczema or other). The severity of AD was evaluated using the validated self-assessed AD severity score: the PO-SCORAD index. The PO-SCORAD, established in 2011 by Stalder et al. (16), measures the severity of AD during the previous 3 days and integrates objective and subjective symptoms with the help of an illustrated tutorial (16). The score ranges from 0 to 103, with a higher score indicating a more severe disease. The evaluation of severity of AD by PO-SCORAD is divided into several parts: surface area of skin affected by eczema, objective symptoms from 0 (non-existent) to 3 (severe): dryness of the skin without eczema and redness, swelling, oozing/crust, scratching, and thickening of the skin affected by eczema, and a visual analogue scale from 0 (absence) to 10 (very important) to evaluate pruritus and sleep loss. In the next section, participants responded to the Brest questionnaire, which has been used in previous studies of different diseases, such as small-fibre neuropathies, neurofibromatosis 1 or systemic sclerosis (13, 17–19). Participants were asked about the duration, chronology, and intensity of pruritus in AD. The intensity of pruritus was assessed with a visual analogue scale from 0 to 10 (i.e. at its worst, best, average, and at the time of the study). Participants were asked about symptoms associated with pruritus: sweating, headaches, pain, heat and cold in the region

of the pruritus. The following symptoms were evaluated from 0 (non-existent) to 3 (severe): stinging, tickling, crawling, stabbing, pinching, heat sensation, biting and stinging. Participants were asked whether they scratched, how pleasurable it was, and whether pain alleviated the pruritus. Finally, participants completed the validated 5-D itch scale. This multidimensional score, from 5 (no pruritus) to 25 (most severe pruritus), was developed by Elman et al. in 2009 (20) and contained 5 domains (duration, degree, direction, disability, and distribution).

Statistical analysis was performed using RStudio Version 1.0.136 (RStudio, Inc., Boston, MA, USA). Descriptive statistics for quantitative variables were presented as the means and standard deviation (SD) and as percentages for qualitative variables. To compare the 3 groups (mild, moderate and severe AD), Kruskal-Wallis test was used to compare means, and a Fisher's exact test was used to compare frequencies. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Among the members of the French Eczema Association, 202 completed the questionnaire. Finally, 32 participants were excluded: 13 subjects were too young (<14 years) to understand the questionnaire because it was not adapted for children, and 19 subjects reported another diagnosis (psoriasis, contact eczema, dyshidrosis). A total of 170 participants were included. Demographic data are presented in Table I.

PO-SCORAD

Characteristics of PO-SCORAD are presented in Table I. The following objective symptoms affected the participants from an extreme to a moderate intensity: scratching for 68.8%, redness for 65.9%, skin dryness for 63.5%, thickening for 61.8%, oozing/crust for 24.7% and swelling for 20.0%. Over the most recent 3 days, the mean intensity of pruritus was 5.8, and the mean sleep loss was 4.7 on a visual analogue scale ranging from 0 to 10.

Table I. Demographic data

	Participants from the French Eczema Association n = 170
Sex, n (%)	
Female	147 (86.5)
Male	23 (13.5)
Age, years, mean \pm SD	30.9 \pm 10.8
Median (range)	28 (14-71)
Age groups, n (%)	
<18 years	2 (1.2)
18-24 years	43 (25.3)
25-34 years	83 (48.8)
35-44 years	23 (13.5)
45-54 years	9 (5.3)
≥ 55 years	10 (5.9)
PO-SCORAD	
Mean \pm SD	50.8 \pm 17.9
Median (range)	51.3 (2.4-93.6)
Severity, n (%)	
Mild <25	14 (8.2)
Moderate 25-50	65 (38.2)
Severe >50	91 (53.5)
5-D Itch scale	
Mean \pm SD	13.2 \pm 3.4

SD: standard deviation; PO-SCORAD: Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis.

www.medicaljournals.se/acta

Duration and chronology

Most participants (81.8%) had had pruritus for years, 9.4% for months, 3.5% for weeks and 5.3% for days. For 62.3% of participants, pruritus was intermittent; in the remaining participants, pruritus was continuous.

The presence of pruritus at different times of day is shown in Fig. 1. Pruritus was reported to occur "always or often" in the morning by 51.8% of subjects, in the afternoon by 52.9% of participants, in the evening by 78.8% of participants and at night by 69.4% of participants.

During the 2 weeks before completing the questionnaire, 73 participants (42.9%) had had pruritus for less than 6 h a day, 18.2% between 6 and 12 h a day, 18.2% between 12 and 18 h a day, 11.9% between 18 and 23 h a day, and 8.8% all day.

Intensity of pruritus in atopic dermatitis

The intensity of pruritus was assessed with a visual analogue scale ranging from 0 to 10. At the time of the study, the mean intensity was 3.9; at its worst, the intensity was 8.8; at its best, the intensity was 1.7; and mean intensity was 4.9. During the 2 weeks preceding the study, participants were asked to evaluate the intensity of the pruritus from none to unbearable. It was unbearable for 12.9% of participants, severe for 30.6%, moderate for 45.3%, mild for 10.0% and not present for 1.2%.

Location

In the PO-SCORAD, the most frequently involved areas were head (64.1%), neck (54.1%), inside the elbow (58.2%), forearms (53.8%), and popliteal fossa (49.1%). The pruritus was described as symmetrical for 64.1% of participants.

On the 5-D itch scale, pruritus was present in 0-2 zones of the body in 7.1% of subjects, 3-5 zones in 9.4%, 6-10 zones in 28.8%, 11-13 zones in 12.9% and 14-16 zones in 41.8%.

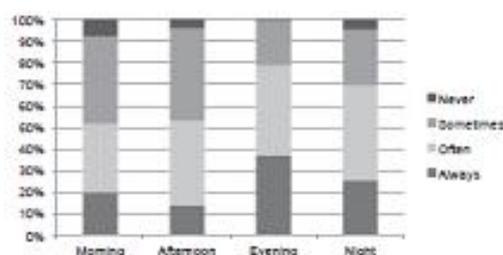


Fig. 1. Presence of pruritus at different times of day reported by the participants (n = 170).

Symptoms associated with pruritus

Heat sensation (83.5% of subjects) and pain (54.1%) were the most frequently reported associated symptoms. Sweating was reported by 34.1% of the participants, whereas headaches and cold sensation were rarely described (<5%). Associated symptoms are reported in Fig. 2. Each sensory symptom was assessed by the subject from 0 (absence) to 3 (intense). Symptoms that were reported more frequently (evaluated as moderate or intense) were burning (61.8%) and stinging (58.8%).

Exacerbating/alleviating factors of pruritus are shown in Fig. 3. A total of 86 participants (50.6%) responded that pain relieved pruritus. Pruritus impaired sleep, as shown in Fig. 4.

Scratching

For the question: "Do you scratch?", 54.1% of participants answered "very often", 39.4% "often", 5.9% "rarely", and 0.6% "never". Scratching was described as very pleasurable by 34.1% of participants, moderately pleasurable by 36.5%, neutral by 7.6%, moderately unpleasant by 7.1% and very unpleasant by 14.7%.

Pruritus according to the severity of atopic dermatitis

Patients were classified into 3 groups according to their PO-SCORAD score: slight AD (<25), moderate AD

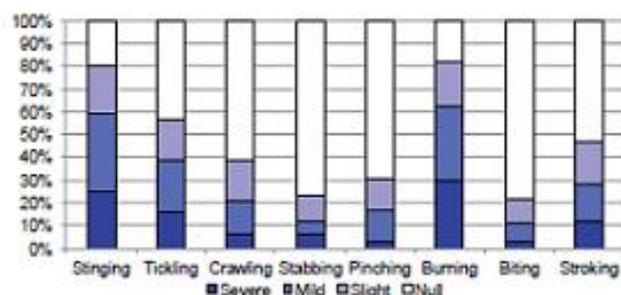


Fig. 2. Associated symptoms in patients with atopic dermatitis.

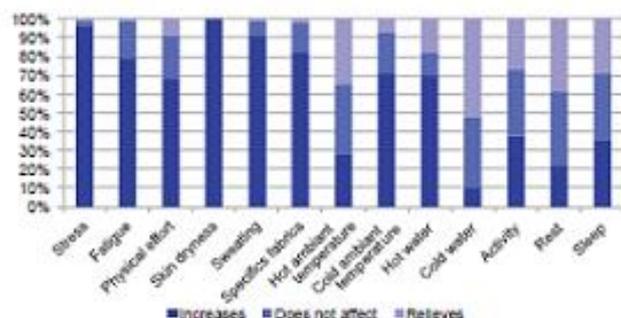


Fig. 3. Exacerbating and alleviating factors of pruritus in patients with atopic dermatitis.

Characteristics of pruritus in atopic dermatitis

3

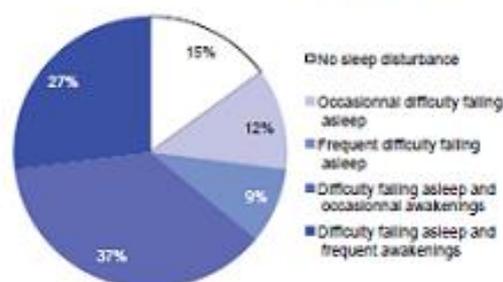


Fig. 4. Effect of pruritus on sleep in patients with atopic dermatitis.

(25–50) and severe AD (>50). The characteristics of the 3 groups are shown in Table II; only moderate and severe AD were compared.

DISCUSSION

Pruritus is a major symptom of AD, but no qualitative assessment of its characteristics according to severity has been published to date. In the current study, pruritus of AD was severe, with frequently associated sensations and frequent scratching. Yosipovitch et al. was the first to describe pruritus in AD using a qualitative approach (11); several other studies have thereafter also been published (4, 13–15). A previous study used a web-questionnaire to analyse itch characteristics in AD (21). Some characteristics were similar to those previously described in studies about pruritus in AD: aggravation in the evening, factors exacerbating pruritus as dryness, sweating, and physical effort (14).

In the current study, pruritus tended to appear more frequently in the evening and at night. These tendencies have been well described in AD (11, 14, 15) and in other dermatoses (17, 22). To date, the underlying mechanisms responsible for nocturnal pruritus are not well-understood, but could be related to the circadian rhythm of various mediators as well as skin temperature and barrier function (15, 23) or to the absence of distracting tasks for patients. Exacerbation of pruritus in the evening and at night might cause under-evaluation of the pruritus intensity by physicians. By interfering with sleep, pruritus greatly impaired quality of life (24, 25). This study supports previous reports concerning the major exacerbating factors of pruritus in AD: skin dryness, stress, sweating, specific fabrics, fatigue, hot ambient temperature, hot water, and physical effort (11, 13). These characteristics are also described in other diseases (17, 22). The simplest intervention that should be recommended first to treat the itch

Table II. Comparison according to the severity of atopic dermatitis

	Slight (n = 14)	Moderate (n = 65)	Severe (n = 91)	p-value ^a
Sex, women, n (%)	11 (78.6)	58 (89.2)	78 (85.7)	0.48
Age, years, mean ± SD	26.6 ± 8.6	29.9 ± 9.2	32.3 ± 11.9	0.11
PO-SCORAD, mean ± SD				
Score (0–103)	18.5 ± 5.8	39.1 ± 6.9	64.1 ± 11.1	<0.001
Pruritus intensity VAS (0–10)	1.9 ± 1.9	4.3 ± 2.5	7.4 ± 1.9	<0.001
Sleep loss (0–10)	1.5 ± 1.5	3.1 ± 2.7	6.3 ± 2.8	<0.001
Associated symptoms, mean ± SD (0–4)				
Stinging	1.1 ± 1.0	1.4 ± 1.0	1.9 ± 1.1	<0.001
Tickling	0.5 ± 0.8	0.8 ± 0.9	1.5 ± 1.2	<0.001
Crawling	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.9	0.8 ± 1.1	0.11
Stabbing	0.2 ± 0.8	0.2 ± 0.6	0.6 ± 1.0	0.003
Pinching	0.4 ± 0.8	0.5 ± 0.9	0.6 ± 0.9	0.30
Burning	1.0 ± 1.0	1.5 ± 1.0	2.0 ± 1.0	<0.001
Biting	0.2 ± 0.6	0.3 ± 0.6	0.4 ± 0.9	0.57
Stroking	0.5 ± 0.9	0.7 ± 1.0	1.1 ± 1.1	0.03
Pruritus intensity VAS, mean ± SD				
At the time of the study	1.4 ± 1.0	3.0 ± 2.1	5.0 ± 2.6	<0.001
At its worst	7.8 ± 2.2	8.5 ± 1.9	9.2 ± 1.4	0.002
At its best	0.2 ± 0.4	1.0 ± 1.4	2.4 ± 2.2	<0.001
On average	2.4 ± 1.0	4.2 ± 1.6	5.8 ± 1.8	<0.001
Pruritus always or often according to the moment of the day, n (%)				
At evening	7 (50.0)	49 (75.4)	78 (85.7)	0.004
At night	6 (42.9)	36 (55.4)	76 (83.5)	<0.001
5-D itch scale, mean ± SD	9.5 ± 2.5	11.9 ± 2.8	14.8 ± 2.9	<0.001
Scratching, n (%)				
Very often	3 (21.4)	27 (41.5)	62 (68.1)	
Often	7 (50.0)	31 (47.7)	29 (31.9)	
Rarely	3 (21.4)	7 (10.8)	0 (0.0)	
Never	1 (7.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Sleep disturbance ^b , n (%)	11 (78.6)	46 (70.8)	88 (96.7)	<0.001

^ap-value when comparing slight, moderate and severe AD. ^bAll answers except "Never affects sleep".
SD: standard deviation; PO-SCORAD: Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis; VAS: visual analogue scale.

associated with AD is avoidance of these exacerbating factors (26). Alleviating factors are cold water and rest, as highlighted in previous studies (11, 13, 14).

Although scratching may ultimately aggravate itching in AD, 93% of participants admitted to scratching often or very often; the majority of participants perceived scratching as pleasurable. The majority of participants answered that pain relieved pruritus (4, 13). Itch and pain have many similarities; specifically, scratching relieves itching by activating nociceptors and pain inhibits itching (15). In AD, these similarities could lead to a vicious itch-scratch cycle, in which scratch damage enhances itching (15).

We used the validated 5-D itch scale to explore pruritus in AD. This scale is a multidimensional, reliable and replicable measure of itching that may allow further comparisons. Elman et al. (20) first established the 5-D itch scale in 2009 and evaluated itching in different pruritic diseases. In AD, the 5-D itch scale score was higher than in other diseases, such as skin carcinoma (27), neurofibromatosis 1 (18), and systemic sclerosis (19).

To our knowledge, this study is the first to perform a qualitative analysis of pruritus according to the severity of AD using PO-SCORAD. A majority of participants had a severe form of AD with a PO-SCORAD >50. We chose to compare only moderate and severe AD because the group of mild AD included only 14 patients. The mean PO-SCORAD was 50.8, which was higher compared with other studies: 39.32 in Stalder's study (16),

46.0 in Chrostowska's study (28) and 41 in Darsow's study (29). Moreover, those who have severe AD may be more inclined to help research by completing a questionnaire. In severe compared with moderate AD, pruritus was significantly more intense, with a higher negative impact on sleep and more frequently associated symptoms, including stinging, tickling, stabbing, burning, stroking, and increased scratching. Interestingly, the correlation between the severity of the disease and the intensity of pruritus is less obvious in some diseases, such as psoriasis (30).

The results of the current study showed that stinging, burning and pain sensations were very frequent, suggesting a nociceptive component to the pruritus (31). A recent study highlighted in 305 patients with AD that skin pain is a common and burdensome symptom in AD (32–34). The underlying cause of this phenomenon could be because of direct skin nerve damage secondary to scratching. Stumpf & Ständer (35) reported similar phenomena in post-burn and post-surgery scars. In severe forms, some medications, such as gabapentin or pregabalin, could be used to alleviate the pruritus. These medications are structural analogues to gamma-aminobutyric acid and are used in severe pruritus in several diseases (36).

Among factors influencing AD pruritus, it is important to note that it is relieved by cold ambient temperature and cold water. This observation is supported by another study in which a cold water bath was the method that was most used to relieve pruritus in patients with AD (11). One of the hypotheses to explain the effect of cold in AD pruritus is the role of TRP member-8 (TRPM-8) or Cold and Menthol receptors (CMR) (37).

The main limitation of this study was that patients could not be examined by a physician to confirm the diagnosis and severity. Moreover, patients with no access to the internet and who are unfamiliar with the French Association of Eczema could not participate, thus creating a selection bias. Patients who are members of the French Association of Eczema are not representative of the patients with AD because they most likely have moderate or severe AD compared with mild AD. Moreover, our population was not representative because the majority of the study population was women (86.4%). In a recent study, Barbarot et al. (8) described a feminine predominance (54.5%) of AD and a prevalence of AD in France estimated at 3.6%. Possible explanations are that women have more involvement in health associations than men and that women completed web surveys more often than men.

This study confirms that pruritus is severe in AD. Sensory symptoms (burning, stinging, tickling, crawling) are frequent, suggesting a neuropathic component to pruritus in AD. In patients with severe AD, pruritus is more severe, with a higher impact on sleep and more associated symptoms compared with moderate AD.

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Ständer S, Weisshear E, Mattang T, Szepietowski JC, Carstens E, Ikoma A, et al. Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Derm Venereol* 2007; 87: 291–294.
2. Misery L, Ständer S. Pruritus. Springer, London, 2017.
3. Olak-Hreb K. Pruritus in selected dermatoses. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20: 3628–3641.
4. O'Neill JL, Chan Y, Rapp SR, Yosipovitch G. Differences in itch characteristics among psoriasis and atopic dermatitis patients: results of a web-based questionnaire. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 537–540.
5. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1980; Suppl. 92: 44–47.
6. Williams HC, Burney PGJ, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Ahunter JJ, et al. The U.K. Working Party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. 1. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1994; 131: 383–396.
7. The World Allergy Organization (WAO). The World Allergy Organization (WAO) White Book on Allergy 2013 Update. <http://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WhiteBook2-2013-v8.pdf>
8. Barbarot S, Auziere S, Gedkeri A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: results from an international survey. *Allergy* 2018; 73: 1284–1293.
9. Richard MA, Corgibet F, Beylot-Berry M, Berbaud A, Bodemer C, Chaussade V, et al. Sex- and age-adjusted prevalence estimates of five chronic inflammatory skin diseases in France: results of the "OBJECTIFS PEAU" study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018 Mar 23. [Epub ahead of print].
10. Diaris-Hircha J, Milch WE, Kupfer J, Lawake F, Gieler U. Atopic dermatitis, attachment and partnership: a psychodermatological case-control study of adult patients. *Acta Derm Venereol* 2012; 92: 462–466.
11. Yosipovitch G, Goon AT, Wee J, Chan YH, Zucker I, Goh CL. Itch characteristics in Chinese patients with atopic dermatitis using a new questionnaire for the assessment of pruritus. *Int J Dermatol* 2002; 41: 212–216.
12. Misery L, Seneschel J, Reguiei Z, Merhand S, Héas S, Huet F, et al. Patient burden is associated with alterations in quality of life in adult patients with atopic dermatitis: results from the ECLA study. *Acta Derm Venereol* 2018; 98: 713–714.
13. Brenaut E, Garlantzac R, Telour K, Misery L. Itch characteristics in five dermatoses: non-atopic eczema, atopic dermatitis, urticaria, psoriasis and scabies. *Acta Derm Venereol* 2013; 93: 573–574.
14. Chrostowska-Plak D, Salomon J, Reich A, Szepietowski JC. Clinical aspects of itch in adult atopic dermatitis patients. *Acta Derm Venereol* 2009; 89: 379–383.
15. Murota H, Katayama I. Exacerbating factors of itch in atopic dermatitis. *Allergol Int* 2017; 66: 8–13.
16. Stalder JF, Barbarot S, Wollenberg A, Holm EA, De Raevé L, Seidenari S, et al. Patient-Oriented SCORAD (PO-SCORAD): a new self-assessment scale in atopic dermatitis validated in Europe. *Allergy* 2011; 66: 1114–1121.
17. Brenaut E, Marcoralles P, Genestet S, Ménard D, Misery L. Pruritus: an underrecognized symptom of small-fiber neuropathias. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72: 328–332.
18. Brenaut E, Nizery-Guermeur C, Audibert-Bellanger S, Ferrel S, Wolkenstein P, Misery L. Clinical characteristics of pruritus in neurofibromatosis 1. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 398–399.
19. Thérain C, Brenaut E, Sonbol H, Pasquier E, Sereau A, Devauchelle V, et al. Itch and systemic sclerosis: frequency, clinical characteristics and consequences. *Br J Dermatol* 2017; 176: 1392–1393.
20. Elman S, Hynan LS, Gabriel V, Mayo MJ. The 5-D itch scale: a new measure of pruritus. *Br J Dermatol* 2010; 162: 587–593.
21. Dawn A, Popoiu AD, Chan Rapp SR, Razzetta N, Yosipovitch G. Itch characteristics in atopic dermatitis: results of a web-based questionnaire. *Br J Dermatol* 2009; 160: 642–644.
22. Yosipovitch G, Zucker I, Boner G, Geftar U, Shapira Y, David M. A questionnaire for the assessment of pruritus: validation in uramic patients. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 108–111.
23. Lavery MJ, Stull C, Kinney MO, Yosipovitch G. Nocturnal pruritus: the battle for a peaceful night's sleep. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 425.
24. Jeon C, Yan D, Nakamura M, Sakhon S, Bhutani T, Berger T, et al. Frequency and management of sleep disturbance in adults with atopic dermatitis: a systematic review. *Dermatol Ther* 2017; 7: 349–364.
25. Silberberg JI, Garg NK, Paller AS, Fishbein AB, Zee PC. Sleep disturbances in adults with eczema are associated with impaired overall health: a US population-based study. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 56–66.
26. Yarbrough KB, Neuhaus KJ, Simpson EL. The effects of treatment on itch in atopic dermatitis. *Dermatol Ther* 2013; 26: 110–119.
27. Poulaliou A, Lagoupi D, Schoenleub P, Herault M, Fonclere AL, Poulaliou M, et al. Itch and pain characteristics in skin carcinomas. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 697–698.
28. Chrostowska-Plak D, Reich A, Szepietowski JC. Relationship between itch and psychological status of patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27: e239–e242.
29. Darsow U, Scharain E, Simon D, Walter G, Bromm B, Ring J. New aspects of itch physiopathology: component analysis of atopic using the "Eppendorf Itch Questionnaire". *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 326–331.
30. Szepietowski JC, Reich A. Pruritus in psoriasis: an update. *Eur J Pain* 2016; 20: 41–46.
31. Misery L, Brenaut E, Le Garrac R, Abasq C, Genestet S, Marcoralles P, et al. Neuropathic pruritus. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 400–416.
32. Vekheria PP, Chopra R, Secotte R, Petal KR, Singem V, Petal N, et al. Burden of skin pain in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017; 119: 548–552.
33. Rosen JD, Fostini AC, Chan YH, Nattkemper LA, Yosipovitch G. A cross-sectional study of clinical distinctions between neuropathic and inflammatory pruritus. *J Am Acad Dermatol* 2018 Jun 1 [Epub ahead of print].
34. Andersen HH, Akiyama T, Nattkemper LA, van Laerhoven A, Elberling J, Yosipovitch G, et al. Allodynia and hyperknesis-mechanisms, assessment methodology, and clinical implications of itch sensitization. *Pain* 2018; 159: 1185–1197.
35. Stumpf A, Stander S. Neuropathic itch: diagnostic and management. *Dermatol Ther* 2013; 26: 104–109.
36. Wong L-S, Wu T, Lee C-H. Inflammatory and noninflammatory itch: implications in pathophysiology-directed treatments. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1485.
37. McKemy DD. TRPM8: The Cold and Menthol Receptor. In: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007.

La DA est une dermatose dont le fardeau et l'impact sur la qualité de vie sont élevés (Drucker et al., 2017). Elle a un impact profondément négatif sur la vie des personnes touchées mais également leur famille (Marciniak et al., 2017). Dans une étude récente, les résultats ont révélé de nombreux effets sur l'activité professionnelle des patients, en particulier les absences au travail, notamment leur nombre et leur durée (Eckert et al., 2017). Il est à noter que de nombreux patients pensent à la maladie sur leur lieu de travail, et ces pensées peuvent avoir des effets négatifs sur la productivité (Misery et al., 2018). Dans une autre étude, un impact sur la sexualité a été fortement associé aux démangeaisons, à la dépression, à l'anxiété et même aux idées suicidaires (Misery et al., 2019). Concernant le fardeau, concept récent qui inclut des aspects plus larges (par rapport à la qualité de vie) du handicap lié à la maladie, tels que les facteurs psychologiques, physiques, sociaux et économiques, celui de la DA est associé à une altération de la qualité de vie des patients (Chren & Weinstock, 2004; Salzes et al., 2016). De manière plus spécifique, le prurit impacte fortement le sommeil et la qualité de vie des patients, ce qui entraîne un taux plus élevé d'anxiété, de dépression et d'idées suicidaires (Drucker et al., 2017).

Bien que la douleur soit fréquemment signalée par les patients atteints de DA, elle a été peu étudiée. Dans enquête sur un large échantillon représentatif de la population française que nous avons effectué, la douleur était présente chez plus de la moitié des patients avec une intensité de 6/10 (Huet et al., 2020). Il convient de la rechercher et la traiter chez les patients atteints de DA.

La DA par ses lésions cutanées visibles, le prurit mais aussi la douleur engendrée, entraîne une souffrance physique mais également psychique que nous avons décrite dans l'article suivant : « retentissement psychique de la dermatite atopique ».

Revue générale

Retentissement psychique de la dermatite atopique

RÉSUMÉ: La dermatite atopique (DA), par les lésions cutanées visibles, le prurit mais aussi la douleur, entraîne une souffrance physique mais également psychique. Le retentissement psychique n'est pas nécessairement lié à l'étendue et à la sévérité des lésions.

Le rôle du stress dans les poussées de la DA est mis en évidence depuis de nombreuses années et souvent décrit par les patients eux-mêmes. Le stress va activer le système neuro-endocrino-immuno-cutané et engendrer une inflammation neurogène au niveau cutané. Un cercle vicieux stress-DA-stress s'installe et augmente le risque d'anxiété, de dépression ou de risque suicidaire.

Une prise en charge spécifique, adaptée à chaque individu, peut être nécessaire, soit par l'utilisation de psychotropes, soit par des thérapies cognitivo-comportementales afin de permettre au patient de gérer son stress.



F. HUET^{1,2}, L. MISERY^{1,2}

¹ Service de Dermatologie, CHRU, BREST.

² Laboratoire Interactions Epithéliums Neurons, LIEN, Université de BREST.

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire chronique avec un fort retentissement physique, social mais également psychique. La DA résulte de mécanismes multifactoriels complexes impliquant des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux [1]. Ces dernières années, les avancées sur la DA connaissent un véritable "boom". Les anomalies de la barrière cutanée sont mieux définies, que ce soit sur le plan lipidique ou protéique, en particulier le rôle de la filaggrine dont le gène est muté chez certains patients. L'aspect immunologique est mieux compris, en particulier l'importance de la voie Th2.

Malgré ces nouvelles avancées, la physiopathologie de la DA reste complexe et de nombreux travaux en cours vont permettre d'approfondir nos connaissances. Ces nouveaux éléments attestent des différents types d'anomalies dans la DA, anomalies plus ou moins prépondérantes chez chaque patient. En parallèle, le rôle et l'impact du stress dans la DA entraînent le patient dans un cercle

vicieux. Le stress provoque ou aggrave la DA qui, elle-même, est un stress pour le patient. Le retentissement psychique et le vécu de la maladie impactent la vie du patient et le dermatologue devrait occuper une place majeure dans l'accompagnement des patients, la détection de leur stress et leur souffrance psychique [2].

Relation entre peau et stress : le système neuro-endocrino-immuno-cutané

Chaque individu est confronté quotidiennement à de multiples stress, qu'ils soient aigus ou chroniques, physiques ou psychiques. Pour lutter contre le stress auquel est soumis notre organisme, de nombreux phénomènes d'adaptation se mettent en place. La peau, visible à nos propres yeux et à ceux de gens qui nous entourent, traduit cette adaptation comme le montrent plusieurs adages : "être rouge de honte", "être jaune de jalousie", "être vert de rage" ou "être mal dans sa peau".

Revue générale

Le stress active le système endocrinien et le système nerveux pour permettre à l'organisme de s'adapter. L'axe hypothalamo-hypophysaire et le système nerveux sympathique sont activés [3]. L'hypothalamus sécrète de la CRH (*Corticotropin-releasing hormone*) qui active l'antéhypophyse et libère à son tour de l'ACTH (*Adrenocorticotrophic hormone*) qui, à son tour, entraîne le relargage de glucocorticoïdes par la corticosurrénale. Dans le même temps, le système nerveux sympathique entraîne la production de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par la médullo-surrénale.

De manière assez récente, l'équivalent d'un axe hypothalamo-hypophysaire intracutané a été décrit et s'organise de manière similaire à l'axe central [4]. En réponse au stress, les fibres nerveuses cutanées périphériques relarguent de nombreux neuromédiateurs comme la *substance P* (SP) ou la *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), leur croissance étant augmentée par des facteurs tels que le *nerve growth factor* (NGF). Ces neuropeptides créent une inflammation neurogène, en particulier via le mastocyte, qui se traduit par une perméabilité vasculaire et une activation des cellules immunitaires qui amplifient l'inflammation. Cette inflammation neurogène provoque un état pro-inflammatoire dans la peau saine ou malade, en particulier dans les dermatoses inflammatoires comme la DA [5].

Les fibres nerveuses cutanées ont un rôle afférent en transmettant les informations au système nerveux central mais également un rôle efférent en relargant des neuropeptides. Elles agissent activement dans le système neuro-endocrino-immuno-cutané [5]. La peau est donc particulièrement sensible au stress. Les voies du stress ont des conséquences importantes sur l'homéostasie de la peau, en particulier les fonctions immunes, la barrière cutanée, la cicatrisation ou la susceptibilité aux infections. Sur le plan immunitaire, le stress aigu

et le stress chronique agissent différemment. Le stress aigu, via les glucocorticoïdes et les catécholamines, va booster le système immunitaire et orienter vers une réponse Th1. À l'opposé, le stress chronique entraîne un *switch* de la voie Th1 vers la voie Th2 [6]. L'inflammation périphérique a des effets "feedback" sur le cerveau. Via les cytokines, l'inflammation et les cellules immunitaires retentissent sur le psychisme, comme par exemple l'interféron α sur la dépression.

Tous ces éléments permettent de mieux comprendre le lien entre stress-dermatose inflammatoire-retentissement psychique et s'appliquent particulièrement à la DA.

Stress et DA

Un stress physique ou psychologique est souvent incriminé par les patients dans les poussées de DA. Lors du tremblement de terre à Hanshin au Japon en 1995, la détresse subjective des patients atteints de DA (1 457 patients inclus) était le premier facteur responsable d'exacerbation des signes cutanés [7]. Une étude prospective menée sur 80 enfants, non pas dans la DA mais dans l'asthme dont les mécanismes physiopathologiques sont proches, a étudié l'effet des événements de vie stressants sur les crises d'asthme [8]. Les événements de vie négatifs, sans contexte de stress chronique, augmentaient significativement le risque de crises d'asthme. Cependant, ces crises ne survenaient pas dans les 2 premières semaines suivant le stress, mais dans les 4 semaines suivantes.

En cas de stress chronique, le stress aigu provoquait une exacerbation de l'asthme dans les 15 premiers jours. En 2001, dans une étude menée sur 240 personnes âgées de 2 à 67 ans souffrant d'une DA, le stress était le principal facteur déclenchant dans environ 6 % des cas et était un facteur aggravant dans 45 % des cas [9]. Les résultats d'une cohorte coréenne portant sur 2 504 nouveau-nés suggèrent

que la détresse maternelle prénatale, évaluée par des questionnaires mesurant la dépression et l'anxiété, était associée à un risque plus élevé de DA chez les descendants (facteur 1,3 en cas de dépression et 1,41 en cas d'anxiété). En outre, les scores plus élevés de détresse maternelle ont directement augmenté la probabilité prédite de développement d'une DA [10]. Les auteurs expliquent ces résultats par une exposition chronique des fœtus aux corticoïdes et au stress oxydatif.

Le stress est un facteur démontré des poussées de DA comme les infections, les irritants ou l'exposition aux allergènes. La susceptibilité de chaque individu au stress est variable et impossible à prévoir. Peu d'études se sont intéressées aux différences de l'impact du stress dans la DA intrinsèque versus extrinsèque. Une corrélation a été mise en évidence entre taux d'IgE et anxiété. De manière intéressante, une étude sur la DA intrinsèque retrouve un niveau d'anxiété significativement plus élevé chez les patients que chez les sujets sains [11]. Il a été suggéré que le polymorphisme génique des récepteurs β_2 -adrénergiques peut conduire à une sensibilité augmentée au stress dans les DA intrinsèques [12].

Retentissement psychique de la DA

La DA, par son atteinte cutanée et le prurit associé, altère la qualité de vie et peut induire des troubles psychiques, voire psychiatriques, chez le patient mais aussi son entourage. Une peau abîmée, en particulier au niveau du visage ou des mains, peut entraîner une stigmatisation, un rejet social, une anxiété ou une dépression. En outre, la DA s'accompagne d'un prurit (les patients se grattent en moyenne 2 h par jour) et de douleurs (chez 47 % des patients) [13]. Les conséquences sur la vie affective, relationnelle, sexuelle, professionnelle ou encore le sommeil sont importantes sans pour autant être toujours intégrées dans la prise en charge thérapeutique.

Plusieurs études illustrent les troubles psychiatriques engendrés par la DA, en particulier la dépression, l'anxiété et le plus haut risque de suicide [14,15], mais il est important d'insister sur le fait que la dépression et l'augmentation du risque de suicide ne sont pas corrélées à la gravité de la maladie [16]. De même, une étude de 2010 ne retrouve pas de corrélation entre la sévérité des manifestations psychologiques du stress et l'étendue de l'atteinte cutanée (*Eczema Area Score*) ou la sévérité de la maladie (*Severity Index Score*). Pourtant, chacun de ces paramètres est corrélé avec la qualité de vie [17].

Il n'y a pas d'association documentée entre la DA et un profil de personnalité. Quelques études récentes ont essayé de dégager un profil particulier des patients atteints de DA mais les résultats sont contradictoires [18, 19].

La famille est aussi impactée, avec un niveau de stress plus important chez les mères d'enfant atteint de DA, plus particulièrement les mères célibataires [20].

Nous avons vu que le stress peut favoriser la survenue de la DA, et la DA peut être vécue comme un stress, engendrant un cercle vicieux. Prendre en charge les symptômes de la DA diminue le retentissement psychique et permet une "normalisation de son apparence physique" par rapport aux standards de la société.

Les symptômes psychiatriques au cours de la DA doivent être pris en charge en tant qu'entité propre et ne pas être simplement associés à la prise en charge dermatologique. Ainsi, il est primordial pour les dermatologues d'apprendre à aller au-delà de l'étiquetage de diagnostique et d'essayer d'évaluer la nature de la souffrance dans chaque cas. Même chez les patients présentant une forme légère de DA, le fardeau psycho-social de la maladie peut être lourd [21]. Le diagnostic d'une composante psychiatrique sous-jacente chez un patient implique plusieurs facteurs. Tout d'abord, le méde-

POINTS FORTS

- Le stress entraîne une activation du système neuro-endocrino-immuno-cutané avec la production de catécholamines et de glucocorticoïdes. En réponse, les fibres nerveuses cutanées relarguent des neuropeptides créant une inflammation neurogène cutanée.
- Le stress est l'un des facteurs aggravants de la dermatite atopique (et même parfois déclencheur de poussées), avec de grandes variations interindividuelles.
- Le retentissement psychique de la DA n'est pas corrélé avec la sévérité de la maladie telle qu'un médecin pourrait l'évaluer.
- La prise en charge de la DA nécessite une prise en charge des symptômes psychiques (dépression, anxiété, risque suicidaire, trouble du sommeil...) de manière indépendante du traitement des symptômes dermatologiques.

cin doit établir une bonne relation avec le patient. Dans le même temps, il devra évaluer le patient dans sa globalité avec les facteurs de stress physiques et psychosociaux susceptibles d'influer sur son bien-être global. Il devra également évaluer les composantes affectives qui influencent la capacité de fonctionnement du patient. Divers tests psychosociaux ont été décrits pour évaluer au minimum la qualité de vie (par exemple DLQI) [22].

Prise en charge du retentissement psychique de la DA

Le retentissement psychique de la DA sur le patient est souvent sous-évalué par le médecin. Cette approche nécessite un temps d'écoute et doit se faire dans une relation de confiance pour permettre l'adhésion au traitement [23]. Le patient a besoin de se sentir écouté et d'être intégré dans la décision thérapeutique. L'éducation thérapeutique est un des moyens d'apporter cette aide aux patients et à leur famille [24].

Ce temps de consultation fournit des indicateurs du retentissement psycholo-

gique et détermine, s'il existe, un besoin de consultation psychiatrique et l'utilisation de psychotropes. L'utilisation d'anxiolytiques dans un temps limité peut aider le patient. Les antidépresseurs vont agir sur la dépression mais peuvent également diminuer le prurit des patients. Les psychothérapies ont une place dans la prise en charge de certains patients avec des effets bénéfiques sur le prurit et le psychisme. Les thérapies cognitivo-comportementales (relaxation, *biofeedback*) ou d'inspiration psychanalytique ou l'hypnose peuvent aider le patient à mieux s'adapter à son stress.

Chez l'enfant, ces thérapies ont moins leur place. Ainsi, une revue *Cochrane* 2014 conclut à un manque relatif d'essais rigoureusement conçus et fournit des preuves limitées de l'efficacité des interventions éducatives et psychologiques pour aider à gérer l'état d'eczéma atopique chez les enfants [25].

La prise en charge de la DA nécessite une vision holistique de la pathologie avec une attention particulière sur le retentissement psychique qui doit être pris en charge à part entière. Cette prise en charge demeure complexe, les

Revue générale

symptômes restant cachés par certains patients. Le temps d'écoute et la relation de confiance sont en première ligne pour aider nos patients et leur proposer le traitement adapté. L'utilisation de traitements efficaces, bien tolérés et peu contraignants est bien entendu déterminante pour casser le cercle vicieux que nous évoquons dans cet article.

BIBLIOGRAPHIE

1. WEINBERG S, NOVAK N. Atopic dermatitis. *Lancet Lond Engl*, 2016;387:1109-1122.
2. MISERY L. Atopic dermatitis and psychological factors. *Ann Dermatol Venereol*, 2005;132:1S112-115.
3. ELLENKOV IJ, CHIROUSOS GP. Stress system--organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*, 2006;13:257-267.
4. ARCK PC, SLOMINSKI A, THICHARIDES TC et al. Neuroimmunology of stress : skin takes center stage. *J Invest Dermatol*, 2006;126:1697-1704.
5. MISERY L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011;41:259-266.
6. ELLENKOV IJ, CHIROUSOS GP. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/ Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab*, 1999;10:359-368.
7. KIDAMA A, HORIKAWA T, SUZUKI T et al. Effect of stress on atopic dermatitis: investigation in patients after the great hanshin earthquake. *J Allergy Clin Immunol*, 1999;104:173-176.
8. SANDBERG S, PATON JY, AHOLA S et al. The role of acute and chronic stress in asthma attacks in children. *Lancet Lond Engl*, 2000;356:982-987.
9. BINEA V, MURISIAN D, MANELACHE L et al. Stress and Atopic Dermatitis. *Dermatol Psychosom Dermatol Psychosom*, 2001;2:205-207.
10. CHANG HY, SUH DI, YANG S-I et al. Prenatal maternal distress affects atopic dermatitis in offspring mediated by oxidative stress. *J Allergy Clin Immunol*, 2016;138:468-475.e5.
11. YAMAGUCHI H, HATA M, TOSHIHARU F et al. Psychological aspects of patients with intrinsic atopic dermatitis. *Eur J Dermatol EJD*, 2014;24:253-254.
12. ROKUODAS A-M, AUDREIZET M-P, SCITET V et al. Intrinsic atopic dermatitis is associated with a beta-2 adrenergic receptor polymorphism. *Acta Derm Venereol*, 2006;86:447-448.
13. MISERY L, SAINT AHOMAN M, ZEKI A et al. Chronic Pain in Patients with Skin Disorders. *Acta Derm Venereol*, 2017;97:986-988.
14. ECKERT L, GUPTA S, AMAND C et al. Impact of atopic dermatitis on health-related quality of life and productivity in adults in the United States: An analysis using the National Health and Wellness Survey. *J Am Acad Dermatol*, 2017;77:274-279.e3.
15. DREES-HINZIK J, GIELER U, KUPFER JP et al. Suicidal ideation, anxiety and depression in adult patients with atopic dermatitis. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb*, 2009;60:641-646.
16. GUPTA MA, GUPTA AK. Psychiatric and psychological co-morbidity in patients with dermatologic disorders: epidemiology and management. *Am J Clin Dermatol*, 2003;4:833-842.
17. OH SH, BAE BG, PARK CO et al. Association of stress with symptoms of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 2010;90:582-588.
18. LOPES C, PINTO L, LEITE C et al. Personality Traits May Influence the Severity of Atopic Dermatitis in Adult Patients: A Pilot Study. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2016;26:198-199.
19. SCHUT C, BOEBACH S, GIELER U et al. Personality traits, depression and itch in patients with atopic dermatitis in an experimental setting: a regression analysis. *Acta Derm Venereol*, 2014;94:20-25.
20. GIELER U, SCHOOF S, GIELER T et al. Atopic Eczema and Stress among Single Parents and Families: An Empirical Study of 96 Mothers. *Acta Derm Venereol*, 2017;97:42-46.
21. ELLIS CN, MANGINI AJ, PALLER AS et al. Understanding and managing atopic dermatitis in adult patients. *Semin Cutan Med Surg*, 2012;31:S18-S22.
22. SENRA MS, WOLLENBERG A. Psychodermatological aspects of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 2014;170 Suppl 1:38-43.
23. MISERY L. The role of dermatologist in adherence to treatment. *Ann Dermatol Venereol*, 2012;139 Suppl 1:S18-S21.
24. BARBAROT S, STALDER JF. Therapeutic patient education in atopic eczema. *Br J Dermatol*, 2014;170 Suppl 1:44-48.
25. ERSER SJ, COWDRELL F, LATTER S et al. Psychological and educational interventions for atopic eczema in children. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014;1:CD004054.

Les auteurs ont déclaré ne pas avoir de conflits d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

2. Physiopathologie du prurit de la dermatite atopique

Aujourd'hui, il existe une recherche très dynamique sur la physiopathologie et le traitement de la DA, en particulier en ce qui concerne la démangeaison. De nombreux pruritogènes et leurs récepteurs spécifiques sont impliqués dans les voies de prurit chez les patients atteints de DA (Mollanazar et al., 2015) (tableau 4). Parmi les médiateurs, le rôle de l'histamine est probablement limité, comme l'indique l'inefficacité des traitements anti-histaminiques. Une étude récente comparant 25 patients atteints de DA et 25 témoins n'a pas trouvé de différence dans l'intensité des démangeaisons provoquées par l'histamine. De plus, le prurit dans la DA est médié par des fibres C non-histaminergiques (Andersen et al., 2017). En outre, PAR2 exprimé par les kératinocytes et les terminaisons nerveuses libres cutanées est impliqué dans la voie du prurit de la DA (Lee et al., 2010). Récemment, calcium release-activated calcium channel protein (Orai 1), un canal qui sert de médiateur pour l'influx de Ca^{2+} stocké nécessaire à l'expression des cytokines « nuclear factor of activated T »-cells (NFAT)-dépendantes, s'est révélé être un régulateur essentiel de la TSLP (Wilson et al., 2011). Cette étude soutient que la TSLP joue un rôle clé dans la DA puisque l'activation des kératinocytes provoque libération de TSLP qui se lie à son récepteur, à savoir la TSLPR située sur les fibres nerveuses. Les fibres nerveuses activées libèrent des neuropeptides tels que le CGRP et la SP qui activent à leur tour les kératinocytes via leurs récepteurs spécifiques, entraînant une boucle d'activation ; ceci soutient le fait qu'il existe une communication forte entre les kératinocytes et les fibres nerveuses cutanées.

L'IL-31 est un autre élément de recherche sur le prurit atopique. Une étude récente a montré que l'IL-31 est produite par les cellules Th2 et qu'elle est surexprimée dans la peau et le sérum des patients atteints de DA (Otsuka et al., 2011). Ainsi, l'IL-31 induit directement des démangeaisons *via* son récepteur (un hétérodimère composé de 2 sous-unités, l'IL-31RA et l'OSMR β) qui est exprimé sur les kératinocytes et les fibres nerveuses (Sonkoly et

al., 2006). Dans une méta-analyse publiée en 2018, les résultats montraient que les taux sériques d'IL-31 étaient plus élevés chez les patients atteints de DA sévère que chez ceux atteints de DA modérée. De plus, la gravité du prurit chez les patients atteints de DA et les taux sériques d'IL-31 étaient positivement corrélés (Lu et al., 2018).

Les facteurs environnementaux et la pollution jouent également un rôle et font l'objet de recherches. Une équipe japonaise a montré comment divers composants organiques de polluants activent le récepteur d'hydrocarbure aryle (AhR) dans les kératinocytes et stimulent l'artémine, un membre de la famille des neurotrophiques. Dans leur modèle murin, cliniquement et histologiquement proche de la DA, l'artémine était responsable de l'hyperinnervation épidermique qui conduit à une hypersensibilité au prurit (Hidaka et al., 2017). Ainsi, l'artémine s'accumulerait dans le derme supérieur de la peau lésionnelle chez les patients atteints de DA (Kim et al., 2014).

De récentes études de neuro-imagerie suggèrent que les mécanismes de modulation centrale jouent un rôle important dans la démangeaison chronique de la DA. Les patients atteints de DA ont un modèle d'activation plus diffus que les sujets sains (Mochizuki et al., 2017).

En outre, l'hyperinnervation épidermique décrite dans la DA est peut-être en partie responsable de la sensibilisation aux démangeaisons, bien qu'une nouvelle étude remette en question cette affirmation (Tan et al., 2018; Tominaga & Takamori, 2014).

Tableau 4 : Principaux pruritogènes et leurs récepteurs dans la dermatite atopique

Pruritogène	Récepteur
Histamine	Histamine receptors (H1R, H4R)
Kallikreins (KLK-5), tryptase, protease	PAR2, PAR4
Bradykinin	Bradykinin receptors
Serotonin, 5-HT	5-HT receptor
Endothelin-1	Endothelin receptors (ETA)
IL-31	IL-31 receptor A
TSLP	TSLP receptor
Substance P	Neurikinin-1 receptor (NK-1R)
PAF	PAF receptor
Electrophiles, oxidants, pro-inflammatory agents	TRPA1
12-HPETE	TRPV1
Artemin	AhR
IL-2	IL-2 receptor
GRP	GRP receptor
β -endorphin	μ opioid receptor
Acetylcholine	Acetylcholine receptor
CGRP	CGRP receptor
CXCL10	CXCR3 chemokine receptor
NGF	TrkA
BAM8-22	Mgrpr
GRP	GRPR

PAR, protease activated receptor; HT, hydroxytryptamine; IL, interleukine; TSLP, thymic stromal lymphopoeitin; PAF, platelet activating factor; HPETE, hydroxyperoxyeicosatetraenoic; AhR, Aryl Hydrocarbon Receptor ; GRP, gastrin releasing peptide ; NGF, nerve growth factor ; TrKA, tropomyoin receptor kinase A ; Mgrpr, Mas-related G protein ; CGRP, calcitonin gene-related peptide

IV. Traitements de la dermatite atopique

La DA est un cercle vicieux entre :

- L'inflammation stimulant le prurit qui à son tour entraîne des lésions de grattage responsables d'une altération de la barrière cutanée
- L'altération de la barrière épidermique qui entraîne une activation de l'inflammation cutanée *via* la voie Th2.

La prise en charge thérapeutique vise à stopper l'inflammation et restaurer la barrière cutanée. A côté des traitements dits conventionnels, de nouveaux traitements avec une activité plus ciblée sont en cours d'étude.

Le traitement actuel de la DA et les recommandations de prise en charge ainsi que les traitements topiques et systémiques à venir ont fait l'objet d'une publication dans les Annales de Dermatologie cette année (Huet et al., 2020).



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



THÉRAPEUTIQUE

Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique

New treatments and therapeutic perspectives in atopic dermatitis

F. Huet^{a,*,b}, O. Gouin^{c,d}, L. Misery^{a,b}

^a Service de dermatologie, CHRU de Brest, avenue Foch, 29200 Brest, France

^b LIEN, université Brest, 29200 Brest, France

^c Laboratory of genetic skin diseases, Inserm UMR 1163, Imagine Institute, 75015 Paris, France

^d Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

Reçu le 24 septembre 2019 ; accepté le 10 janvier 2020

Abréviations

AhR	récepteur aryl-hydrocarbure
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
DA	dermatite atopique
EASI	« Eczema Area and Severity Score »
GREAT	« Groupe de Recherche sur l'Eczéma ATopique »
IGA	« Investigator Global Assessment »
IL	Interleukine
JAK	Janus kinase
NK1-R	récepteur des neurokinines de type 1
OX40L	ligand du récepteur OX40
PDE4	phosphodiestérase-4
SCORAD	« Signal transducer and activator of transcription proteins »
SP	substance P
Th	« T helper »
TLR	« toll-like receptor »
TRP	« transient receptor potential »

TSLP	lymphopoïétine thymique stromale
TYK	tyrosine kinase

Introduction

La dermatite atopique (DA) est une dermatose inflammatoire prurigineuse chronique qui débute classiquement dès la petite enfance, mais peut se révéler à l'âge adulte [1]. Elle est l'une des maladies cutanées les plus courantes et affecte jusqu'à 20 % des enfants et 5 % des adultes [2,3]. La DA est souvent associée à d'autres maladies atopiques comme la rhinite, la conjonctivite ou l'asthme. Les critères diagnostiques de la DA sont fondés sur l'examen clinique et, à l'heure actuelle, il n'existe aucun biomarqueur de laboratoire pathognomonique pour le diagnostic [4,5]. Dans tous les cas, la DA se caractérise par des lésions cutanées érythémateuses et vésiculeuses associées à un prurit, qui peuvent toucher l'ensemble du tégument [6,7]. La DA peut avoir un impact important sur la qualité de vie des patients, avec un fardeau élevé, surtout dans les formes sévères [8–10], une partie des patients étant en échec thérapeutique avec les traitements conventionnels. Par conséquent, il y a un besoin urgent de mieux comprendre la physiopathologie de

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : flav.h@hotmail.fr, flavien.huet@chu-brest.fr (F. Huet).

<https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

0151-9638/© 2020 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Pour citer cet article : Huet F, et al. Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. *Ann Dermatol Venerol* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

la DA et de développer de nouvelles thérapies pour prendre en charge ces patients[3].

Physiopathologie

La DA est une maladie multifactorielle à fort déterminisme génétique (72 % de concordance chez les jumeaux monozygotes, 23 % chez les jumeaux hétérozygotes), mais non héréditaire [11]. Les principaux mécanismes physiopathologiques (Fig. 1) peuvent être résumés ainsi [12] :

- une déviation immunitaire vers la voie « T helper 2 » (Th2) dans la phase d'initiation avec pour conséquence une augmentation de la production d'IgE ;
- un défaut de la fonction « barrière cutanée » due à une anomalie du métabolisme lipidique et/ou à la production des protéines de la différenciation épidermique ;
- une colonisation microbienne anormale par des organismes pathogènes (e.g. *Staphylococcus aureus*) ;
- une inflammation neurogène.

Actuellement, la recherche sur la pathophysiologie et les traitements de la DA est très dynamique [13]. Parmi les protéines impliquées dans le maintien de l'activité de la barrière épidermique, la filaggrine est la plus étudiée. Les variations génétiques et la perte de variantes fonctionnelles au sein du gène *FLG* ont été mises en évidence comme un facteur de risque majeur de la DA [14,15]. Les protéines ne sont pas les seules composantes de la barrière puisque les lipides, principalement les céramides, les acides gras libres et le cholestérol constituent la matrice lipidique [16]. Dans la DA, la matrice lipidique est désorganisée et induit une altération de la barrière épidermique.

La DA est associée à une inflammation caractérisée par une surexpression de molécules pro-inflammatoires telles que les cytokines Th2 (interleukines IL-4, IL-5 et IL-13), l'IL-22 et la lymphopoïétine thymique stromale (TSLP) [1]. La peau non lésionnelle des patients atteints de DA présente également des signes d'inflammation modérée avec la présence de cellules Th2 et Th22 [6]. L'IL-31 et l'IL-33 sont également liées à la pathogenèse de la DA [17,18]. Dans la phase aiguë de la DA, les défauts de la barrière cutanée permettent la pénétration des antigènes et conduisent à la production de TSLP par les kératinocytes. Dans la phase chronique, l'activation continue et l'augmentation de la concentration de Th2 et Th22 dans la barrière épidermique accélère l'inflammation locale, entraînant un cercle vicieux [19]. La sécrétion de TSLP par les kératinocytes est induite par la sensibilisation d'antigènes, de cytokines Th2 ou l'activation de voies de récepteurs de type « toll-like receptor » (TLR) [20–22]. La TSLP active les cellules dendritiques et favorise la transformation de lymphocytes naïfs en lymphocytes de phénotype Th2 et la sécrétion de cytokines Th2 [23]. Via son récepteur spécifique, la TSLP stimule directement les terminaisons nerveuses sensorielles cutanées activant spécifiquement une des voies de signalisation du prurit [20]. La voie « Janus kinase/signal transducer and activator of transcription proteins » (JAK/STAT) joue également un rôle critique dans la DA par la dérégulation des réponses immunitaires, impliquant l'amplification de la réponse des cellules Th2, l'induction des éosinophiles et la suppression des cellules T régulatrices [24]. La voie

JAK/STAT, lorsqu'elle est activée par IL-4, IL-13 et la TSLP, joue un rôle important dans la pathogenèse de la DA. En effet, elle entraîne une augmentation de l'expression des chémokines d'origine épidermique et une cascade de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines épidermiques, comme la filaggrine, l'involucrine ou la loricrine, altérant ainsi la fonction de barrière de l'épiderme [25].

Les facteurs environnementaux et la pollution jouent également un rôle sensibilisateur pouvant conduire à une aggravation de la DA. Une équipe japonaise a montré comment divers composants organiques de polluants activent le récepteur aryl-hydrocarbure (AhR) dans les kératinocytes et stimulent l'artémine, un facteur neurotrophique [26]. Dans leur modèle murin, cliniquement et histologiquement proche de la dermatite atopique, l'artémine était responsable d'une hyperinnervation épidermique qui conduisait à une hypersensibilité au prurit. De plus, l'artémine est accumulée dans le derme superficiel des peaux de DA [27].

En raison des associations étroites entre la peau, le système immunitaire et le système nerveux, le rôle des fibres nerveuses dermiques et épidermiques est très important dans la physiopathologie des dermatoses inflammatoires, en particulier dans la DA. De nombreux neurotransmetteurs, en particulier la substance P, et les facteurs de croissance neuronaux libérés par les terminaisons nerveuses dans le sang ou la peau sont impliqués dans l'inflammation neurogène, ce qui augmente et maintient l'inflammation induite par les cellules immunitaires [28]. Selon les techniques, on peut observer une hypo- ou une hyper-innervation. Quel qu'il en soit, les terminaisons nerveuses cutanées sont hyperexcitables au cours de la DA [29,30].

Le prurit est la principale plainte des patients atteints de DA. Heureusement, ses mécanismes sont de mieux en mieux compris [31–33]. Brièvement, le rôle de l'histamine est probablement limité chez l'homme, alors que la TSLP et l'IL-31 sont très impliqués dans le déclenchement du prurit de la DA, sous le contrôle de l'IL-4, l'IL-13 et peut-être de l'IL-33.

Traitement actuel et recommandation de prise en charges

Lorsque le diagnostic de DA est établi, la sévérité globale de la maladie doit être déterminée en évaluant à la fois les signes objectifs et les symptômes subjectifs (prurit, retentissement sur le sommeil), éventuellement à l'aide d'échelles de sévérité. Le score classiquement utilisé est le « Scoring of Atopic Dermatitis » (SCORAD) [34]. Une DA avec un SCORAD supérieur à 50 est considérée comme sévère, tandis que des valeurs inférieures à 25 correspondent à des eczémas peu sévères [35]. En revanche, l'« Eczema Area and Severity Score » (EASI) évalue seulement les lésions visibles, sans prendre en compte les symptômes. L'« Investigator Global Assessment » (IGA) est souvent utilisé dans les études, mais correspond plus à une évaluation globale qu'à un score validé. Contrairement au SCORAD et à l'EASI, il s'agit d'une seule évaluation globale par l'investigateur. Les nouveaux

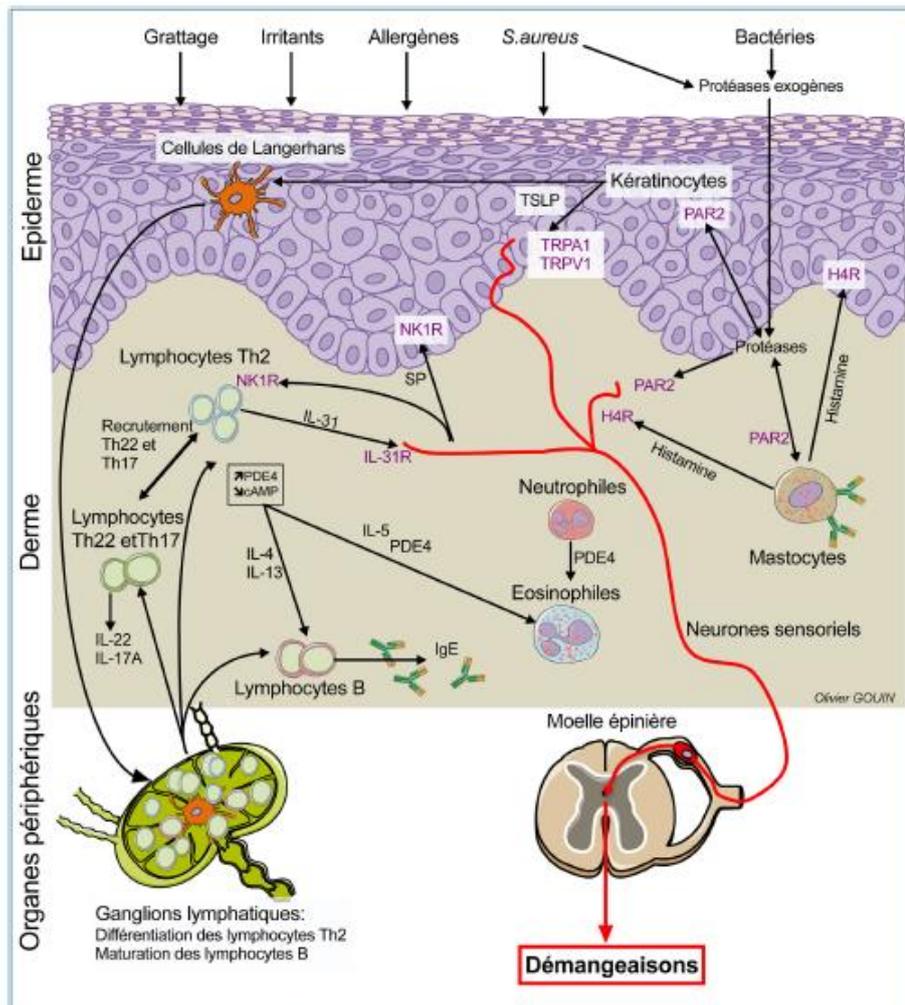


Figure 1. Physiopathologie de la dermatite atopique.

traitements évaluent leur efficacité soit sur ces scores validés, soit sur le prurit ou les 2 (Tableaux 1 et 2).

La prise en charge de la DA doit souvent commencer par la restauration de la barrière cutanée par l'application d'émollients, ainsi que l'évitement des facteurs aggravants. Les émollients peuvent parfois contenir des substances actives [36]. Un traitement anti-inflammatoire topique à base de glucocorticoïdes et d'inhibiteurs de la calcineurine est utilisé pour la gestion des poussées et pour un contrôle à long terme (« traitement proactif »). Les dermocorticoïdes demeurent la base du traitement, tandis que le tacrolimus est préféré dans les régions cutanées sensibles (visage,

plis) et pour une utilisation à long terme [12]. En cas de forme modérée récurrente de DA, une photothérapie UVB ou UVA peut être instaurée. Dans les cas sévères ou persistants d'eczéma, un traitement immunosuppresseur est mis en place [37]. Jusqu'à récemment, seule la ciclosporine avait une AMM dans cette indication. D'autres immunosuppresseurs tels que le méthotrexate, l'azathioprine ou le mycophénolate mofétil étaient utilisés en cas d'échec thérapeutique. Actuellement, le paysage thérapeutique de la DA est en pleine évolution avec l'arrivée de nombreux traitements, dont le dupilumab qui est déjà sur le marché [38].

Pour citer cet article : Huet F, et al. Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. Ann Dermatol Venerol (2020), <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

Tableau 1 Efficacité sur le prurit de la dermatite atopique.

	Cible	Prurit
Crisaborole 2 %	PDE4	X
Tofacitinib	JAK1/3	X
Tapinarof	AhR	NS
Dupilumab	IL-4/13	X
Traloknumab	IL-13	X
Lébricitumab	IL-13	NS
Némoltzumab	IL-31	X
Fézaknumab	IL-22	NS
Tézépélumab	TSLP	NS
Baricitinib	JAK1/2	X
Upadactinib	JAK1	X
Aprémilast	PDE4	NS
Serloptant	NK1-R	NS
ZPL-3893787	récepteur H4	NS

X : traitement ayant montré une diminution significative dans les scores évaluant le prurit ; NS : traitement n'ayant pas montré une diminution significative dans les scores évaluant le prurit ; AhR : récepteur aryl-hydrocarbure ; IL : interleukine ; JAK : janus kinase ; NK1-R : récepteur de la neurokinine 1 ; PDE4 : phosphodiesterase-4 ; TSLP : lymphopœitine thymique stromale.

Nouveaux traitements topiques

La phosphodiesterase-4 (PDE4) est une enzyme impliquée dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires par dégradation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'inhibition de la PDE4 entraîne une augmentation de l'AMPc intracellulaire qui entraîne une diminution des taux de cytokines pro-inflammatoires comme le

TNF-alpha, l'IL-4 et l'IL-31 [39]. Une augmentation des taux de PDE4 a été décrite dans des cellules de patients atteints de la DA, de sorte que la PDE4 semble être une cible intéressante [40]. Le crisaborole à 2 % est le premier et le seul médicament approuvé (FDA, 2016) à ce jour dans cette classe pour le traitement des patients âgés de 2 ans et plus atteints de DA légère à modérée, mais n'est actuellement pas disponible en France ni en Europe. Le crisaborole a montré une efficacité statistiquement significative avec 52 % et 48 % des patients obtenant des scores « Investigator's Static Global Assessment » (IGSA) 0 ou 1. Le crisaborole 2 % améliorerait également d'autres symptômes de la DA, y compris le prurit. Les effets indésirables liés au traitement étaient peu fréquents et de gravité légère à modérée [41].

Les inhibiteurs de JAK (e.g. tofacitinib, JTE-032) constituent un autre groupe prometteur d'agents topiques, actuellement en cours d'essais cliniques pour la DA. Les JAKs, une famille de tyrosine kinases (TYK), dont les JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, phosphorylent le domaine intracellulaire de plusieurs récepteurs de cytokines pour faciliter la fixation et la stimulation du transducteur de signal et de l'activateur de transcription (STAT), qui entre alors dans le noyau et effectue la transcription [42]. Ces médicaments sont actuellement à l'essai en traitement systémique de la DA, mais des formulations topiques ont également démontré leur efficacité dans des essais de phase II. Dans un essai clinique de 4 semaines du tofacitinib, ce topique se révélait significativement plus efficace que le placebo [43]. Néanmoins, le tofacitinib topique pour la DA n'a pas été développé au-delà des essais de phase II. JTE-032, un inhibiteur topique de JAK qui antagonise les 4 kinases associées aux récepteurs, a considérablement et rapidement amélioré les signes et symptômes cliniques chez 327 patients adultes japonais atteints de DA, avec un profil d'innocuité favorable [44]. D'autres anti-JAK topiques sont à l'étude dans

Tableau 2 Efficacité sur les scores d'évaluation de la dermatite atopique.

	Cible	EASI	EASI-50	EASI-75	SCORAD	SCORAD-50	IGA
Crisaborole 2 %	PDE4						X
Tofacitinib	JAK1/3	X	X	X			X
Tapinarof	AhR			X			X
Dupilumab	IL-4/13	X	X	X			X
Traloknumab	IL-13	X	X	X	X	X	
Lébricitumab	IL-13		X	X		NS	NS
Némoltzumab	IL-31	X			X		
Fézaknumab	IL-22				NS	NS	X
Tézépélumab	TSLP	NS					
Baricitinib	JAK1/2		X		X		
Tofacitinib	JAK1/3				X		
Upadactinib	JAK1	X					X
Aprémilast	PDE4	X					NS
Serloptant	NK1-R						
ZPL-3893787	Récepteur H4	X		X	X		X

X : traitement ayant montré une diminution significative dans les scores évaluant le prurit ; NS : traitement n'ayant pas montré une diminution significative dans les scores évaluant le prurit ; AhR : récepteur aryl-hydrocarbure ; EASI : « Eczema Area and Severity Score » ; IGA : « Investigator Global Assessment » ; IL : interleukine ; JAK : janus kinase ; NK1-R : récepteur de la neurokinine 1 ; PDE4 : phosphodiesterase-4 ; SCORAD : « Scoring of Atopic Dermatitis » ; TSLP : lymphopœitine thymique stromale.

Pour citer cet article : Huet F, et al. Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. *Ann Dermatol Venerol* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

des essais cliniques chez les enfants et les adultes, dont le ruxolitinib en crème (NCT03257644 et NCT03011892).

Le tapinarof, un agent modulateur thérapeutique des AhR administré dans une crème à 1 %, évalué dans une étude de phase II, permettait une amélioration de 75 % ou plus de l'EASI chez plus de 50 % des patients traités une fois par jour [45]. Les taux de réussite du traitement avec le tapinarof crème à la semaine 12 étaient de 53 % (concentration de 1 % deux fois par jour), 46 % (concentration de 1 % une fois par jour), 37 % (concentration de 0,5 % deux fois par jour), 34 % (0,5 % une fois par jour), 24 % (véhicule deux fois par jour) et 28 % (véhicule un jour). Le taux avec une concentration de 1 % deux fois par jour (53 %) était statistiquement significativement plus élevé que le taux avec véhicule deux fois par jour (24 %). Le succès du traitement était maintenu pendant 4 semaines après la fin du traitement. Le taux d'effets indésirables apparus au cours du traitement était plus élevé avec le tapinarof (56 %) qu'avec le véhicule (41 %), et les effets étaient d'intensité légère à modérée, principalement à type de rhinopharyngite ou folliculite.

Nouveaux traitements systémiques

Anti-IL-4/13

Le dupilumab est le premier anticorps monoclonal (mAb) commercialisé dans le traitement de la DA. Il se lie à la sous-unité α du récepteur de l'IL-4, qui fait partie du complexe récepteur IL-4 et IL-13. La sécurité d'utilisation et l'efficacité du dupilumab, à la fois sur les scores cliniques et le prurit, ont été établies principalement dans trois études contrôlées contre placebo dans la DA modérée ou sévère [46–48]. Le traitement par dupilumab était généralement bien toléré et entraînait peu d'effets indésirables graves. Les principaux effets secondaires étaient oculaires avec une conjonctivite non infectieuse et une inflammation de la cornée. Plusieurs études en cours auprès d'enfants et d'adolescents tentent de démontrer l'efficacité du dupilumab dans ces sous-groupes de patients atteints de la DA, ce qui élargira l'indication thérapeutique de ce traitement à une population plus jeune. Concernant la population pédiatrique, le dupilumab a reçu l'autorisation de mise sur le marché de la FDA aux États-Unis en mars 2019 pour les adolescents de 12–17 ans et est disponible en ATU en France. Lors de l'étude de phase 3 chez les adolescents, le score IGA 0/1 était atteint chez quasiment 25 % des patients et le score EASI-75 chez plus de 40 % des patients à la dose de 200/300 mg toutes les 2 semaines. Le dupilumab est également en cours d'essai (phase 2–3) chez les enfants âgés de 6 mois à 6 ans (NCT03346434).

Dans une étude de « vraie vie » du « Groupe de Recherche sur l'Eczéma Atopique » (GREAT), sur les 241 patients inclus 49 % atteignaient un EASI-75 et 17 % un SCORAD-75 à 3 mois de traitement par dupilumab [49]. Les effets indésirables étaient plus fréquents que dans les essais cliniques avec des effets indésirables ophtalmologiques non infectieux chez environ 50 % des patients (dont une conjonctivite rapportée chez 38 % des patients) et une hyperéosinophilie chez 57 % des patients (contre 34 % dans le groupe placebo). L'origine et le potentiel pathogène de cette hyperéosinophilie ne sont pas connus à court et à long terme. Dans cette étude, 11 %

des patients avaient arrêté le traitement à cause d'effets indésirables.

Le tralokinumab est un anticorps monoclonal IgG4 humain neutralisant l'IL-13. Dans une étude de phase IIb à double insu contrôlée par placebo comprenant 204 adultes atteints de DA modérée à sévère, le tralokinumab permettait une amélioration significative des scores cliniques et son profil d'effets indésirables était comparable au placebo [50]. L'EASI-50, critère de jugement principal, était obtenu respectivement chez 54,1 %, 67 % et 73,1 % des patients pour les trois posologies différentes versus 51,7 % dans le groupe contrôle. Les effets indésirables les plus fréquents dans tous les groupes (tralokinumab et placebo) étaient une nasopharyngite (17 %), une infection des voies respiratoires supérieures (9 %) et des céphalées (6 %). Le tralokinumab est actuellement en essai de phase III (NCT03363854).

Le lébrikizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible spécifiquement l'IL-13. Il a été étudié dans une étude de phase II, randomisée, contrôlée vs placebo, en double insu, chez des adultes atteints de la DA modérée ou sévère qui appliquaient des corticostéroïdes deux fois par jour. À la 12^e semaine, un plus grand nombre de patients du groupe lébrikizumab avait atteint l'EASI-50, avec des effets indésirables similaires chez les patients dans les deux groupes [51].

Anti-IL-31

Le némoltzumab (anciennement CIM331) est un anticorps monoclonal humanisé du récepteur de l'IL-31 qui a été spécifiquement mis au point pour le traitement du prurit de la DA. Dans un modèle animal, l'IL-31 induisait un prurit avec des lésions de grattage qui était supprimé à la suite d'une seule injection de némoltzumab [52]. Dans une étude de phase II, randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo, d'une durée de 12 semaines, le némoltzumab à des doses mensuelles avait considérablement amélioré le prurit. Au total, 216 patients adultes atteints de DA modérée à sévère avaient reçu du némoltzumab sous-cutané ou un placebo toutes les 4 semaines [53]. À la 12^e semaine, l'EVA du prurit était réduite de 43 % à 63 % sous némoltzumab vs 20 % dans le groupe placebo ($p < 0,01$). L'EASI était amélioré jusqu'à 40 % comparativement à 27 % dans le groupe placebo. Dans le cadre d'une prolongation à 52 semaines de l'étude, le prurit était réduit jusqu'à 90 % et les scores d'eczéma, jusqu'à 80 % [54]. Ces études ont démontré que le némoltzumab était efficace et bien toléré chez les patients atteints de DA modérée à sévère mal contrôlée par le traitement topique. Peu d'effets secondaires ont été rapportés hormis quelques cas d'œdème périphérique [54]. Une étude de phase III a débuté en juin 2019, les résultats sont attendus pour début 2022.

Anti-IL-22

Un anticorps anti-IL-22, le fézaknumab, avait une efficacité non significative dans un essai randomisé, en double insu et contrôlé vs placebo dans les DA modérées à sévères. Malgré ces résultats quelque peu décevants, les sous-analyses révélaient une réponse significative au fézaknumab par rapport au placebo chez les patients atteints de DA sévère [55].

Pour citer cet article : Huet F, et al. Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. *Ann Dermatol Venerol* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

Anti-TSLP

Le tézépélumab est un anticorps monoclonal ciblant la TSLP. Une étude de phase IIa, randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo avec application de dermocorticoïdes dans les 2 groupes, a montré, mais de manière non significative, des améliorations sur les scores EASI et l'EVA du prurit par rapport au groupe placebo à la 12^e semaine, avec un plus grand nombre de réponses à la 16^e semaine [56].

Le ligand du récepteur OX40 (OX40L), dont l'expression est induite sur les cellules dendritiques par la TSLP, joue un rôle essentiel pour orienter la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs vers la voie Th2 [57]. L'IL-33 est un amplificateur de l'axe TSLP-OX40L. Il a également été démontré que l'IL-33 perturbait directement la barrière cutanée dans la DA en régulant à la baisse l'expression de la FLG [18,58]. Par conséquent, des inhibiteurs d'OX40 et de l'IL-33 semblent intéressants et des études sont en cours ou à venir. Les résultats d'un anti-OX40 (GBR 830) en phase 2a sont prometteurs avec une injection à J1 et J29. Dans le groupe traité, le score EASI s'était amélioré de 76,9 % versus 37,5 % dans le groupe placebo, associé à une diminution de l'expression génique en ARNm en peau lésionnelle de marqueurs de la voie TH1, TH1 et TH17/22 [59].

Voies JAK/STAT

Les inhibiteurs de l'axe de signalisation JAK/STAT sont classés comme des petites molécules bloquant les cibles intracellulaires. Plusieurs composés ciblant TYK2, JAK1, JAK2 et JAK3 sont à l'étude pour le traitement oral de la DA modérée à sévère.

Le baricitinib est disponible par voie orale. Il a une AMM dans la polyarthrite rhumatoïde en 2^e intention et a montré des résultats intéressants au cours d'études de phase II dans la prise en charge du lupus systémique [60]. Il inhibe à la fois JAK1 et JAK2. La première étude de phase II portant sur l'innocuité et l'efficacité du baricitinib a été récemment publiée [61]. Les patients traités par le baricitinib présentaient une réduction significative de l'EASI comparativement au groupe placebo. Le baricitinib améliorait également le prurit et la perte de sommeil. Les effets indésirables apparus au cours du traitement étaient principalement des infections, des maux de tête et une augmentation de la créatinine phosphokinase. Les résultats de l'étude de phase III (NCT03435081) ont été présentés à l'EADV 2019. À la semaine 16, 30 % des patients obtenaient un IGA 0 ou 1 (14 % pour le placebo) et le score EASI-75 était obtenu chez 47 % des patients pour la plus forte dose (4 mg/j) (communication de Reich et al. «abstr. D3T01.1H»). À noter que le baricitinib est actuellement en étude de phase 3 chez l'enfant et l'adolescent (2 à 17 ans) (NCT03952559).

Le tofacitinib inhibe JAK1 et JAK3. En théorie, il interfère davantage avec l'activation des lymphocytes et l'orientation vers la voie Th2 que les inhibiteurs ciblant également JAK2, plus impliqué dans la signalisation Th1 [62]. Il a été étudié dans une série de cas mineurs impliquant six patients qui présentaient une réduction significative de SCORAD [63].

L'upadacitinib est une petite molécule ciblant seulement JAK1 qui a été approuvée dans la polyarthrite rhumatoïde et

est en cours d'essai dans plusieurs maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn, la spondylarthrite ankylosante ou la maladie de Horton. Les résultats d'une étude multicentrique de phase IIb (NCT02925117) ne sont pas encore publiés, mais ils ont été présentés lors du congrès de l'AAD en 2018. L'upadacitinib permettait une réduction significative des démangeaisons dès la première application. Une évaluation globale de l'investigateur (IGA) de 0/1 était observée chez 50 % des cas dans le groupe traité à la dose de 30 mg/j contre 2 % dans le groupe placebo à 16 semaines. De plus, une réduction de 74 % du score EASI était observée dans le groupe traité par 30 mg comparativement à une réduction de 23 % de l'EASI dans le groupe placebo. Les effets indésirables les plus fréquents étaient des infections des voies respiratoires, une aggravation de la DA et de l'acné. Une étude de phase 3b, randomisée en double aveugle a débuté en 2019 pour évaluer l'efficacité et la sécurité de l'upadacitinib versus le dupilumab dans la dermatite modérée à sévère de l'adulte (NCT03738397).

PF-049658584 cible également JAK1 et a été évalué dans une étude de phase II auprès d'adultes atteints de DA modérée à sévère. Les résultats sont prometteurs à en juger l'IGA (0/1 chez 44,5 % des patients, à 12 semaines comparativement à 6,3 % des patients du groupe placebo). Une réduction de 82 % du score de l'EASI était également observée contre 35 % dans le groupe placebo. Une phase III est en cours (NCT03349060).

Anti-phosphodiesterase-4 (anti-PDE4)

L'aprémilast est un inhibiteur oral de la PDE4 approuvé dans psoriasis et le rhumatisme psoriasique. Deux études ouvertes de phase II révélaient une efficacité modeste dans la DA (score EASI et IGA) avec des effets secondaires légers (nausées, vomissements et maux de tête) liés à la dose [64,65]. Dans une étude de phase II, randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo, l'aprémilast à la dose de 30 ou 40 mg deux fois par jour pendant 12 semaines était étudié chez des patients atteints de DA modérée à sévère. Ainsi, l'aprémilast à 40 mg montrait une efficacité modeste (réduction du score EASI de 31 % versus 11 % dans le groupe placebo [$p=0,03$]) [66] alors qu'aucune différence significative n'était observée entre l'aprémilast 30 mg et le placebo. Aucune amélioration significative du prurit avec l'une ou l'autre dose n'était observée comparée au placebo à la semaine 12. Le même constat était observé pour le pourcentage de participants qui obtenaient un score de 0 ou de 1 (plus du tout de lésions ou presque plus). L'administration de 40 mg d'aprémilast deux fois par jour avait été interrompue suite aux événements indésirables (6 cas de cellulite).

Antagonistes du récepteur des neurokinine de type 1 (NK1)

Plusieurs neuropeptides inflammatoires sont impliqués dans la physiopathologie du prurit de la DA. Parmi eux, la substance P (SP) et son récepteur principal, le NK1, sont particulièrement impliqués. Ainsi, les niveaux de SP sont associés à l'activité de la DA et à l'augmentation du prurit [67]. Le serlopitant (VPD-737) est un antagoniste du NK1 qui n'avait pas permis d'amélioration dans le prurit de la DA (NCT02975206). Le tradipitant (VLY-688), un autre

antagoniste oral du NK1, a fait l'objet d'une étude de phase II sur le prurit de la DA. L'étude est terminée, mais les résultats ne sont pas encore publiés (NCT02651714). Une étude de phase III est actuellement en cours (NCT03568331) dans le traitement de la DA.

Agonistes des récepteurs kappa-opioïdes

Les opioïdes se liant au récepteur kappa sont des inhibiteurs du prurit, à l'opposé de ceux se liant au récepteur mu. Ces récepteurs sont situés dans le système nerveux périphérique et central. L'expression des récepteurs kappa est diminuée dans l'épiderme des patients atteints de DA [68]. L'asimadoline est un opioïde kappa sélectif, actif par voie orale et qui a démontré son efficacité dans plusieurs essais cliniques menés sur des modèles précliniques de prurit [69]. Une étude de phase II visant à évaluer l'innocuité, la tolérance et l'efficacité clinique de l'asimadoline chez les patients présentant un prurit associé à une dermatite atopique est terminée, mais les résultats ne sont pas encore publiés (NCT02475447).

Antihistaminiques

Il n'existe actuellement aucune preuve de l'efficacité des antihistaminiques H1 oraux utilisés en monothérapie de l'eczéma, en particulier en ce qui concerne les effets antiprurigineux [70]. Le rôle potentiel de l'histamine via son récepteur H4 (par opposition à H1) pourrait néanmoins être discuté. Une étude sur le ZPL-3893787 (antagoniste sélectif des récepteurs H4) était menée dans la DA modérée à sévère [71]. Le traitement montrait une réduction du score EASI ajusté en fonction du placebo à la semaine 8. Il y avait une réduction de 3 points (échelle de 1 à 10) dans le prurit avec le ZPL-389, mais la réduction était similaire avec le placebo. Cette étude confirme que les effets des antagonistes des récepteurs H4 sont plutôt anti-inflammatoires qu'antiprurigineux.

Conclusion

Il est encourageant de voir que la recherche est actuellement très dynamique pour de nouveaux traitements de la DA et du prurit qu'elle provoque. La plupart de ces thérapeutiques ciblent les formes modérées à sévères et seront sous forme systémique, mais quelques topiques sont également évalués. Le duplumab est le premier traitement commercialisé en France de cette nouvelle génération de médicaments, et nous espérons qu'il sera suivi dans un futur proche par de nombreuses autres commercialisations. À l'heure actuelle, il est encore difficile de savoir quels sont ceux qui vont finalement émerger et être commercialisés.

Déclaration de liens d'intérêts

F. Huet : Abbvie, Beiersdorf, Celgene, Janssen, Lilly, Novartis, Pfizer et Sanofi.

L. Misery : Abbvie, Beiersdorf, Bioderma, Celgene, Expanscience, Galderma, Janssen, Johnson&Johnson, Leo

Pharma, Lilly, Menlo, Novartis, Pfizer, Pierre Fabre, Roche-Posay, Sanofi, Trevi et Urtage.

L'auteur O. Gouin déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primer* 2018;4:1.
- [2] Roduit C, Frei R, Depner M, Karvonen AM, Renz H, Braun-Falder C, et al. Phenotypes of atopic dermatitis depending on the timing of onset and progression in childhood. *JAMA Pediatr* 2017;171:655–62.
- [3] Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: results from an international survey. *Allergy* 2018;73:1284–93.
- [4] Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic criteria of dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1980.
- [5] Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ, et al. The U.K. working party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1994;131:383–96.
- [6] Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1109–22.
- [7] Huet F, Faffa M-S, Poizeau F, Merhand S, Misery L, Brenaut E. Characteristics of pruritus in relation to self-assessed severity of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2019;99:279–83.
- [8] Dalgard FJ, Gieler U, Tomas-Aragones L, Lien L, Poot F, Jemec GBE, et al. The psychological burden of skin diseases: a cross-sectional multicenter study among dermatological outpatients in 13 European countries. *J Invest Dermatol* 2015;135:984–91.
- [9] Misery L, Seneschal J, Reguiai Z, Merhand S, Héas S, Huet F, et al. Patient burden is associated with alterations in quality of life in adult patients with atopic dermatitis: results from the ECLA study. *Acta Derm Venereol* 2018;98:713–4.
- [10] Misery L, Seneschal J, Reguiai Z, Merhand S, Héas S, Huet F, et al. The impact of atopic dermatitis on sexual health. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019;33:228–32.
- [11] Schultz Larsen F. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:719–23.
- [12] Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part 1. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018;32:657–82.
- [13] Huet F, Severino-Freire M, Chéret J, Gouin O, Praneuf J, Pierre O, et al. Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: a review. *J Dermatol Sci* 2018;89:213–8.
- [14] Brown SJ, Kroboth K, Sandilands A, Campbell LE, Pohler E, Kezic S, et al. Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect. *J Invest Dermatol* 2012;132:98–104.
- [15] Brown SJ, McLean WHI. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol* 2012;132:751–62.
- [16] Elias PM. Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *J Invest Dermatol* 2012;132:2131–3.
- [17] Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K, Werzel J, Frank J, Lüscher-Firzlaff J, et al. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:426–33 [433.e1-8].
- [18] Seltmann J, Roesner LM, von Hestler F-W, Wittmann M, Werfel T. IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135 [1659.e4–1661.e4].

Pour citer cet article : Huet F, et al. Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. *Ann Dermatol Venereol* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

- [19] Noda S, Krueger JG, Guttman-Yassky E. The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:324–36.
- [20] Wilson SR, Thé L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell* 2013;155:285–95.
- [21] Takai T, Chen X, Xie Y, Vu AT, Le TA, Kinoshita H, et al. TSLP expression induced via toll-like receptor pathways in human keratinocytes. *Methods Enzymol* 2014;535:371–87.
- [22] Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Waki M, Tokura Y. TSLP directly interacts with skin-homing Th2 cells highly expressing its receptor to enhance IL-4 production in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2015;135:3017–24.
- [23] Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673–80.
- [24] Bao L, Zhang H, Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAK STAT* 2013;2:e24137.
- [25] Nygaard U, Vestergaard C, Deleuran M. Emerging treatment options in atopic dermatitis: systemic therapies. *Dermatology* 2017;233:344–57.
- [26] Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, et al. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol* 2017;18:64–73.
- [27] Kim HO, Kim JH, Chung BY, Choi MG, Park CW. Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 2014;23:278–81.
- [28] Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhé V, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 2017;8:644–61.
- [29] Tan Y, Ng WJ, Lee SZX, Lee BTK, Nattkemper LA, Yosipovitch G, et al. 3-Dimensional optical clearing and imaging of pruritic atopic dermatitis and psoriasis skin reveals downregulation of epidermal innervation. *J Invest Dermatol* 2019;139:1201–4.
- [30] Misery L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41:259–66.
- [31] Yosipovitch G, Rosen JD, Hashimoto T. Itch: from mechanism to (novel) therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1375–90.
- [32] Trier AM, Kim BS. Cytokine modulation of atopic itch. *Curr Opin Immunol* 2018;54:7–12.
- [33] Zeidler C, Pereira MP, Huet F, Misery L, Steinbrink K, Ständer S. Pruritus in autoimmune and inflammatory dermatoses. *Front Immunol* 2019;10:1303.
- [34] Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993;186:23–31.
- [35] Wollenberg A, Oranje A, Deleuran M, Simon D, Szalai Z, Kunz B, et al. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:729–47.
- [36] Misery L, Santerre A, Batardière A, Hornez N, Nedelec AS, Le Caër F, et al. Real-life study of anti-itching effects of a cream containing menthoxypropanediol, a TRPM8 agonist, in atopic dermatitis patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019;33:e67–9.
- [37] Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018;32:850–78.
- [38] Renert-Yuval Y, Guttman-Yassky E. What's new in atopic dermatitis. *Dermatol Clin* 2019;37:205–13.
- [39] Grewe SR, Chan SC, Hanifin JM. Elevated leukocyte cyclic AMP-phosphodiesterase in atopic disease: a possible mechanism for cyclic AMP-agonist hyporesponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1982;70:452–7.
- [40] Chan SC, Reifsnnyder D, Beavo JA, Hanifin JM. Immunohistochemical characterization of the distinct monocyte cyclic AMP-phosphodiesterase from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:1179–88.
- [41] Paller AS, Tom WL, Lebwohl MG, Blumenthal RL, Boguniewicz M, Call RS, et al. Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults. *J Am Acad Dermatol* 2016;75 [494.e6–503.e6].
- [42] Ghoreschi K, Gadina M. Jakpot! New small molecules in autoimmune and inflammatory diseases. *Exp Dermatol* 2014;23:7–11.
- [43] Bissonnette R, Papp KA, Poulin Y, Gooderham M, Raman M, Mallbris L, et al. Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br J Dermatol* 2016;175:902–11.
- [44] Nakagawa H, Nemoto O, Igarashi A, Nagata T. Efficacy and safety of topical JTE-052, a Janus kinase inhibitor, in Japanese adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: a phase II, multicentre, randomized, vehicle-controlled clinical study. *Br J Dermatol* 2018;178:424–32.
- [45] Peppers J, Paller AS, Maeda-Chubachi T, Wu S, Robbins K, Gallagher K, et al. A phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2019;80 [89.e3–98.e3].
- [46] Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, et al. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:2287–303.
- [47] Simpson EL, Akinlade B, Ardeleanu M. Two phase 3 trials of dupilumab versus placebo in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2017;376:1090–1.
- [48] de Bruin-Weller M, Thaçi D, Smith CH, Reich K, Cork MJ, Radin A, et al. Dupilumab with concomitant topical corticosteroid treatment in adults with atopic dermatitis with an inadequate response or intolerance to ciclosporin A or when this treatment is medically inadvisable: a placebo-controlled, randomized phase III clinical trial (LIBERTY AD CAFÉ). *Br J Dermatol* 2018;178:1083–101.
- [49] Faiz S, Giovannelli J, Podevin C, Jachiet M, Bouaziz J-D, Reguiai Z, et al. Effectiveness and safety of dupilumab for the treatment of atopic dermatitis in a real-life French multicenter adult cohort. *J Am Acad Dermatol* 2019;81:143–51.
- [50] Wollenberg A, Howell MD, Guttman-Yassky E, Silverberg JI, Kell C, Ranade K, et al. Treatment of atopic dermatitis with tralokinumab, an anti-IL-13 mAb. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:135–41.
- [51] Simpson EL, Flohr C, Eichenfield LF, Bieber T, Sofen H, Taieb A, et al. Efficacy and safety of lebrikizumab (an anti-IL-13 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical corticosteroids: a randomized, placebo-controlled phase II trial (TREBLE). *J Am Acad Dermatol* 2018;78 [863.e11–871.e11].
- [52] Oyama S, Kitamura H, Kuramochi T, Higuchi Y, Matsu-shita H, Suzuki T, et al. Cynomolgus monkey model of interleukin-31-induced scratching depicts blockade of human interleukin-31 receptor A by a humanized monoclonal antibody. *Exp Dermatol* 2018;27:14–21.

Pour citer cet article : Huet F, et al. Nouveaux traitements et perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. *Ann Dermatol Venereol* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>

- [53] Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, et al. Anti-interleukin-31 receptor A antibody for atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2017;376:826–35.
- [54] Kabashima K, Furue M, Hanifin JM, Pulka G, Wollenberg A, Galus R, et al. Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: randomized, phase II, long-term extension study. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142 [1121.e7–1130.e7].
- [55] Guttman-Yassky E, Brunner PM, Neumann AU, Khattri S, Pavel AB, Malik K, et al. Efficacy and safety of fezakinumab (an IL-22 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by conventional treatments: a randomized, double-blind, phase 2a trial. *J Am Acad Dermatol* 2018;78 [872.e6–881.e6].
- [56] Simpson EL, Parnes JR, She D, Crouch S, Rees W, Mo M, et al. Tezepelumab, an anti-thymic stromal lymphopoietin monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis: a randomized phase 2a clinical trial. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:1013–21.
- [57] Wang Y-H, Ito T, Wang Y-H, Homey B, Watanabe N, Martin R, et al. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 2006;24:827–38.
- [58] Murakami-Satsutani N, Ito T, Nakanishi T, Inagaki N, Tanaka A, Vien PTX, et al. IL-33 promotes the induction and maintenance of Th2 immune responses by enhancing the function of OX40 ligand. *Allergol Int* 2014;63:443–55.
- [59] Guttman-Yassky E, Pavel AB, Zhou L, Estrada YD, Zhang N, Xu H, et al. GBR 830, an anti-OX40, improves skin gene signatures and clinical scores in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144 [482–493.e7].
- [60] Wallace DJ, Furie RA, Tanaka Y, Kalunian KC, Mosca M, Petri MA, et al. Baricitinib for systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2018;392:222–31.
- [61] Guttman-Yassky E, Silverberg JI, Nemoto O, Forman SB, Wilke A, Prescilla R, et al. Baricitinib in adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: a phase 2 parallel, double-blinded, randomized placebo-controlled multiple-dose study. *J Am Acad Dermatol* 2019;80 [913–921.e9].
- [62] O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 2012;36:542–50.
- [63] Levy LL, Urban J, King BA. Treatment of recalcitrant atopic dermatitis with the oral Janus kinase inhibitor tofacitinib citrate. *J Am Acad Dermatol* 2015;73:395–9.
- [64] Volf EM, Au S-C, Dumont N, Scheinman P, Gottlieb AB. A phase 2, open-label, investigator-initiated study to evaluate the safety and efficacy of apremilast in subjects with recalcitrant allergic contact or atopic dermatitis. *J Drugs Dermatol* 2012;11:341–6.
- [65] Samrao A, Berry TM, Goreski R, Simpson EL. A pilot study of an oral phosphodiesterase inhibitor (apremilast) for atopic dermatitis in adults. *Arch Dermatol* 2012;148:890–7.
- [66] Simpson EL, Imafuku S, Poulin Y, Ungar B, Zhou L, Malik K, et al. A phase 2 randomized trial of apremilast in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2019;139:1063–70.
- [67] Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2002;147:71–9.
- [68] Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Possible roles of epidermal opioid systems in pruritus of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127:2228–35.
- [69] Machelska H, Pflüger M, Weber W, Piranvisseh-Völk M, Daubert JD, Dehaven R, et al. Peripheral effects of the kappa-opioid agonist EMD 61753 on pain and inflammation in rats and humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:354–61.
- [70] van Zuuren EJ, Apfelbacher CJ, Fedorowicz Z, Jupiter A, Matterne U, Weisshaar E. No high level evidence to support the use of oral H1 antihistamines as monotherapy for eczema: a summary of a Cochrane systematic review. *Syst Rev* 2014;3:25.
- [71] Werfel T, Layton G, Yeadon M, Whitlock L, Osterloh I, Jimenez P, et al. Efficacy and safety of the histamine H4 receptor antagonist ZPL-3893787 in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143 [1830–1837.e4].

La prise en charge du prurit est la première plainte des patients, qui peut-être plus importante que la demande de traitement des lésions de DA en elle-même. Parmi les traitements de la DA, leur efficacité sur le prurit est variable mais fait aujourd'hui partie des critères d'évaluation dans les études.

- La première étape pour traiter le prurit de la DA consiste à appliquer des émoullients qui réparent les défauts de la barrière cutanée. Les émoullients se sont avérés efficaces contre la démangeaison chez le patient atopique (Kawakami & Soma, 2011). Lors d'une poussée aiguë, les dermocorticoïdes agissent sur l'inflammation cutanée. Les inhibiteurs topiques de la calcineurine peuvent être utilisés comme alternative aux dermocorticoïdes et inhibent la libération de cytokines inflammatoires telles qu'IL-4, IL-13, TSLP... (Ständer et al., 2006).
- La deuxième étape contient des thérapies systémiques telles que les UV, la ciclosporine A, l'azathioprine ou le méthotrexate. Dans une étude sur le prurit chez des patients atteints de DA, les UVB à bande étroite ont diminué la gravité du prurit chez 90 % des patients (Reynolds et al., 2001). La ciclosporine A est un excellent traitement antiprurigineux de la DA et a montré une diminution significative de la gravité du prurit et une baisse des taux sériques d'IL-31 (Otsuka et al., 2011; Pacor et al., 2004). D'après les essais cliniques, le méthotrexate et l'azathioprine avaient une efficacité similaire dans les évaluations du prurit (Schram et al., 2011).
- Le dupilumab est le premier d'une nouvelle génération de traitements de la DA et de son prurit. Le dupilumab est un anticorps monoclonal qui se lie à la sous-unité α du récepteur à l'IL-4. Dans des études contrôlées par placebo, le dupilumab a réduit le prurit de manière significative (44-51 % de réduction), et les résultats ont été confirmés dans l'étude en situation réelle (Simpson et al., 2017; Tauber et al., 2019). De nombreux autres anticorps monoclonaux sont en cours d'essai (Huet et al., 2020; Misery et al., 2019). Le

tralokinumab et le lebrikizumab sont des anticorps monoclonaux neutralisant l'IL-13. Le némolizumab est un anticorps monoclonal du récepteur A de l'IL-31, qui a été spécifiquement développé pour le traitement du prurit lié à la DA, inhibant la signalisation de l'IL-31. Dans une étude de phase II, le prurit a été réduit jusqu'à 90 % en 52 semaines (Kabashima et al., 2018). Le tezepelumab est un anticorps monoclonal ciblant la TSLP. Compte tenu du rôle de la TSLP dans le prurit atopique, le tezepelumab semble très intéressant. Néanmoins, dans l'étude récente de phase II, le tezepelumab a montré une efficacité limitée sur le prurit et les signes inflammatoires (Simpson et al., 2019).

- La phosphodiesterase 4 (PDE4) est une enzyme qui régule les cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la DA telles que l'IL-4, l'IL-31 ou l'IL-33. Le Crisaborole est un nouvel inhibiteur topique de la PDE4 approuvé dans la DA et qui a montré une amélioration du prurit (Paller et al., 2016). Dans une étude de phase II, l'apremilast (un inhibiteur de la PDE4 administré par voie orale) montrait une efficacité modeste dans la DA et une diminution du prurit, mais non significative par rapport au placebo (Simpson et al., 2019).
- Les inhibiteurs des voies JAK/STAT (tyrosine kinase (TYK) 2, JAK1, JAK2 et JAK3) sont en cours d'évaluation pour le traitement oral de la DA. Les résultats sont encourageants sur le prurit. Par exemple, dans les études de phase III du baracitinib, le prurit diminue de plus de 30 %, et de manière intéressante dès les premières prises (Simpson et al., 2020).
- La libération massive de la SP est impliquée dans l'inflammation neurogène et l'augmentation du prurit. Deux phases II avec un antagoniste des récepteurs de la SP (le « neurokinin-1 receptor » (NK1R)) par voie orale ont été réalisées. La première avec le serlopitant ne montrait pas d'amélioration sur le prurit. La seconde concernant le tradipitant est terminée mais les résultats ne sont pas publiés.

- Parmi les autres traitements possibles sur le prurit atopique, les agonistes des récepteurs kappa, l'antihistaminique H4 oral, l'acide dihomog- γ -linoléique ou le tapinarof (agit sur l'AhR) sont en cours d'évaluation et pourraient constituer de futurs traitements du prurit dans la dermatite atopique (Peppers et al., 2019).

Partie 3 : Modèles *in vitro* de « DA-like »

Avec son incidence très élevée dans l'enfance, sa chronicité, l'altération de la qualité de vie des patients touchés et de leur famille, ses coûts socio-économiques énormes et les options thérapeutiques limitées à ce jour, la DA représente un défi scientifique et médical majeur. Par conséquent, un certain nombre de modèles, animaux ou *in vitro*, ont été développés et utilisés par les chercheurs et l'industrie pharmaceutique. Ces modèles ont pour objectif de mieux comprendre la maladie et envisager de nouvelles voies thérapeutiques à cibler (Jin et al., 2009).

I. Modèles animaux de dermatite atopique

Une grande variété de modèles animaux de DA est actuellement utilisée. Les chiens, les chats et les chevaux, notamment, développent spontanément des lésions de type DA (Marsella & De Benedetto, 2017). Parmi ceux-ci, les modèles canins sont fréquemment utilisés car leur phénotype et leurs symptômes cliniques ressemblent beaucoup à ceux de la DA humaine (Marsella & Girolomoni, 2009). Cependant, du fait du coût et de leur faible maniabilité, l'utilisation de ces modèles animaux demeure relativement marginale. De ce fait, et indépendamment du fait qu'ils ne développent pas spontanément de lésions d'eczéma, les souris sont les modèles les plus utilisés en raison de leur coût relativement faible, de leur court délai de maturation et de la grande maniabilité des manipulations génétiques (Jin et al., 2009; Marsella & Olivry, 2003). Toutefois, les modèles de souris ne reflètent pas de manière adéquate les voies transcriptomiques et transcriptomiques activées dans la DA de la peau humaine (Ewald et al., 2017). La différence intrinsèque entre la peau de la souris et la peau

humaine représente également une barrière à la translation directe des découvertes sur les animaux vers les pathologies de l'homme.

Par conséquent, l'intérêt est croissant envers les modèles de culture cellulaire utilisant des tissus humains même s'il ne s'agit pas de modèles complets (Eyerich et al., 2019).

II. Modèles *in vitro* de dermatite atopique

Parmi les modèles *in vitro*, il existe plusieurs modèles de culture cellulaire (E. De Vuyst et al., 2017) :

- Bidimensionnelle ou 2D
- Tridimensionnelle ou 3D

Ces modèles se complètent et répondent à des questions différentes.

1. Modèles 2D

a. Généralités

Les cultures d'un seul type cellulaire, qu'il s'agisse de cellules immunitaires ou de kératinocytes, peuvent être considérées comme les modèles *in vitro* les plus simples. Cela s'applique pour l'analyse des phénomènes de la DA et plus particulièrement son épiderme composé à 90 % de kératinocytes. Bien que ces modèles ne tiennent pas compte des structures et des interactions complexes au sein de la peau, ils présentent l'avantage de permettre une évaluation précise de la réponse d'une cellule spécifique à une question donnée.

Les modèles 2D permettent d'étudier les différents types cellulaires séparément (kératinocytes, lymphocytes, mastocytes...) et de les caractériser. De plus, les cellules impliquées (kératinocytes ou cellules immunitaires) dans la physiopathologie de la DA peuvent être isolées soit à partir de peau pour les kératinocytes soit à partir du sang périphérique de sujets normaux ou de patients atteints de DA (De Vuyst et al., 2017).

b. Les kératinocytes

Pour étudier le rôle des kératinocytes dans la physiopathologie de la DA, deux possibilités existent :

- La lignée cellulaire HaCaT (lignée cellulaire de kératinocytes immortels aneuploïdes spontanément transformés provenant de la peau humaine adulte (Boukamp et al., 1988; Otschläger et al., 2009). Les cellules HaCaT sont utilisées pour leur grande capacité de différenciation et de prolifération *in vitro* (Schürer et al., 1993).
- L'utilisation de kératinocytes primaires isolés à partir de peau d'animaux (rat, souris, porc...) ou humaine. Suite à leur extraction à partir de peau par digestion enzymatique, seuls les kératinocytes basaux, proliférants, peuvent être mis et conservés en culture.

Que ce soit en lignée ou primaires, les kératinocytes mis en culture sont proliférants. L'ajout de Ca^{2+} dans les cultures permet d'induire leur différenciation et ainsi étudier à la fois le comportement des kératinocytes en prolifération ou en différenciation. Ces cultures sont simples à réaliser et restent très utiles pour l'étude de mécanismes moléculaires de base dans un contexte physiologique ou pathologique comme la DA. Dans ce dernier cas, plusieurs modèles ont été mis en place. L'ajout d'IL-4 et IL-13 permet d'analyser l'effet de l'inflammation cytokinique sur les HaCaT et les kératinocytes primaires (Omori-Miyake et

al., 2014). Ainsi, lors de l'incubation avec ces cytokines, les cellules épidermiques présentaient entre autres une expression transcriptomique sensiblement réduite pour la *FLG*. Les expressions des cytokératines 1 et 10, de la desmogleine 1 et de la desmocolline 1 étaient également diminuées.

Dans le modèle de Dang *et al.*, l'inhibition d'expression de la *FLG* entraînait une augmentation de la libération des cytokines Th2, comprenant l'IL-4, IL-5, et IL-13, tandis que la production de l'interféron- γ (IFN- γ) était réduite (Dang et al., 2015).

De plus, l'étude des kératinocytes issus de patients atteints de DA peuvent être étudiés en culture 2D. La stimulation de ces kératinocytes par les cytokines IL-4, TNF- α et IFN- γ entraînait la production de chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Giustizieri et al., 2001).

Cependant les kératinocytes cultivés en monocouche ne se stratifient pas et ne produisent pas de barrière épidermique efficace. Par conséquent, le développement de modèles épidermiques *in vitro* en 3D, c'est-à-dire qui produisent une barrière fonctionnelle, est crucial pour mieux comprendre la complexité de la DA et évaluer les traitements.

c. Autres modèles 2D

La grande majorité des modèles se focalisent sur les kératinocytes, mais quelques modèles se sont intéressés aux autres cellules impliquées (De Vuyst et al., 2017). En particulier des cultures de lymphocytes ont été réalisées et il a été montré que la fréquence des lymphocytes exprimant le récepteur de la TSLP était corrélée à la sévérité de la DA (Tatsuno et al., 2015). Quelques études ont également concerné les mastocytes, fibroblastes, éosinophiles et basophiles (Jiao et al., 2016; Nomura et al., 2001).

2. Modèles 3D

Les modèles 3D reproduisent l'épithélium pavimenteux stratifié de l'épiderme, mais nécessitent une culture plus longue et une expertise spécifique.

Parmi les modèles 3D on retrouve :

- Les peaux reconstruites : épidermes humains reconstruits (EHR ou « reconstructed human epidermis » (RHE)) et les équivalents de peau humaines (« human skin equivalent (HSE)).
- Les explants cutanés (biopsies prélevées sur l'organisme).

a. Peaux reconstruites

Les EHR sont constitués de kératinocytes sans compartiment dermique, alors que les HSE ont une matrice qui reproduit un derme. Ces 2 modèles imitent les caractéristiques *in vivo* de l'épiderme humain en termes de différenciation, de fonction de barrière et d'histologie (De Vuyst et al., 2014; Eckl et al., 2011; Frankart et al., 2012; Poumay et al., 2004). Les EHR sont composés uniquement de kératinocytes, cultivés à l'interface air-liquide sur des filtres en polycarbonate inerte. Inversement, les HSE sont basées sur une matrice de type dermique initialement organisée avant l'ensemencement et la culture de kératinocytes sur le dessus pour la stratification de l'épiderme et la kératinisation par exposition à l'air. La matrice de type dermique peut soit être basée sur un derme désépidermisé ou sur des matrices de collagène contenant des fibroblastes.

Epiderme humain reconstruit

L'analyse de la littérature des EHR mimant la DA a fait l'objet d'une revue de la littérature publiée dans « Journal of Dermatological Sciences » (Huet et al., 2018).

Journal of Dermatological Science 89 (2018) 213–218



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: www.jdsjournal.com



Review article

Reconstructed human epidermis for *in vitro* studies on atopic dermatitis: A review



F. Huet^{a,b}, M. Severino-Freire^c, J. Chéret^a, O. Gouin^a, J. Praneuf^d, O. Pierre^a, L. Misery^{a,b,1},
C. Le Gall-Ianotto^{a,b,*}

^a University of Western Brittany, Laboratory Interactions Neurons-Keratinocytes (LINK), Brest, France

^b University Hospital of Brest, Department of Dermatology, Brest, France

^c University Hospital of Toulouse, Department of Dermatology, Toulouse, France

^d University of Lyon, Department of Sciences and Technology, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2017

Received in revised form 15 November 2017

Accepted 27 November 2017

Keywords:

Reconstructed human epidermis

Atopic dermatitis

Filaggrin

Lipid

Inflammation

Pruritus

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease causing a strong impact on quality of life. Its pathophysiology is the result of complex interactions involving immunological, genetic and environmental factors. Although there are several published *in vitro* three-dimensional models mimicking AD, none of them have taken all these pathophysiological features into account; thus, finding the right model may be complicated. This paper reviews the literature on the different reconstructed epidermis models of AD as well as their relevance. We focused our attention on both the defect of the epidermal barrier and the inflammation linked to the immune system.

© 2017 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	213
2. AD Pathophysiology	215
3. Reconstructed human epidermis and atopic dermatitis: inflammation (Fig.1a)	215
4. Reconstructed human epidermis and atopic dermatitis: defect of epidermal barrier (Fig.1 b)	216
4.1. Morphology and protein alteration	216
4.2. Study of filaggrin	216
4.3. Lipids alterations	216
5. Relevance and limits of the reconstructed human epidermis model	217
6. Conclusion	217
Conflict of interest	217
Funding	217
References	217

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) (AD; OMIM # 603165) is a common chronic relapsing inflammatory disease that typically begins in

early childhood. Its prevalence has been evaluated as 10.7% in the pediatric population and as 7.2% in the adult population of the United States [1,2]. AD is a multifactorial disease involving environmental, immunological and genetic factors. Clinically, AD is characterized by erythematous and itchy skin lesions over the entire body that cause a strong impact on the quality of life of patients [3,4].

AD treatment is currently in full revolution with the advent of new treatments. Consequently, the need for a realistic *in vitro*

* Corresponding author at: Laboratory Interactions Neurons-Keratinocytes (LIEN in french), Faculty of Medicine, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200, Brest, France.
E-mail address: Christelle.Ianotto@chu-brest.fr (C. Le Gall-Ianotto).

¹ These authors contributed equally to this work.

Table 1
Summary table of the different RHE models.

Model	Conditions of culture	Inflammation	Proteins	Lipids
Gastec-Rizzi et al. [33]	IL-4, IL-13, TIR ligand poly (I:C) and Pam3CKSA4	↑ TSLP	– ↓ of filaggrin – Alteration of claudin-1	ns
De Vuyst et al. [34]	methyl-β-cyclodextrin	↑ IL-8	ns	Cholesterol depletion
De Vuyst et al. [36]	methyl-β-cyclodextrin, IL-4, IL-13, IL-25	↑ TSLP	↓ of loricrin	Cholesterol depletion
Danso et al. [39]	IL-4, IL-13, IL-31+/- TNF-α	↑ TSLP	– Spongiose – Alteration of keratin 10, loricrin and filaggrin	Modification of ceramide, cholesterol and saturated fatty acids
Rouaud-Tinguely P et al. [40]	Poly I: C, TNF-α, IL-4, IL-13	↑ TSLP and IL-8	– Spongiosis – Alteration of loricrin, involucrin and filaggrin	ns
Pendaries et al. [41]	shRNA FLG	ns	– ↓ of filaggrin-2, hornein, caspase-14, keratin-10, loricrin and bleomycin hydrolase – ↑ of corneodesmosine and claudin-1	ns
Pendaries et al. [42]	shRNA FLG	ns	– ↓ of loricrin, procaspase-14, bleomycin hydrolase – ↑ of claudin-1	ns
Son et al. [45]	Extracts of <i>S. aureus</i> , cytokines IL-6 or IL-8	ns	↓ of keratin 1 and 10	ns

The table lists the culture conditions of each model of reconstructed human epidermis that we studied in this review. The main factors studied in each model are shown in the last column. FLG: filaggrin; IL: interleukin; Poly I: C: polyinosinic-polycytidylic acid; shRNA: short hairpin; TNF: tumor necrosis factor; TSLP: thymic stromal lymphopoietin protein; ns: not studied.

model is becoming essential for testing new molecules. Moreover, studies testing some medications and even more cosmetic products using animal models are limited by their cost and ethical.

Reconstructed human epidermis (RHE) is defined as an *in vitro* three-dimensional reconstruction of human epidermis from primary keratinocytes extracted from human skin (usually abdominal skin or foreskin) of healthy subjects. Cells are isolated, amplified on either an inert polycarbonate filter or collagen matrix and placed at the air-liquid interface to allow their differentiation into a stratified human epidermis [5]. These models are histologically (cell proliferation and expression of differentiation markers) and functionally similar to *in vivo* human epidermis. However, it is not possible to reconstruct the real immunological response in RHE models. The induction of a RHE mimicking AD can be carried out due to the modification of culture medium for different RHE models, which is summarized in Table 1.

The etiology of AD is complex and not fully understood to date. Both the impairment of the epidermal barrier and systemic inflammation, which result in an abnormal immune response, lead

to a vicious cycle. Indeed, defects of the epidermal barrier allow for an increase of cutaneous permeability and consequently trigger inflammation and immune system activation (the “outside-inside” hypothesis) [6]. Conversely, skin inflammation leads to defects of the epidermal barrier with perturbation of keratinocyte differentiation (the “inside-outside” hypothesis) [7].

The acute inflammation phase begins with a predominant response of T helper 2 (Th2) lymphocytes and then evolves toward a chronic T helper 1 (Th1) lymphocyte response [8]. In addition, AD skin lesions are characterized by the overexpression of pro-inflammatory type 2 molecules such as interleukin (IL) -4, -13 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) secreted by keratinocytes [9]. The inflammation is also maintained, enhanced or triggered by neurogenic inflammation [10].

Concerning the epidermis, both the organization and composition of proteins and lipids play an important role in epidermal barrier function.

Genetically, mutations in *FLG*, the gene encoding for filaggrin, are one of the major factors predisposing AD [11]. A defect in

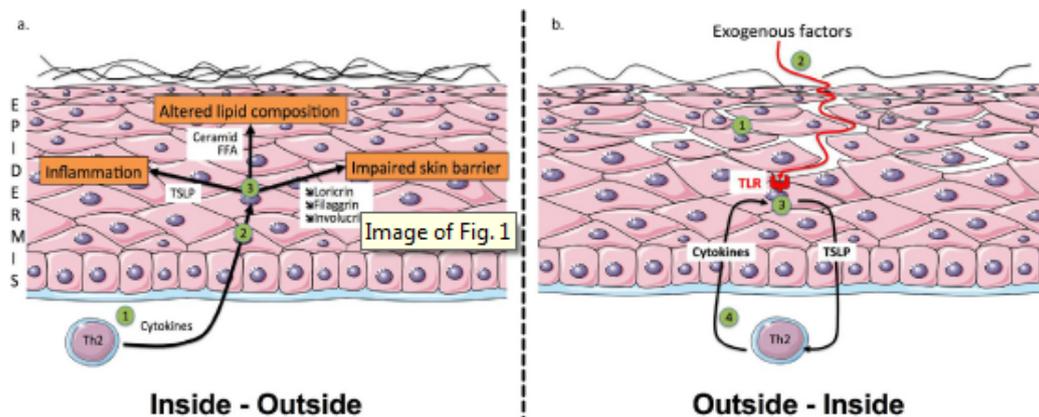


Fig. 1. The “inside-outside” and “outside-inside” hypotheses with a reconstructed human epidermis.

(a) (1) The pro-inflammatory environment is linked to a production of Th2 cytokines by immune cells. (2) The impact of Th2 cytokines on the epidermis and especially on keratinocytes. (3) The induction of TSLP secretion by keratinocytes, defect of the epidermis with an alteration of the organization and composition of lipids, and alteration of protein differentiation. (b) (1) Defect of the epidermis with defects of filaggrin, loricrin, involucrin and keratin 10 and alteration of lipid composition. (2) An increase of penetration of the exogenous factor. (3) Keratinocyte stimulation (especially by TLR) leading to TSLP secretion and activation of dendritic cells. (4) Inflammation induction with stimulation of Th2 cytokines. FFA: Free fat acids; Th2: helper T lymphocytes; TLR: toll-like receptor; TSLP: thymic stromal lymphopoietin.

filaggrin leads to disorders of the skin barrier function, which involves the entry of allergens, and disorders of epidermal differentiation [12].

The aim of this review is to describe the different models of RHE that mimic AD. We will focus more precisely on two hypotheses (the “inside-outside” and “outside-inside” hypotheses, as previously defined) to describe these models, and evaluate their relevance (Fig. 1).

2. AD Pathophysiology

Recently, studies on AD are in full effervescence, particularly with the marketing of new treatments such as biotherapies but also because of the dynamic research on itching. In this context, *in vitro* models are important for understanding mechanisms involved in AD (i.e., the “outside-inside” and “inside-outside” hypotheses), especially for discovering new therapeutic approaches.

Models using RHE allow for the study of these two hypotheses, either by generating inflammation via interleukins (ILs) or by producing a defect in the epidermal barrier.

Skin is the first barrier of the body to the outside environment. It requires a stratified and differentiated epidermis, with a basal layer (BL), a spinous layer (SL), a granular layer (SG) and a stratum corneum (SC), to protect and regulate the organism. Differentiated keratinocytes synthesize proteins such as keratin (K) 10, loricrin, involucrin and filaggrin [13,14]. These last three proteins participate in the formation of the SC and their decreased expression is often associated with a breakdown of the epidermal barrier in AD, as confirmed by immunohistochemistry and histology showing spongiosis and exocytosis of the epidermis [15,16].

Among these proteins, filaggrin is the most studied because genetic variations and loss of function variants within the *FLG* gene have been evidenced as a major risk factor in AD [17,18]. Filaggrin precursor (profilaggrin) is produced by granular keratinocytes which is known as main component of the keratohyalin granules. During cell transition from GL to SC, profilaggrin is rapidly dephosphorylated and cleaved by serine proteases (e.g., kallikrein 5) to generate filaggrin monomers [12]. These monomers are associated with keratin filaments suspected to induce the formation of the fibrous matrix of the SC, which is involved in the construction of the epidermal barrier. Hence, a strong correlation between the presence of AD lesions and mutations of the *FLG*, which is located on the chromosomal region 1q21.3, has been demonstrated [19]. Indeed, a mutation in this gene was observed in more than 20% of AD patients, suggesting a key role in the disease by its protective function of the skin barrier [20].

Proteins are not the only constituent of the impermeable barrier. Lipids, mainly ceramides (with ester linked ω -hydroxyl ceramide (EO ceramide)), free fatty acids (FFA) and cholesterol, constitute the lipid matrix that is organized in lamellar bodies and located between corneocytes [21]. In AD, this lipid matrix is disorganized, and an alteration of the epidermal barrier is induced. AD patients show a reduction of long chains, an increase of unsaturated FFAs and a decrease of very long chains of ceramides in the skin [22].

With regard to inflammation, AD is characterized by an overexpression of pro-inflammatory molecules such as Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13), IL-22 or thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [9]. The non-lesional skin of AD patients already shows signs of low-level inflammation with presence of Th2 and Th22 cell infiltration [23]. IL-31 and IL-33 are also related to pathogenesis of AD [24–26]. In the acute phase of AD, skin barrier defects allow the penetration of epicutaneous antigens and lead to the production of TSLP by keratinocytes. In the chronic phase, continuous activation of Th2 and Th22 increase in the

affected epidermal barrier accelerating also local inflammation leading to a vicious cycle [27].

TSLP secretion by keratinocytes [28] is induced by sensitizing antigens, Th2 cytokines or the activation of toll-like receptor (TLR) pathways [29,30]. It plays a role in immune processes at the epithelial interface with the outside by acting on dendritic cells, mast cells and Th-lymphocytes. Activation of dendritic cells by TSLP promotes the transformation of Th-naïve lymphocytes to the Th2 phenotype and the secretion of Th2 cytokines [31].

TSLP directly activates cutaneous sensory nerve endings via its specific receptor and then promotes itching [28]. Due to the narrow associations between skin, immune system, and nervous system, nerve endings are very important in the pathophysiology of inflammatory dermatoses, especially in AD. Many neurotransmitters and nerve growth factors released from nerve endings in the blood or skin are involved in neurogenic inflammation, dramatically enhancing and maintaining the inflammation induced by immune cells. During times of stress, their release is highly enhanced [10,32]. Due to the multimodality of AD, none of the actual RHE are mimicking all the components of the disease and focus only on specific components of the pathophysiology of AD instead.

3. Reconstructed human epidermis and atopic dermatitis: inflammation (Fig. 1a)

Inflammation plays a major role in AD and is the target of new therapies. The majority of authors are logically interested in inflammation and TSLP secretion by keratinocytes that is the best pathway for studying inflammation in RHE since immune cells are absent (Table S1).

Danso et al. studied the effects of Th2 cytokines (IL-4, IL-13 and IL-31) with and without tumor necrosis factor (TNF)- α on the secretion of TSLP, and noticed an increase in its release by ELISA in all cases.

Rouaud et al. have supplemented their culture medium with Th2 cytokines (IL-4 and IL-13), TNF- α and polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C). They obtained a significant increase of TSLP as well as IL-8 levels measured by ELISA. These authors claim to have higher levels of TSLP than models without poly I:C, suggesting that poly I:C can mimic an immune response via its TLR-3 receptor expressed on keratinocytes.

In their model, Castex-Rizzi et al. supplemented the use of poly I:C by Pam3CK54, an activator of TLR-4 and showed also an increase of TSLP in their model by ELISA [33].

In a first model, De Vuyst et al. did not add ILs in the culture but depleted their RHE in cholesterol only, and IL-8 mRNA level was transiently increased (between 1 and 8 h after depletion) [34]. In a second time, they added IL-4, -13 and -25 and then observed an absence of TSLP mRNA expression increase. Surprisingly, IL-8 was not studied [35,36]. The authors explain this phenomenon by the absence of TNF- α or IL-1 in their culture medium in association with the ability of ILs to stimulate TSLP production.

In all of these models of inflammation, Th2 cytokines as well as activators of TLRs are always used to enhance inflammation revealed by a TSLP increase. Furthermore, the addition of TNF- α seems to be an important feature, and its absence in the De Vuyst model could explain the absence of TSLP [37].

To study the genes involved in AD, many candidates have been identified and are divided into two groups: genes involved in the barrier function of filaggrin and genes involved in the immune response. The second group one of the identified gene clusters is located on chromosome 5q31-33 and gathers includes Th2 type cytokine genes, such as IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, and factors of granulocyte and monocytes stimulation (GM-CSF). IL-18 improves the production of IL-4, IL-13 and IL-10, and IL-31 play various roles

in immune regulation and the anti-inflammatory response. Farley et al. used an RHE to study mechanisms of inflammatory responses induced by Fas ligand using neonatal keratinocytes and their immortal derivatives from the knockdown of ERK 1/2 [38]. The authors described the role of Fas ligand in the induction of keratinocytes apoptosis in dermatitis and in AD. Nevertheless, this model focused on inflammation in general but not in AD indicating that their model is not appropriate for studying AD.

4. Reconstructed human epidermis and atopic dermatitis: defect of epidermal barrier (Fig. 1b)

4.1. Morphology and protein alteration

The study of the morphological characteristics of the epidermis may be helpful for evaluating the skin barrier (Table S2). To reproduce the features of AD in the epidermis, different strategies are used. The first and most common is the induction of an inflammatory environment.

Danso et al. studied the influence of different cytokines on epidermal organization and differentiation [39]. The addition of Th2 cytokines with TNF- α , leads to spongiosis and epidermal thickening similar to condition with Th2 cytokines but without TNF- α . Then, Danso et al. analyzed the expression of the advanced terminal products of differentiation by immunohistochemical staining. In their model supplemented with single Th2 cytokines (IL-4, IL-13 or IL-31) or TNF- α , K10 is not expressed in BL or in the deeper layers of the SL. When the mix of Th2 cytokines (IL-4, IL-13 and IL-31) was added in the presence or absence of TNF- α , the expression of K10 and filaggrin were also delayed in the upper layers (as evidenced by immunohistochemical staining, qPCR and ELISA tests). The expression of loricrin was present in GL but discontinuous and fragmented in immunohistochemical staining. Nevertheless, only the addition of IL-13 alone or in association with other Th2 cytokines clearly reduced the expression of loricrin, as shown by ELISA.

Rouaud-Tinguely et al. exhibited a stratified epidermis where the AD RHE was less compact and thicker than the RHE control with spongiosis in the deepest layers after incubation with IL-4, IL-13, TNF- α and Poly I: C [40]. The expression of filaggrin and loricrin in this model was reduced. Involucrin expression was slightly marked only in the superficial layers of the AD RHE compared to the untreated RHE. These authors have characterized the differences of gene expression between the control RHE and those cultured with an inflammatory cocktail. Transcriptomic analysis revealed a clear difference in the expression of 26 genes between control and AD RHE. By performing RT-qPCR, they evidenced a decreased expression of differentiation-associated genes, such as *FLG*, *LOR* and *K10*, while an increase in inflammation-associated genes was observed. Castex-Rizzi et al. described a model treated specifically with the activators of TLR-3 and TLR-4. By histological analysis, a reduction of filaggrin and an alteration of Claudin-1 expression were observed [33].

First, De Vuyst et al. depleted a single cholesterol using methyl- β -cyclodextrin (M β CD), and treated their RHE with a mixture of IL-4, IL-13 and IL-25 [34]. This model mimics an AD-like epidermal phenotype with spongiosis and hypogranulosis, which are associated with barrier alteration (as performed by transepithelial electrical resistance measurement). In addition, the same team has studied the impact of the different ILs used in association with M β CD [36] and showed a decreased expression of genes associated with keratinocyte differentiation, such as *FLG* and *LOR* (performed by RT-qPCR). In particular, *FLG-1* and *FLG-2* expression levels were decreased when IL-25 was associated with M β CD. IL-4 led to the most epidermal alteration, with an attenuation of loricrin expression, and in contrast, an increase of hyaluronan synthase

expression and inflammation-related gene expression, such as *Carbonic anhydrase II (CAII)* and *NELL2*.

4.2. Study of filaggrin

Filaggrin was shown to be an advanced terminal product of epidermal differentiation, and mutations on its gene seem to induce AD.

The team of Pendaries et al. was interested in the deficiency of the *FLG* in the RHE. From shFLG-RNA, they demonstrated that the RHE model obtained mimicked the hallmarks of human AD on a protein level. In a first study, they observed a decrease in epidermal thickness and SC as well as a loss of keratohyalin granules, which was confirmed by electron microscopy analysis [41]. Skin barrier function was impaired (Lucifer Yellow test) and measurements of urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid were significantly decreased in the shFLG-RNA RHE. These elements suggested an increase in UV sensitivity (increased caspase-3 activity after irradiation) (Table S3). Moreover, in this model filaggrin-2, loricrin, caspase-14 and bleomycin hydrolase expression were decreased as shown by western blotting and RT-qPCR tests. This study demonstrated the important role of filaggrin mutations in AD patients. Thus, it suggests that the shFLG-RNA model is a good model for *in vitro* experimentations. The same team investigated the role of filaggrin-2 using shRFLG2-RNA RHEs and found differences between FLG and FLG2 shRNA [41]. These differences are summarized in the Supplementary data (Table S4) and are particularly related to SC, cutaneous pH and the expression of epidermal differentiation genes and proteins. These different models using shRNA bring together many characteristics present in AD and are therefore relevant for studying the inside-outside hypothesis of AD at morphological level.

Moreover, there are RHE models that use culture medium containing pro-inflammatory Th2 cytokines +/- TNF- α in order to study the impact of inflammation on the expression of filaggrin, as previously described.

4.3. Lipids alterations

Epidermal lamellar bodies are embedded in corneocytes. In AD patients, the organization and composition of these lipid complexes are altered and participate in a vicious cycle.

Danso et al. used a culture medium with pro-inflammatory cytokines (IL-4, IL-13 and IL-31) with or without TNF- α [39]. The authors demonstrated, by liquid chromatography and mass spectrometry, that IL-31 and TNF- α alone or associated with Th2 cytokines influence the composition of lipids in RHE. Thus, TNF- α leads to a significant reduction of FFAs and EO ceramides (as after incubation with IL-31) in RHE (Table S5). According to Danso et al., there is a clear relationship between the effects of the cytokines added in the culture medium and the effect of keratinocyte proliferation and differentiation in their model. However, these changes did not reflect the changes in the lipid composition of SC. Therefore, Danso et al. suggested that the changes induced by cytokines during epidermal differentiation and lipid synthesis in the SC were influenced by different pathways.

De Vuyst et al. analyzed the effects of cholesterol depletion on signaling pathways and gene expression (Table S7) [34,35]. They used M β CD on day 5 of the air-liquid interface step which induced a transient depletion of cholesterol 1 h after treatment and a return to basal line after 24 h. They found in their RHE an activation of cell signaling pathways and an alteration of gene expression. This model did not allow for a mimic of AD because the epidermal

barrier and morphology were not modified. Thus, in their second model, they included ILs in the RHE culture medium.

5. Relevance and limits of the reconstructed human epidermis model

RHE models are valuable tools for studying specific aspects of the epidermal pathophysiology, especially for AD. Nevertheless, the absence of fibroblasts, immune cells and nerve endings remains one of the major issues of the RHE model. Indeed, inflammation of the skin is mediated by immune cells, especially Th2 cells, and maintained by neurogenic inflammation in AD [32]. The majority of models try to mimic inflammation by adding cytokines to the culture medium. Expression of TSLP by keratinocytes confirms their activation by an inflammatory environment. In both the models of Rouaud-Tinguely and Castex-Rizzi, it is claimed that the activators of TLR-3 and -4 are a good complement to Th2 cytokines [33,40]. Conversely, the absence of TNF- α associated with Th2 cytokines, similar to the De Vuyst's model, does not allow for the production of TSLP. Nevertheless, this model is very interesting because it tries to reproduce the vicious cycle of AD with both Th2 cytokines, to mimic skin inflammation, and a depletion of cholesterol, to mimic a disruption of the epidermal barrier.

Pendaries et al. tend to approach the inside-outside hypothesis by disrupting the epidermal barrier. However, the inflammatory aspect (TSLP secretion) was not studied but would be interesting to consider, even if immune cells are absent [41,42].

Keratinocytes are in permanent contact with their environment and interact with the cells that make up its environment. These cells, especially fibroblasts, play a major role in their differentiation and stratification. Skin explant models allow this communication and are obviously closer to realistic AD [43]. Adding sensory innervation would make the model even more realistic because none of the current models include nerve endings.

Moreover, murine models are studied more frequently. These animal models are very useful for understanding the molecular mechanisms and pathogenesis of AD, although the pathogenesis of inflammation is not truly identical to that of humans [44]. Another major drawback is the ethical limitations for the use of animals in human research.

In summary, RHE offers several advantages, such as the ease of obtaining these models and the simplified study of AD. While no model using RHE will be able to mimic every aspect of AD, they allow high throughput screening of pharmacological drugs. Moreover, the presence of single keratinocytes is an advantage for studying and understanding their role in the pathophysiology of AD.

6. Conclusion

RHE is a frequent research technique that results in numerous axes of studies on pathologies with epidermal involvement. Several teams have created their own AD models by mimicking its features as best as possible. Each team used methods to modify their culture medium, which are summarized in Table I, to induce AD. Although these *in vitro* models of RHE that mimic AD are numerous, none of them could reproduce an epidermis with all the characteristics of AD, in particular the hyperinnervation.

Each model focuses on one or more aspects of the pathophysiology of AD. Thus, in the case of a study of AD through RHE, the choice of its model is paramount according to the study objectives and characteristics of the model.

One of the advantages of RHE models of AD is the possibility to test the effects of local treatments developed by pharmaceutical companies *in vitro* with high throughput while limiting the use of animals.

Conflict of interest

None.

Funding

This article has no funding source.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.015>.

References

- [1] J.I. Silverberg, N.K. Garg, A.S. Paller, A.B. Fshbein, P.C. Zee, Sleep disturbances in adults with eczema are associated with impaired overall health: a US population-based study, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 56–66.
- [2] T.E. Shaw, G.P. Currie, C.W. Koudelka, E.L. Simpson, Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 national survey of children's health, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 67–73.
- [3] F.J. Dalgard, U. Gielert, L. Tomas-Aragones, L. Lien, F. Poot, G.B.E. Jemec, L. Misery, C. Szabo, D. Linder, E. Sampogna, A.W.M. Evers, J.A. Halvorsen, F. Balieva, J. Szepletowski, D. Romanov, S.E. Marron, I.K. Altunay, A.Y. Finlay, S.S. Salek, J. Kupfer, the psychological burden of skin diseases: a cross-sectional multicenter study among dermatological out-patients in 13 European countries, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 984–991.
- [4] A.M. Drucker, A.R. Wang, W.-Q. Li, E. Severson, J.K. Block, A.A. Qureshi, The burden of atopic dermatitis: summary of a report for the national eczema association, *J. Invest. Dermatol.* 137 (2017) 26–30.
- [5] A. Frankart, J. Malaise, E. De Vuyst, F. Minner, C.L. de Rouvroit, Y. Poumay, Epidermal morphogenesis during progressive *in vitro* 3D reconstruction at the air-liquid interface, *Exp. Dermatol.* 21 (2012) 871–875.
- [6] H. Hammad, B.N. Lambrecht, Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity, *Immunity* 43 (2015) 29–40.
- [7] P.M. Elias, M. Schmuth, Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9 (2009) 437–446.
- [8] W. Peng, N. Novak, Pathogenesis of atopic dermatitis, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 45 (2015) 566–574.
- [9] A. Heratizadeh, T. Werfel, Anti-inflammatory therapies in atopic dermatitis, *Allergy* 71 (2016) 1666–1675.
- [10] L. Misery, Atopic dermatitis and the nervous system, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 41 (2011) 259–266.
- [11] E. Rodriguez, H. Baurecht, E. Herberich, S. Wagenpfeil, S.J. Brown, H.J. Cordell, A.D. Irvine, S. Weidinger, Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) 1361–1370 e7.
- [12] A. Sandilands, C. Sutherland, A.D. Irvine, W.H.I. McLean, Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 1285–1294.
- [13] E. Candi, R. Schmidt, G. Melino, The cornified envelope: a model of cell death in the skin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 328–340.
- [14] M. Le Larmer, I. Pellerin, M. Reymier, I. Cau, V. Pendaries, C. Leprince, M.-C. Méchin, G. Serre, C. Paul, M. Simon, Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis, *Biol. Chem.* 396 (2015) 1163–1179.
- [15] N.A. Soter, Morphology of atopic eczema, *Allergy* 44 (Suppl. 9) (1989) 16–19.
- [16] B.E. Kim, D.Y.M. Leung, M. Boguniewicz, M.D. Howell, Iorocrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6, *Clin. Immunol. Orlando Fla* 126 (2008) 332–337.
- [17] S.J. Brown, K. Kroboth, A. Sandilands, L.E. Campbell, E. Pohler, S. Kezic, H.J. Cordell, W.H.I. McLean, A.D. Irvine, Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 98–104.
- [18] S.J. Brown, W.H.I. McLean, One remarkable molecule: filaggrin, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 751–762.
- [19] S. Bonness, T. Bieber, Molecular basis of atopic dermatitis, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7 (2007) 382–386.
- [20] S. Weidinger, E. Rodriguez, C. Stahl, S. Wagenpfeil, N. Klopp, T. Illig, N. Novak, Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 724–726.
- [21] P.M. Elias, Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 2131–2133.
- [22] M. Janssens, J. van Smeden, G.S. Gooris, W. Bras, G. Portale, P.J. Caspers, R.J. Vreeken, T. Hankemeier, S. Kezic, R. Wolterbeek, A.P. Lavrijsen, J.A. Bouwstra, Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 2755–2766.
- [23] S. Weidinger, N. Novak, Atopic dermatitis, *Lancet Lond. Engl.* 387 (2016) 1109–1122.

- [24] A.S. Paller, K. Kabashima, T. Bieber, Therapeutic pipeline for atopic dermatitis: end of the drought? *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (September (3)) (2017) 633–643.
- [25] C. Cornelissen, Y. Marquardt, K. Czaja, J. Werzel, J. Frank, J. Lüscher-Firzlaff, B. Lüscher, J.M. Baron, IL-31 regulates differentiation and flaggrin expression in human organotypic skin models, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (February (2)) (2012) 426–433 433. e1–8.
- [26] J. Seltmann, L.M. Roessner, F.W. von Hesler, M. Wittmann, T. Werfel, IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of flaggrin, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (June (6)) (2015) 1659–1661 e4.
- [27] S. Noda, J.G. Krueger, E. Guttman-Yassky, The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (2015) 324–336.
- [28] S.R. Wilson, L. Thé, L.M. Batia, K. Beattie, G.E. Katibah, S.P. McClain, M. Pellegrino, D.M. Estandian, D.M. Bautista, The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch, *Cell* 155 (2013) 285–295.
- [29] T. Takai, X. Chen, Y. Xie, A.T. Vu, T.A. Le, H. Kinoshita, J. Kawasaki, S. Kamijo, M. Hara, H. Ushio, T. Baba, K. Hiratsubo, S. Ikeda, H. Ogawa, K. Okumura, TSLP expression induced via toll-like receptor pathways in human keratinocytes, *Methods Enzymol.* 535 (2014) 371–387.
- [30] K. Tatsuno, T. Fujiyama, H. Yamaguchi, M. Waki, Y. Tokura, TSLP directly interacts with skin-homing Th2 cells highly expressing its receptor to enhance IL-4 production in atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 3017–3024.
- [31] V. Soumelis, P.A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerman, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt, R. F. Bazan, R.A. Kastelein, Y.-J. Liu, Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 673–680.
- [32] O. Gouin, N. Lebonvallet, K. L. Herondelle, C. Le Gall-Ianotto, V. Buhé, E. Plé-Gautier, J.-L. Carré, L. Lefeuvre, L. Misery, Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin, *Exp. Dermatol.* 24 (2015) 723–726.
- [33] N. Castex-Rizzi, M. F. Galliano, M. F. Aries, H. Hernandez-Pigeon, C. Vaisiere, H. Delga, A. Caruana, C. Carrasco, M. L. Evêque, H. Duplan, S. Besou-Touya, In vitro approaches to pharmacological screening in the field of atopic dermatitis, *Br. J. Dermatol.* 170 (2014) 12–18.
- [34] É. De Vuyst, S. Giltaire, C. Lambert de Rouvroit, A. Chrétien, M. Salmon, Y. Poumay, The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures, *Arch. Dermatol. Res.* 307 (2015) 309–318.
- [35] E. De Vuyst, S. Giltaire, C. Lambert de Rouvroit, J. Malaisse, A. Mound, M. Bourtembourg, A.F. Nikkels, A. Chrétien, M. Salmon, Y. Poumay, MβCD concurs with IL-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis, *Exp. Dermatol.* (2016). doi: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.13113>.
- [36] T. do Nascimento Pedrosa, E. De Vuyst, A. Mound, C. Lambert de Rouvroit, S.S. Maria-Engler, Y. Poumay, Methyl-β-cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model, *Arch. Dermatol. Res.* 309 (2017) 63–69.
- [37] S.L. Bogiatzi, I. Fernandez, J.-C. Bichet, M.-A. Marloie-Provost, E. Volpe, X. Sastre, V. Soumelis, Cutting edge: proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes, *J. Immunol. Baltim. Md. 178 (2007) (1950) 3373–3377*.
- [38] S.M. Farley, D.E. Purdy, O.P. Ryabinina, P. Schneider, B.E. Magun, M.S. Jordanov, Fas ligand-induced proinflammatory transcriptional responses in reconstructed human epidermis. Recruitment of the epidermal growth factor receptor and activation of MAP kinases, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 919–928.
- [39] M.O. Danso, V. van Drogenen, A. Mulder, J. van Esch, H. Scott, J. van Smeden, A. El Ghalbzouri, J.A. Bouwstra, TNF-α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents, *J. Invest. Dermatol.* 134 (2014) 1941–1950.
- [40] P. Rouaud-Tinguely, D. Boudier, L. Marchand, V. Barruche, S. Bordes, H. Coppin, M.P. Roth, B. Closs, From the morphological to the transcriptomic characterization of a compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis, *Br. J. Dermatol.* 173 (2015) 1006–1014.
- [41] V. Pendaries, J. Malaisse, L. Pellerin, M. Le Lamer, R. Nachat, S. Kezic, A.M. Schmitt, C. Paul, Y. Poumay, G. Serre, M. Simon, Knockdown of flaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 134 (December (12)) (2014) 2938–29294.
- [42] V. Pendaries, M. Le Lamer, L. Cau, B. Hansmann, J. Malaisse, S. Kezic, G. Serre, M. Simon, In a three-dimensional reconstructed human epidermis flaggrin-2 is essential for proper cornification, *Cell. Death Dis.* 6 (2015) e1656.
- [43] N. Lebonvallet, C. Jeanmaire, L. Danoux, P. Sibille, G. Pauly, L. Misery, The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research, *Eur. J. Dermatol.* 20 (2010) 671–684.
- [44] A. Tanaka, Y. Amagai, K. Oida, H. Matsuda, Recent findings in mouse models for human atopic dermatitis, *Exp. Anim.* 61 (2012) 77–84.
- [45] E.D. Son, H.J. Kim, T. Park, K. Shin, I.H. Bae, K.M. Lim, E.G. Cho, T.R. Lee, *Staphylococcus aureus* inhibits terminal differentiation of normal human keratinocytes by stimulating interleukin-6 secretion, *J. Dermatol. Sci.* 74 (April (1)) (2014) 64–71.

Further reading

- T. Werfel, J.P. Allam, T. Biedermann, K. Eyerich, S. Gilles, E. Guttman-Yassky, W. Hoetzenecker, E. Knol, H.U. Simon, A. Wollenberg, T. Bieber, R. Lauener, P. Schmid-Grendelmeier, C. Traidl-Hoffmann, C.A. Akdis, Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (August (2)) (2016) 336–349.

Human skin explant

Contrairement aux EHRs, les modèles d'HSE constituent des modèles de peau plus complexe en raison de la présence d'un derme-équivalent. L'importance de la communication kératinocytes-matrice extracellulaire du derme produite par les fibroblastes a été démontrée à plusieurs reprises, bien que les médiateurs sous-jacents ne soient pas encore entièrement compris (Marionnet et al., 2006; Werner et al., 2007). Plusieurs modèles d'HSE ont été mis en place et répertoriés dans la revue de De Vuyst (De Vuyst et al., 2017). De même que pour les modèles d'EHR, 2 grandes approches ont été effectués :

- La première selon l'hypothèse « inside-outside » : l'environnement pro-inflammatoire Th2, en particulier avec les IL-4 et 13, agit sur l'épiderme. Les kératinocytes sécrètent de la TSLP qui active la boucle de l'inflammation, la composition lipidique de l'épiderme est altérée, ainsi que la barrière épidermique avec une diminution de l'expression de la filaggrine, la loricrine et l'involucrine.
- La seconde selon l'hypothèse « outside-inside » : l'altération de la perméabilité épidermique liée à une atteinte des protéines de la couche cornée (filaggrine, loricrine et involucrine) et de la composition lipidique entraînent une augmentation de la pénétration de facteurs exogènes. Les kératinocytes sont stimulés, en particulier *via* leur TLRs, et sécrètent de la TSLP qui active les cellules immunitaires de la voie Th2.

La première consistait à évaluer l'effet des cytokines Th2. Dans son modèle Kamsteeg et *al.* stimulaient un HSE avec les cytokines Th2 IL-4/IL-13 et observaient des caractéristiques morphologiques similaires à celles de la peau atopique lésionnelle ainsi qu'une expression accrue des gènes associés à la DA (Kamsteeg et al., 2011).

La seconde avait pour but d'analyser les effets de l'altération de la barrière cutanée en créant un déficit en filaggrine par l'intermédiaire de micro-acide riboxynucléique (ARN). Dans leur modèle, Kuchler et *al.* montraient une perturbation du développement de la couche cornée et l'apparition d'une spongiose (Küchler et al., 2011). Dans un autre modèle, la perméabilité de la barrière épidermique était accrue mais aucune altération de la composition lipidique ou de la différenciation des kératinocytes (Mildner et al., 2010).

Hönzke et *al.* ont poussé cette approche un peu plus loin, en étudiant l'impact des cytokines Th2 IL-4/IL-13 sur une peau avec un déficit induit en filaggrine (Hönzke et al., 2016). L'ajout de cytokines Th2 entraînait un épaissement de l'épiderme et une augmentation significative du pH de la surface de la peau. De manière globale, les HSE avec déficit en filaggrine étaient plus sensibles aux effets des cytokines Th2 que les modèles HSE sans déficit en filaggrine.

b. Explant cutané

Parmi les modèles *in vitro*, les explants cutanés se rapprochent encore plus du *in vivo* que les HSE. Les explants cutanés possèdent un derme physiologique avec des fibroblastes mais également des cellules endothéliales et des cellules immunitaires, même si ces dernières disparaissent rapidement de la culture (Chéret et al., 2020). De même, au niveau de l'épiderme, des kératinocytes ainsi que des cellules de Langerhans, de Merkel ou des mélanocytes sont retrouvés. Ce modèle est donc au plus près de la réalité (Zhou et al., 2018).

Très peu de modèles d'explants cutanés avec caractéristique de DA existent. Bogiatzi et *al.* ont montré que les cytokines Th2 (IL-4/IL-13) associées à des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α /IL-1 α) pendant 48 h agissaient en synergie sur la production de TSLP dans des explants cutanés (Bogiatzi et al., 2007; De Vuyst et al., 2016). L'IL-8 était

également augmentée. Cependant les auteurs ne se sont pas intéressés aux caractéristiques morphologiques de l'explant après ajout du cocktail cytokinique, le phénotype de DA n'est donc pas confirmé pour ce modèle.

3. Autres modèles *in vitro*

a. Cellules immunitaires

Les cellules immunitaires, en particulier *via* la sécrétion de cytokines Th2 jouent un rôle important dans la DA. Quelques études ont été réalisées mais l'incorporation de lymphocytes ou d'autres cellules immunitaires demandent une maîtrise et une expertise bien particulière (Engelhart et al., 2005; Löwa et al., 2018).

b. Innervation cutanée

Comme expliqué précédemment, l'innervation cutanée, à la fois *via* le prurit et l'inflammation neurogène, fait partie intégrante des mécanismes physiopathologiques de la DA. Or, un seul modèle s'est intéressé à l'interaction entre les kératinocytes et les fibres nerveuses sensorielles. Dans son modèle, Roggenkamp et *al.* ont étudié un modèle construit à partir de cellules de peau de patients atteints de DA. Les fibres nerveuses provenaient de GRD de porc et étaient fixés sous un derme équivalent sur lequel était déposé des kératinocytes de patient atteint de DA (Roggenkamp et al., 2013). L'innervation induisait un épaissement de l'épiderme, encore plus prononcé dans les modèles de peau atopique en raison de l'augmentation de l'excroissance des neurites et une libération accrue de CGRP.

CONTEXTE

La DA est une maladie inflammatoire chronique évoluant par poussée qui débute généralement dans la petite enfance et peut se poursuivre jusqu'à l'âge adulte (Barbarot et al., 2018). En effet, le prurit fait partie intégrante de la maladie et est au premier plan des plaintes du patient (Weidinger & Novak, 2016). Et plus la DA est sévère et plus le prurit est intense, entraînant des troubles du sommeil et une altération de la qualité de vie (Huet et al., 2019).

La DA est multifactorielle et implique des facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux dont l'étiologie n'est pas encore complètement comprise mais, sa physiopathologie de mieux en mieux connue ouvre la voie à de nouvelles thérapies (Huet et al., 2020). Le dérèglement du système immunitaire (inné et adaptatif) et l'altération de la barrière cutanée sont deux altérations fondamentales à l'origine de l'inflammation cutanée et engendrent un cercle vicieux.

La mise en place de modèles d'étude *in vitro* de la DA est un véritable challenge. En effet, ces modèles doivent reproduire au mieux les différentes caractéristiques de cette pathologie, que ce soit au niveau protéique, lipidique, du microbiote et de l'environnement inflammatoire. De nombreux modèles existent et nous avons effectué une revue de la littérature des modèles d'épidermes humain reconstruits mimant la DA (Huet et al., 2018). Cette revue permet de faire le point sur la physiopathologie de la DA, ou du moins les éléments actuellement modélisables, et d'analyser les forces et faiblesses de ces modèles. Parmi ces faiblesses nous pouvons évoquer la présence unique de kératinocytes alors que l'épiderme est constitué de plusieurs types cellulaires, et l'absence de derme. En cela, les modèles 3D d'explant cutané permettent d'obtenir un modèle plus proche de la réalité. Ces modèles possèdent du derme et donc des fibroblastes qui sont en communication étroite avec les kératinocytes, mais également les autres types cellulaires présents dans la peau (cellules de Langerhans, mélanocytes ou cellules de Merkel). Il ressort également l'absence de prise en compte d'un élément essentiel : les interactions entre les terminaisons nerveuses du système

nerveux sensoriel et l'épiderme ainsi que l'inflammation neurogène cutanée qui en résulte (Gouin et al., 2015). En effet, le prurit naît au niveau des terminaisons nerveuses libres présentes dans l'épiderme. Les intégrer dans de tels modèles semble donc indispensable à l'étude et à une meilleure compréhension de la DA et du prurit associé.

Dans ce contexte, un modèle d'étude *in vitro* de DA réinnervé est nécessaire à la fois pour poursuivre l'étude de la compréhension des mécanismes de la DA et du prurit associé et également pour pouvoir tester les nouvelles molécules et évaluer leur impact sur les mécanismes de la DA.

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail était de mettre en place un modèle d'explant humain « DA-like » réinnervé pour l'étude de la physiopathologie du prurit de la DA.

- La première étape était de définir l'environnement permettant de reproduire sur notre modèle les caractéristiques de DA. Pour cela il fallait :
 - Choisir les molécules du cocktail inflammatoire,
 - Définir leurs concentrations d'utilisation,
 - Déterminer les conditions d'activation (simple ou double activation par le cocktail),
 - Choisir les marqueurs de l'inflammation et de l'altération de la barrière cutanée.

- La deuxième étape était de réinnervé l'explant cutané dans un contexte inflammatoire Th2 et d'évaluer l'impact de cette innervation sur les marqueurs préalablement définis.

- La troisième étape consistait à évaluer le potentiel des neurones sensoriels dérivés de SKPs à remplacer les neurones sensoriels de rat dans notre modèle d'explant cutané humain « DA-like », afin d'obtenir un modèle 100% humain.

MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire

1. Conditions de culture cellulaire

Toutes les manipulations ont été effectuées stérilement sous un poste de sécurité microbiologique de type 2 (PSM). Tous les milieux de culture étaient supplémentés en antibiotiques Normocin® InvivoGen. La culture des cellules et des tissus était réalisée à 37°C dans une étuve saturée en humidité dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les références des milieux et des solutions utilisées sont présentées en annexe.

2. Cultures primaires de kératinocytes humains

a. Obtention des kératinocytes

Les kératinocytes provenaient de prélèvements de peaux humaines issus de chirurgie plastique (abdominoplastie) dans le cadre d'une convention établie entre le laboratoire du LIEN et le Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Brest. Les prélèvements étaient anonymisés et la non-opposition du patient accompagnait le prélèvement. Ils étaient pris en charge au laboratoire dans les 24 heures après la chirurgie. Après désinfection des prélèvements par passages à l'éthanol 70 % et rinçage au Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), des lambeaux de peau de 2 à 5 mm de larges étaient prélevés puis déposés dans un bain à 25 U/mL de Dispase® toute la nuit à 4 °C. L'épiderme était ensuite séparé mécaniquement du derme puis incubé avec de la trypsine-Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) 3 fois 15 minutes à 37 °C. Entre chaque incubation, les lambeaux d'épiderme étaient rincés au DPBS. Les débris étaient filtrés puis l'activité de la trypsine était inhibée par du « fœtal bovine sérum » (FBS). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 400 g pendant 5 minutes puis le culot cellulaire, re-suspendu dans du « keratinocytes serum-free medium »

(KSFM) supplémenté avec de l' « epidermal growth factor » (EGF) humain et de l'extrait d'hypophyse bovin (= KSFM complet), etensemencé dans une flasque stérile. Cette dernière a ensuite été placée dans l'incubateur.

b. Entretien et différenciation des kératinocytes

Les kératinocytes primaires non différenciés étaient entretenus dans du KSFM et le milieu était changé 2 fois par semaine. A 80 % de confluence, les kératinocytes étaient décollés par action de la trypsine pendant 5 minutes à 37 °C, puis ils étaient utilisés à la concentration voulue. Afin d'obtenir des cultures primaires de kératinocytes différenciés, les cellules étaient incubées pendant 16 heures dans du Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) contenant 1,8 mM de Ca^{2+} .

3. Cultures primaires de neurones sensoriels

a. A partir de ganglions rachidiens dorsaux de rat

Obtention des neurones sensoriels primaires de rats

Par respect de la réglementation en vigueur et sous atmosphère « stérile » (zone de confinement, niveau de sécurité biologique 2, animalerie centrale de l'UBO), des rats nouveau-nés âgés de 2 à 5 jours étaient sacrifiés par décapitation et fixés en décubitus ventral. La peau du dos était enlevée à l'aide d'une pince et de petits ciseaux. Pour atteindre les GRDs, la colonne vertébrale était dégagée puis à l'aide de petits ciseaux, elle était séparée en deux longitudinalement. Chaque GRD était extrait sous loupe binoculaire à l'aide d'une pince fine puis aussitôt placé dans du milieu DMEM/ DMEM Ham's F12 medium (DMEM-F12). Les prélèvements étaient transférés en salle de culture cellulaire du LIEN. Pour la dissociation des

cellules nerveuses et des cellules gliales du GRD, les cellules étaient centrifugées quelques secondes à 400 g puis mis en suspension puis les ganglions étaient placés pendant 35 minutes dans de la collagénase de type IV à 200 U/mL à 37° C. La dissociation était réalisée mécaniquement par l'intermédiaire d'aller-retour à la pipette avec un cône 1000 µl puis 100 µl. Cette étape était répétée 2 fois. Suite à la dissociation mécanique à la pipette, la totalité des cellules étaitensemencée dans leur milieu d'entretien expliqué ci-dessous (Partie I- 3.a Matériel et Méthodes). L'équivalent d'un tiers de raton par puit était utilisé (pour une plaque 12 puits).

Entretien des neurones sensoriels primaires de rats

Les neurones sensoriels étaient entretenus dans du DMEM/DMEMF12 (1 :1) supplémentés avec 100 ng/mL de « Nerve growth factor » (NGF), 10 ng/mL de « Brain-Derived Neurotrophic Factor » (BDNF), 10 ng/mL d'hydrocortisone, 10 µg/mL d'insuline et du B27 dilué 50 fois. Les neurones sensoriels étaient entretenus sur 4 - 5 jours avant d'être traités.

b. A partir de skin-derived precursors humains

Obtention des skin-derived precursors

L'obtention des SKPs était réalisée selon le protocole adapté et modifié par Lebonvallet et *al.*, 2012. Les SKPs étaient obtenus à partir des mêmes prélèvements issus de chirurgie plastique que les kératinocytes (Partie I-2a Matériel et Méthodes). Des lambeaux de peau de 2 mm de large sur 6 cm de long étaient prélevés après réalisation d'une désinfection des prélèvements par passages à l'éthanol 70 % et puis rinçage au DPBS. Les lambeaux étaient rincés dans une solution de DPBS additionnée d'antibiotiques. La dissociation était

réalisée dans 250 µg/ml de thermolysine à 4 °C toute la nuit puis 2 heures à 37 °C. Ainsi le derme a pu être séparé mécaniquement de l'épiderme puis mis à incuber dans 250µg/ml de collagénase IV pendant 3 heures à 37 °C. Après centrifugation pendant 10 minutes à 700 g, le surnageant était vidé et 35 mL de trypine/EDTA était ajouté pendant 35 minutes à 37 °C. Après une deuxième centrifugation de 10 minutes à 700 g, le culot était re-suspendu énergiquement dans du DMEM. Puis les cellules contenues dans le surnageant sont passées à travers à un filtre de 70 µm. Cette étape était renouvelée 2 fois puis les cellules centrifugées 5 minutes à 90 g. Le culot cellulaire était homogénéisé dans du DMEM/F12 pour éliminer les débris (en particulier de collagène) et centrifugé 5 minutes à 90 g puis déposer dans une boîte de Petri avec son milieu de culture (Partie I-4b Matériel et Méthodes).

Entretien des skin-derived precursors humains

Le milieu de culture des SKPs était composé de DMEM/DMEMF12 (3 : 1) avec du NeuroBrew-21 without vitamin A (NB21-A) 50X, du « leukemia inhibitory factor » (LIF) à 10 ng/ml, de l'« epidermal growth factor » (EGF) à 20 ng/ml et du « fibroblast growth factor 2 » (FGF-2) à 40 ng/ml. Celui-ci était changé 2 fois par semaine : une fois lors de la dissociation et une fois pour renouveler le milieu de culture. La dissociation des cellules en suspension sous forme de neurosphères (figure 12) était réalisée de la façon suivante : les cellules étaient centrifugées 5 minutes à 200 g puis re-suspendues dans du DPBS afin d'effectuer la dissociation mécanique par l'intermédiaire d'une pipette avec un cône de 1000 µL. Les cellules étaient de nouveau centrifugées et re-suspendues dans leur milieu de culture afin d'être déposées dans une nouvelle boîte de Petri. Pendant 2 à 3 semaines, les cellules étaient transférées dans une nouvelle boîte de Petri de manière hebdomadaire jusqu'à l'adhérence des cellules sous forme de neurosphères où ensuite seul le milieu était changé.

Après adhérence des neurosphères dans la boîte de Petri, les cellules continuaient à proliférer autour de celles-ci. Afin de leur permettre une prolifération et croissance optimale, les SKPs étaient ensuite décollés à l'aide d'un cell scraper puis déposés et maintenus en flasque.

Différenciation des skin-derived precursors humains en neurones sensoriels

La différenciation des SKPs était réalisée selon le protocole publié par Bataille et al. en 2020 et résumé dans le tableau 5 (Bataille et al., 2020). Un « coating » des flasques était réalisé en 2 étapes : une première solution de la poly-L-ornithine (15 µg/mL) dans du DPBS froid disposée à 4 °C toute la nuit. La deuxième étape s'effectuait le lendemain avec le retrait du milieu puis l'ajout de la laminine (1 µg/ml) et de fibronectine (50 µg/ml) dans du DPBS froid. La flasque était laissée pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules étaient déposées à une densité de $12 \cdot 10^3$ cellules/cm² dans les flasques pré-coatées. Les SKPs ont proliférés dans leur milieu de culture comme décrit précédemment pendant quelques jours pour atteindre une confluence de 50 à 60 % avant l'induction de facteurs nécessaires à leur différenciation (figure 12). Pour amorcer la différenciation en neurones sensoriels, le milieu de culture des SKPs était remplacé par du milieu contenant du DMEM/F12/Neurobasal (1 : 1 : 2) qui contenait du NB21-A 100X, du N2 200X, 3 µM de CHIR99021, 0,5 µM de purmorphamine (PMA) et de l'acide ascorbique à 150 µM. Ce milieu était changé tous les jours pendant 10 jours.

Ensuite, pendant 2 jours, le PMA et l'acide ascorbique étaient retirés du milieu (milieu CHIR). Pour la suite de la différenciation en neurones sensoriels, 10 ng/mL de « Bone morphogenetic protein 4 » (BMP4) était ajouté au milieu contenant déjà du N2, NB21-A et du CHIR99021 (milieu CHIR/BMP4) pendant 8 jours (figure 12).

Maturation des neurones sensoriels

Pour la maturation des neurones sensoriels, le milieu utilisé était composé de N2 et NB21-A auquel était ajouté des facteurs neurotrophiques : 100 ng/mL de NGF, 10 ng/mL de « glial cell line-derived neurotrophic factor » (GDNF), 10 ng/mL de BDNF, et 500 μ M d'adénosine monophosphate (AMP) cyclique dibutyryl (dbcAMP) (milieu de maturation). Ce milieu était changé tous les 2 jours pendant 15 jours (tableau 5, figure 12).

Tableau 5 : Protocole de différenciation des SKPs

	<u>Entretien</u>	<u>Différenciation</u>			<u>Maturation</u>
<u>Nom du milieu</u>	Milieu d'entretien	Milieu CHIR/PMA	Milieu CHIR	Milieu CHIR/BMP-4	Milieu de maturation
<u>Composition du milieu</u>	D/DF12 3/1 NB21-A (50X) LIF (10ng/ml) EGF (20 ng/ml) FGF-2 (40 ng/ml)	D/D12/NB 1/1/2 NB-21-A (100X) N2 (200X) CHIR99021 (3 μ M) PMA (0,5 μ M) AA (150 μ M)	D/D12/NB 1/1/2 NB-21-A (100X) N2 (200X) CHIR99021 (3 μ M)	D/D12/NB 1/1/2 NB-21-A (100X) N2 (200X) CHIR99021 (3 μ M) BPM-4 (10ng/ml)	D/D12/NB 1/1/2 NB-21-A (100X) N2 (200X) NGF (100ng/ml) GDNF (10ng/ml) BDNF (10ng/ml) dbc AMP (500 μ M)
<u>Changement du milieu</u>	2 fois par semaine	1 fois par jour J0 à J10	1 fois par jour J11 et J12	1 fois par jour J13 à J20	1 jour sur 2 J21 à J35

Abreviations: AA : Acide ascorbique ; dbcAMP : Adénosine monophosphate cyclique dibutyryl ; D/DF12: DMEM/DMEMF12 ; EGF: Epidermal growth factor, FGF-2: Fibroblast growth factor-2; GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor ; LIF: Leukemia Inhibitory Factor ; NB: neurobasal ; NB-21-A: NeuroBrew-21 without vitamin A; PMA : purmorphamine.

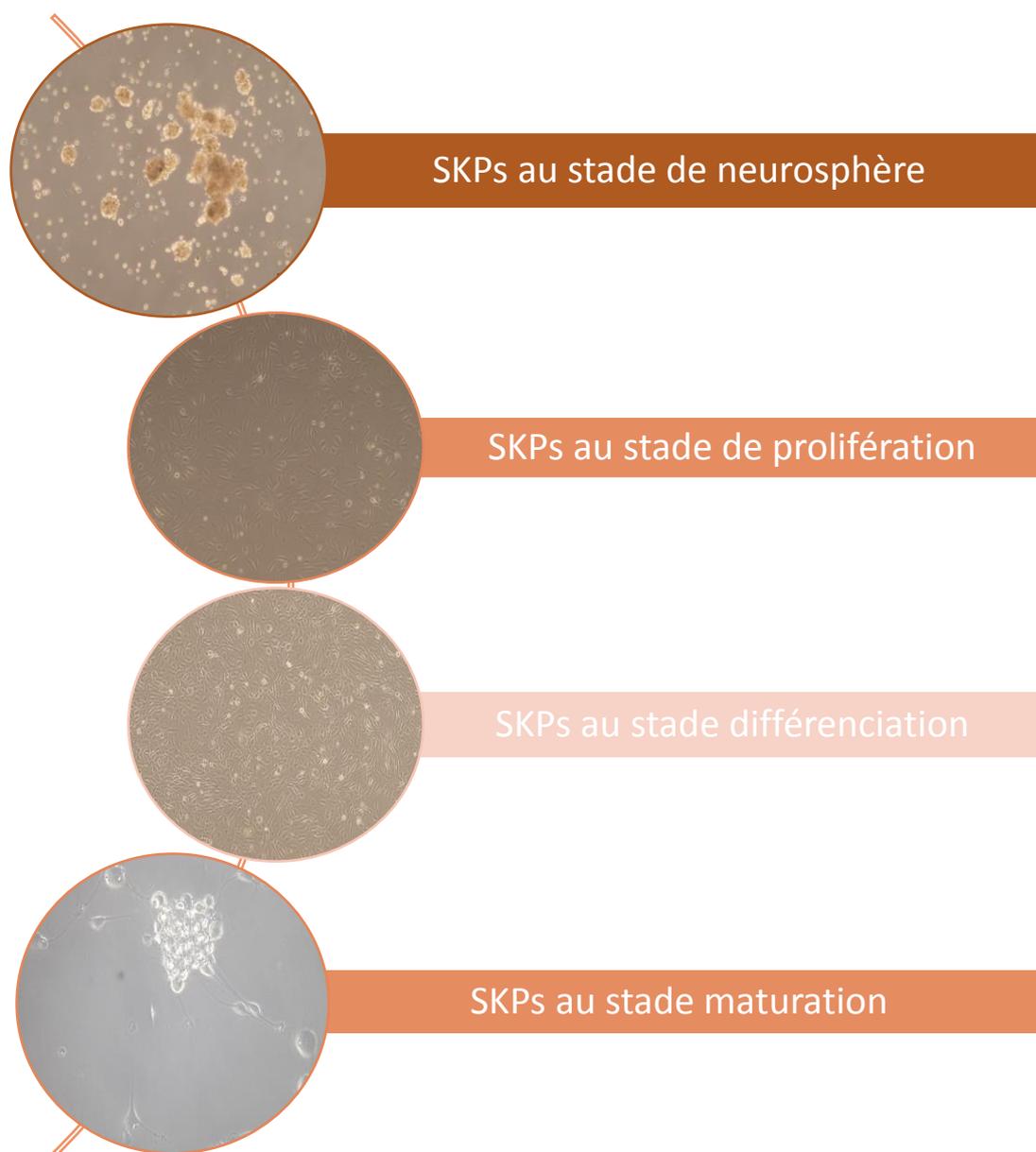


Figure 12 : Images des SKPs selon l'évolution de la culture cellulaire. Photographie en microscopie optique grossissement X20 pour le stade de neurosphère, le stade de prolifération et de différenciation ; grossissement X40 pour le stade de maturation.

4. Co-cultures de neurones sensoriels-kératinocytes

a. Co-culture en 2D

Après 3 à 5 jours de culture, le surnageant de culture des neurones sensoriels était délicatement retiré, puis environ 30 000 kératinocytes humains par cm² étaientensemencés dans du KFSM complet dans des plaques 24 ou 96 puits. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu était remplacé par du DMEM pendant 14 à 16 heures pour différencier les kératinocytes. Enfin, les co-cultures étaient soumises à différents agents pharmacologiques sur des durées variables selon l'expérience prévue.

b. Co-culture en 3D

Obtention d'explants cutanés humains

Les explants cutanés étaient obtenus à partir des mêmes prélèvements issus de chirurgie plastique que les kératinocytes (Partie I-2a Matériel et Méthodes). Après réalisation d'une désinfection des prélèvements par passages de l'éthanol 70 % et du DPBS, des biopsies de 5 mm de diamètre étaient réalisées. Les explants cutanés étaient récupérés à l'aide d'une pince sans griffe puis coupé au niveau du derme superficiel. Ils ont subi différents bains de lavage : 1 avec de l'éthanol 70 % et 2 avec du DPBS. Ils étaient ensuite placés en culture à 37 °C dans leur milieu d'entretien expliqué ci-dessous (Partie I-5b Matériel et Méthodes).

Entretien d'explant cutané

Les explants étaient mis en culture (seul ou avec les neurones sensoriels) dans un milieu contenant du DMEM/DMEMF12 (1 :1) supplémenté avec 25 µg/ml de NGF, 10 µg/ml d'insuline et 10 ng/ml d'hydrocortisone. Le milieu de culture était changé tous les 48 heures.

Co-culture d'explant cutané humain-neurones sensoriels de rats

Les explants cutanés étaient déposés dans les transwells d'une plaque 12 puits (insert de 12 mm) sur les neurones sensoriels de rat préalablement mis en culture quelques jours avant (Matériel et méthodes, I.3). Le milieu de culture était déposé à la fois dans le puit et dans le transwell et contenait du DMEM/DMEMF12 (1 :1) supplémenté en NGF, insuline et hydrocortisone (Partie I- 5.b Matériel et Méthodes). Le milieu de culture était changé toutes les 48 heures.

La co-culture était maintenue pendant 3 à 9 jours selon les différentes expérimentations.

Induction de l'inflammation

L'induction de l'inflammation était réalisée par l'ajout de différentes molécules à différentes concentrations :

- IL-4 et IL-13 à 50 ou 100 µg/ml
- TNF- α à 10 ou 20 ng/ml
- Acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I :C) à 0,5 ou 1 ou 2 ou 3 µg/ml.

Dans les cultures, nous avons effectué soit une « simple » soit une « double » inflammation.

La simple inflammation consistait à déposer dans le milieu une seule fois le cocktail

inflammatoire. La double inflammation consistait à ajouter le cocktail inflammatoire à deux reprises (jour 1 et jour 3 ou jour 1 et jour 4) afin d'obtenir une inflammation chronique.

A la fin de l'expérience, les surnageants étaient congelés avec des anti-protéases (1/100) à -20 °C pour des analyses biochimiques (Partie IV Matériel et Méthodes). Le tapis cellulaire de neurones sensoriels était récupéré dans 500µL de Trizol et les biopsies étaient coupées en deux, une partie directement ajoutée dans un tampon de lyse (PureLink RNA Mini Kit, Life technologies) pour l'analyse transcriptomique, la seconde partie mise dans du paraformaldéhyde (PAF) à 4 % pendant 24-48 heures puis, après rinçage, placée dans du sucrose à 10 % pendant un temps équivalent. Cette 1/2 biopsie était congelée dans de l'azote liquide puis conservée à -80 °C jusqu'à son exploitation en immunohistochimie (Partie III Matériel et Méthodes).

II. Application de composés pharmacologiques : Les agonistes et antagonistes pharmacologiques

Les composés suivants étaient directement appliqués à la concentration indiquée dans le milieu de culture au cours des différentes expériences.

Tableau 6 : différents agonistes et antagonistes pharmacologiques

<u>Agonistes</u>	<u>Cible(s)</u>	<u>Solvant</u>	<u>Concentration(s)</u>	<u>Références&Fournisseurs</u>
IL-1	Récepteur de l'IL-1	DPBS	100 ng/ml	213-ILB-025 R&D systems, Minneanopolis, USA
IL-4	Récepteur de l'IL-4	DPBS	50 et 100 µg/ml	204-IL-050 R&D systems, Minneanopolis, USA
IL-13	Récepteur de l'IL-13	DPBS	50 et 100 µg/ml	201-LB-005 R&D systems, Minneanopolis, USA
TNF- α	Récepteur du TNF- α	DPBS	10 et 20 ng/ml	210-TA/CF R&D systems, Minneanopolis, USA
Poly I :C	Récepteur du Poly I :C	DPBS	1 µg/ml	M2028 - Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Resiniferatoxin (RTX)	TRPV1	DMSO	10 µM	ab120339 – Abcam, Patis, Fr
TSLP	TSLP récepteur	DPBS	100, 50 et 10 ng/ml	SRP4896-20UG, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Acide lactique	Modification du pH	DMEM	0,1%	M2028 - Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr

III. Immunofluorescence

1. Immunohistochimie

Fixés et inclus dans une résine d'enrobage (cryomatrix), des coupes de 10 et 30 μm étaient réalisées pour chaque explant cutané au Cryostat® puis stockées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Après décongélation, les coupes étaient saturées pendant 30 minutes à température ambiante dans du DPBS additionné de 10 % de sérum d'albumine bovine (« Bovine Sera Albumin », BSA).

Les coupes ont ensuite été incubées avec des anticorps (Ac) primaires dans une solution de 1 % de BSA et 0,3 % de Triton X-100 dans du DPBS (tableau 7 Ac primaires) et placées dans une chambre humidifiée soit à température ambiante pour le PAR2 et le protein gene product 9.5 (PGP9.5) pendant la nuit, soit à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les autres Ac. Après trois lavages de 5 minutes à température ambiante en DPBS sous agitation, les coupes étaient incubées avec l'Ac secondaire couplé à un fluorochrome, dilué dans du DPBS supplémenté avec 1 % de BSA, pendant 2 heures à la température ambiante et dans l'obscurité (tableau 8 Ac secondaires). Un contrôle négatif était obtenu en omettant l'Ac primaire. Après 3 nouveaux lavages, une solution de montage Vectashield contenant du 40,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, 100 mg/ml) était utilisée pour colorer les noyaux et les coupes étaient analysées au microscope à immunofluorescence (IF) (microscope AxioStar plus). Les clichés étaient pris avec la caméra AxioCam et analysés avec le logiciel Axiovision. Le temps d'exposition au grossissement X20 était défini pour chaque condition selon l'intensité du témoin négatif. Des photos de l'ensemble de l'épiderme de chaque coupe étaient prises pour la mesure de l'IF. Ainsi, pour la TSLP, l'ensemble de l'épiderme était sélectionné ; pour la filaggrine, la couche granuleuse et cornée ; pour la loricrine, la couche granuleuse ; et pour la cytokératine 10 la couche épineuse et granuleuse. L'intensité de l'IF était mesurée via le logiciel ImageJ®. Pour

le calcul du nombre de fibres nerveuses, la longueur de l'épiderme sur chaque coupe était mesurée via le logiciel ImageJ®. Puis le nombre de fibres nerveuses directement positives sur la longueur de l'épiderme était calculé et rapporté par mm. Les coupes analysées ayant une épaisseur de 30µm, la valeur obtenue était convertie en nombre de fibres par mm².

2. Immunocytochimie

Les cellules (kératinocytes, neurones sensoriels de rat ou issus de SKPs) étaient cultivées sur « flexiperm » puis fixées avec du PAF à 4 % et stockées à -20 °C. Après décongélation, séchage et incubation dans une chambre saturée d'humidité, les coupes étaient saturées avec une solution composée de 10 % de BSA pendant 1 heure à température ambiante. La suite du protocole est identique à celui décrit dans la partie immunohistochimie (Partie III-1 Matériel et Méthodes).

3. Histologie

Fixés et inclus dans une résine d'enrobage (cryomatrix), des coupes de 10 et 30 µm étaient réalisées pour chaque explant cutané au Cryostat® puis stockées à - 80 °C. Certaines coupes étaient envoyées dans le service d'anatomo-pathologie du Professeur Marcorelles pour coloration à l'hématoxyline et éosine.

Tableau 7 : Anticorps primaires

<u>Cibles</u>	<u>Hôte</u>	<u>Dilution</u>	<u>Référence</u>	<u>Fournisseur</u>
ASIC-1	Rabbit	1/500	Ab87514	Abcam
β III tubuline	Mouse	1/1000	Ab78078	Abcam
BRN3A	Rabbit	1/100	Ab81213	Abcam
CGRP	Mouse	1/200	Ab81087	Abcam
Cytokératine 10	Mouse	1/100	ab9025	Abcam
Filaggrine	Mouse	1/100	sc-66192	Santa Cruz
IL-31	Rabbit	1/100	Sc-135154	Santa Cruz
IL-31R	Rabbit	1/100	Ab62579	Abcam
Loricrine	Rabbit	1/100	ab240345	Abcam
Neurofilament 200	Rabbit	1/100	ab8135	Abcam
PAR2	Mouse	1/100	Ab184673	Abcam
Peripherine	Mouse	1/100	Ab4573	Abcam
PGP9.5	Rabbit	1/500	ab27053	Abcam
SP	Mouse	1/100	S1542	Sigma
TSLP	Rabbit	1/100	ab47943	Abcam
TSLPR (CXCL2)	Rabbit	1/50	Ab109623	Abcam
TRPA1	Rabbit	1/1000	Ab58844	Abcam
TRPV1	Goat	1/100	Ab3487	Abcam

Tableau 8 Anticorps secondaires

<u>Réactivité</u>	<u>Hôte</u>	<u>Fluorescence</u>	<u>Référence</u>	<u>Fournisseurs</u>
Rabbit	Goat	FITC	111-095-003	Jackson (interchim)
Mouse	Goat	Alexa 488 Dylight 550	ab6785-1 ab96880	Abcam Abcam
Goat	Donkey	Alexa 488	ab150129	Abcam

IV. Etudes biochimiques et biomoléculaires

1. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules en culture était quantifiée par l'utilisation du sel de tétrazolium (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, MTT), un substrat chromogène réduit en formazan par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes.

Pour la culture de kératinocytes, 10 000 cellules étaient déposées par puits et laissées en incubation pendant 2 jours pour les kératinocytes en prolifération et 1 jour pour les kératinocytes en différenciation. Pour les neurones sensoriels, un raton était disséqué et les GRD dissociés étaient mis en culture pendant 5 jours. Après avoir retiré le milieu de chaque puits et rincer au DPBS, 30 0µL de solution de tétrazolium MTT à 2,5 mg/ml étaient ajoutée à chaque condition. La solution était incubée pendant 2 heures dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO₂, retirée, puis 100 µL de DMSO étaient ajoutés afin de solubiliser les cristaux de formazan formés sous agitation au noir pendant 15 minutes. La lecture de la densité optique (DO) était effectuée à 540 nm à l'aide du lecteur de microplaques « iMark™ microplate absorbance reader ».

2. Cytotoxicité

Les effets cytotoxiques de la trypsination sur les cellules (SKPs) avant et après l'étape de maturation étaient déterminés par le « ToxiLight™ non-destructive bioassay Kit ». L'activité de l'adénylate kinase était évaluée sur 20 µL de surnageants en utilisant la luminescence, selon les instructions du fabricant.

3. Extraction, dosage et analyse des acides riboxynucléiques (ARNs)

a. Isolement et dosages des ARNs des biopsies cutanées

L'extraction était effectuée à l'aide du « PureLink RNA mini kit » en suivant les instructions du fabricant.

Au préalable les explants étaient lysés de façon mécanique à l'aide du « TissueRuptor » (Qiagen) dans 700 µL de tampon de lyse. Ensuite, de l'éthanol à 70 % était ajouté volume à volume dans chaque échantillon, puis l'homogénat était placé sur une colonne d'extraction et centrifugé 60 secondes à 12000 g. Trois rinçages successifs étaient réalisés en centrifugeant 60 secondes à 12000 g avec du « Wash Buffer 1 », puis 3 fois avec le « Wash Buffer 2 ». Finalement, les acides riboxynucléiques (ARNs) de chaque condition étaient solubilisés dans 30 µL d'eau stérile « RNase free », puis quantifiés immédiatement ou congelés à -80 °C.

Les ARNs extraits étaient quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre mesurant l'absorbance à la longueur d'onde de 260 nm. La contamination protéique était quantifiée par la mesure de l'absorbance à 280 nm et la contamination par les solvants à 230 nm. Respectivement, la pureté des échantillons d'ARNs est estimée grâce aux rapports DO 260/280 et DO 260/230. Un ratio A260/A230 compris entre 2.0 – 2.2 et un ratio A260/280 compris entre 1,5 - 2 indiquent une bonne pureté des acides nucléiques.

b. Isolement et dosages des ARNs des kératinocytes et neurones sensoriels (skin-derived precursors)

À la fin des cultures, les kératinocytes ou les neurones sensoriels (issus des SKPs) étaient récupérés avec 500 µl de « Tri-Reagent », mis dans un tube Eppendorf puis stockés à -80 °C. Pour extraire l'ARN, 100 µl de chloroforme étaient ajoutés, puis les échantillons étaient agités. Après 15 minutes, les échantillons étaient centrifugés à 12000g pendant 15 minutes à 2-8 °C. Ensuite, les échantillons étaient composés de 3 phases : la phase aqueuse contenant les ARNs, l'interface contenant les acides désoxyribonucléiques (ADN) et la phase organique contenant les protéines. La phase aqueuse était transférée dans un nouveau tube avec 250 µL de 2-propanolol. Après centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes, le surnageant était jeté. Ensuite, les ARNs précipités étaient nettoyés 3 fois avec de l'éthanol à 75 %, mélangés au vortex et centrifugés à 7500 g pendant 5 minutes. Pour finir, après séchage, les ARNs étaient mélangés avec 10 µl d'eau exempte de RNase. Les ARNs extraits étaient quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre de 260 nm. La pureté des échantillons d'ARN est mesurée par le rapport des deux DO mesurées à 230 et 280 nm (DO 260/280 et 260/230).

4. Reverse transcription et polymerase chain reaction (PCR) en temps réel

a. Synthèse de l'ADN complémentaire (reverse transcription)

Les ARNs totaux étaient rétro-transcrits en ADN complémentaires simple brin (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. Un total de 200 ng d'ARN était prélevé de chaque échantillon et le volume

ajusté à 20 μL avec de l'eau RNase-free. Vingt μL de volume de réaction (mix) étaient ajoutés. La composition du mix, pour 1 échantillon, était 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 multiscrite (50 U/ μl). Les échantillons, de 40 μL , ont ensuite été mis à incuber pendant 10 minutes à 25 °C puis à 37 °C pendant 2 heures. Cette étape était réalisée avec un bloc chauffant « TECHNE TC-4000 » par un thermocycleur à gradient TC-4000 Thermal Cycler. Les ADNc obtenus étaient stockés à – 80 °C jusqu'à utilisation.

b. PCR quantitative (qPCR)

La qPCR reprend le même principe que la PCR classique, c'est-à-dire le cycle de dénaturation, d'hybridation puis d'élongation. 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. Puis, chaque gène d'intérêt sera rapporté à un gène de référence, ici le 18S, afin de normaliser les résultats. La qPCR était réalisée avec le système d'Applied Biosystems (Waltham, MA, USA), StepOne™ Real-Time PCR system. Pour chaque réaction, 1 μL d'ADNc de chaque échantillon, équivalent à 5 μg d'ADNc, étaient ajoutés à 19 μL de « Master Mix SYBR Green » (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) contenant 1 μM d'amorces (olionucléotides sens et antisens) du gène d'intérêt (Tableau 9). Un témoin négatif contenant tous les composants à l'exception de l'ADNc était réalisé pour chaque gène d'intérêt. Les amorces étaient achetées chez Eurogentec (Seraing, Liège, BEL).

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

Les étapes d'amplification étaient les suivantes :

- dénaturation initiale de 10 minutes à 95 °C
- 40 cycles de 15 s à 95 °C puis 1 minute à 60 °C

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la qPCR

<u>Cible</u>	<u>séquence amorce sens (3'-5')</u>	<u>séquence amorce anti-sens (3'-5')</u>	<u>Température d'hybridation utilisée (°C)</u>
PGP9.5	ATT-CAG-GCA-GCC-CAT-GAC-TC	GAG-GTG-GCC-GTC-CAC-ATT-AT	60 °C
CK10	CAG-TCC-CAA-CTG-GCC-TTG-AA	GGG-CCT-GAA-TCT-GTG-AGA-GC	60 °C
Filaggrine	AAG-GAA-CTT-CTG-GAA-AAG-GAA-TTT-C	TTG-TGG-TCT-ATA-TCC-AAG-TGA-TCC-AT	60 °C
Loricrine	GCA-AAC-CTC-GGG-TAG-CAT-CA	GCC-GTC-CAA-ATA-GAT-CCC-CC	60 °C
18S	GGCTACCACATCCAAGGAAGG	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	60 °C
BRN3A	CGT-ACC-ACA-CGA-TGA-ACA-GC	AGG-AGA-TGT-GGT-CCA-GCA-GA	60 °C
PAR2	TGC-TAG-CAG-CCT-CTC-TCT-CC	CCA-GTG-AGG-ACA-GAT-GCA-GA	60 °C
PRDM12	TGT-GGG-AGG-TGT-TCA-ATG-AGG	CAG-GTT-CTG-CTC-CTG-TTC-GT	60 °C
TRPA1	GTG-AAG-TGT-CTG-AGT-GTT-CCC-GT	AGC-TTT-GCA-TCA-TGC-GTC-CA	60 °C
TRPV1	CAA-CAA-GAT-CGC-ACA-GGA-GA	TCC-TTG-CCA-TCA-GGT-GTG-TA	60 °C
TSLPR	ACA-TCC-TCC-ATA-GCC-TTC-ACC	GAG-TGG-CAG-TCC-AAA-CAG-GAA	60 °C

c. Analyse des résultats de qPCR

Chaque réaction d'amplification était réalisée en duplicata. La spécificité de chaque amplification était contrôlée par l'ajout d'une courbe de fusion en fin de cycle de qPCR, ce qui indique la température de dénaturation spécifique de chaque amplicon. La moyenne des « cycle threshold » ou Ct de chaque duplicata était 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. Pour l'analyse des données de qPCR, la méthode de $\Delta\Delta\text{Ct}$ était utilisée. Le principe est le suivant : 1) Le ΔCt de chaque gène était obtenu après soustraction du Ct de 18S au Ct du gène d'intérêt. 2) Le $\Delta\Delta\text{Ct}$ était obtenu après normalisation des échantillons traités par les échantillons contrôle selon le calcul suivant : $\Delta\text{Ct traité} - \Delta\text{Ct contrôle}$. 3) L'expression relative des ARNm pour chaque échantillon était obtenue selon le calcul suivant : $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ qui est la méthode de référence pour la quantification des ARNm (Bustin et al., 2009). L'ensemble des calculs était réalisé manuellement avec le logiciel Microsoft® Office Excel.

5. Dosages biochimiques

a. Dosage de la substance P et calcitonin gene-related peptide

La fonctionnalité des neurones sensoriels (GRD ou dérivés de SKPs) était évaluée par l'analyse de la libération des neuropeptides de SP et CGRP sécrétées dans les milieux de culture à l'aide de kits commerciaux, respectivement « Substance P Parameter Assay Kit » (Cayman) et « CGRP ELISA kit » (SpiBio), en suivant les instructions des fabricants. Les temps de traitements des différentes cultures étaient différents pour la SP et le CGRP ainsi qu'entre les différents types de cultures :

- Les cultures 2D étaient traitées pendant 90 minutes (SP) ou 24 heures (CGRP). Les surnageants étaient récupérés et stockés à -80°C.
- Concernant les cultures 3D, l'ensemble des surnageants étaient récupérés à la fin de la culture. Soit après 8 jours.
- Les neurones sensoriels de rat ou issus des SKPs étaient traités pendant 30 minutes (SP) ou 24 heures (CGRP). Après ajout d'anti-protéase à 1/100, les surnageants étaient récupérés et stockés à - 80 °C.
- La DO de chaque échantillon était déterminée à 415 nm à l'aide du lecteur de microplaque « iMark™microplate absorbance reader », puis la concentration de l'échantillon a pu être quantifiée en rapportant les DO obtenues pour chaque échantillon sur la courbe standard correspondante. Les quantités de neuropeptides libérés étaient exprimées en pg/mL en normalisant les valeurs par rapport aux conditions contrôles correspondantes.

b. Dosage de la « Thymic stromal lymphopoietin »

Les quantités de TSLP des surnageants de cultures ou co-cultures étaient évaluées en utilisant le kit commercial DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) selon les instructions du fabricant. L'ensemble des surnageants était récupéré à la fin des cultures 3D.

La DO était mesurée à 450 nm puis 540 nm à l'aide du lecteur de microplaque « iMark™microplate absorbance reader », puis la concentration de l'échantillon a pu être quantifiée en rapportant les DO obtenues pour chaque échantillon sur la courbe standard correspondante.

6. Analyses statistiques

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

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 1 : Résultats préliminaires

La première étape pour la mise en place de notre modèle consistait à choisir :

- Les molécules du cocktail inflammatoire
- Leur(s) concentration(s)
- Le ou les temps d'activation à effectuer sur nos explants de peau (une seule activation ou des activations répétées)

La deuxième étape se portait sur le choix des éléments à analyser pour juger de la validité de notre modèle.

I. Molécules du cocktail inflammatoire

1. Choix des molécules

Nous nous sommes basés sur les différentes publications décrivant l'utilisation de telles molécules pro-inflammatoires pour mimer l'inflammation de la DA (De Vuyst et al., 2017; Huet et al., 2018).

a. Interleukines (IL)-4 et 13

Les IL-4 et 13 sont 2 IL de la voie Th2. Il s'agit des 2 IL décrites comme primordiales dans la voie Th2 de la DA. La présence de ces IL Th2 est démontrée dans la peau lésionnelle de la DA ainsi que dans la peau non-lésionnelle.

b. Tumor necrosis factor (TNF)- α

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire importante. Elle est présente dans la DA mais également dans d'autres maladies cutanées en particulier le psoriasis. L'association du TNF- α avec les IL-4 et 13 va potentialiser la production de TSLP par les kératinocytes.

c. Acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I :C)

En plus des molécules pro-inflammatoires, certains récepteurs de type TLR jouent un rôle important dans la DA. Le poly I :C est un ARN double brin synthétique constitué d'un brin de poly acide inosinique et d'un brin de poly acide cytidylique appariés. Il est structurellement semblable à l'ARN bicaténaire de certains virus et interagit avec la protéine

TLR3, un récepteur de type Toll présent sur la membrane plasmique de différentes cellules dont les kératinocytes et les cellules dendritiques.

2. Concentration des molécules

a. IL-4, IL-13 et TNF- α

Les différentes molécules du cocktail inflammatoire ayant été définies, nous nous sommes intéressés aux concentrations optimales pour notre modèle. Au vu de la littérature deux concentrations étaient utilisées pour les IL-4 et 13 : 50 et 100 ng/ml. Concernant le TNF- α , il était utilisé dans la littérature à 10 et 20 ng/ml. Nous avons décidé de tester 2 concentrations du cocktail inflammatoire sur des explants cutanés (n=3 avec duplicata) (figure 13) :

- IL-4 et -13 (50 ng/ml) ; TNF- α (10 ng/ml)
- IL 4 et 13 (100 ng/ml) ; TNF- α (20 ng/ml)

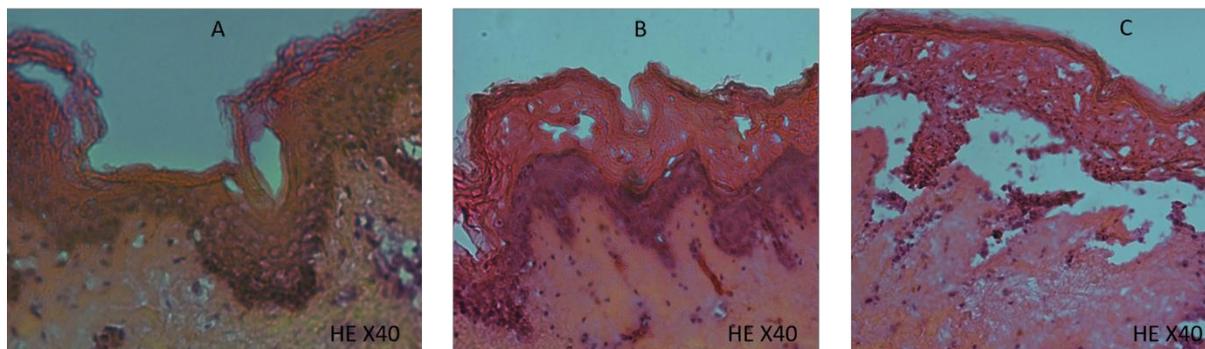


Figure 13 : Modification de l'épiderme par les différentes concentrations du cocktail inflammatoire. Des explants de peau humaine étaient mis en culture soit sans cocktail inflammatoire (témoin, A), soit avec de l'IL-4 et -13 (50 ng/ml) et TNF- α (10 ng/ml) (B), soit avec de l'IL-4 et 13 (100 ng/ml) et du TNF- α (20 ng/ml) (C) et observé en microscopie optique après coloration par Hématoxyline-eosine (grossissement X40 (n=3, duplicata).

L'ajout du cocktail inflammatoire entraînait des modifications de l'épiderme avec une spongiose et une exostose. Ces modifications étaient plus marquées pour les plus fortes concentrations du cocktail. On note lors de l'ajout du cocktail à cette forte concentration un décollement épidermique.

En parallèle, l'expression transcriptomique par PCR de la TSLP sur kératinocytes humains primaires était testée (figure 14).

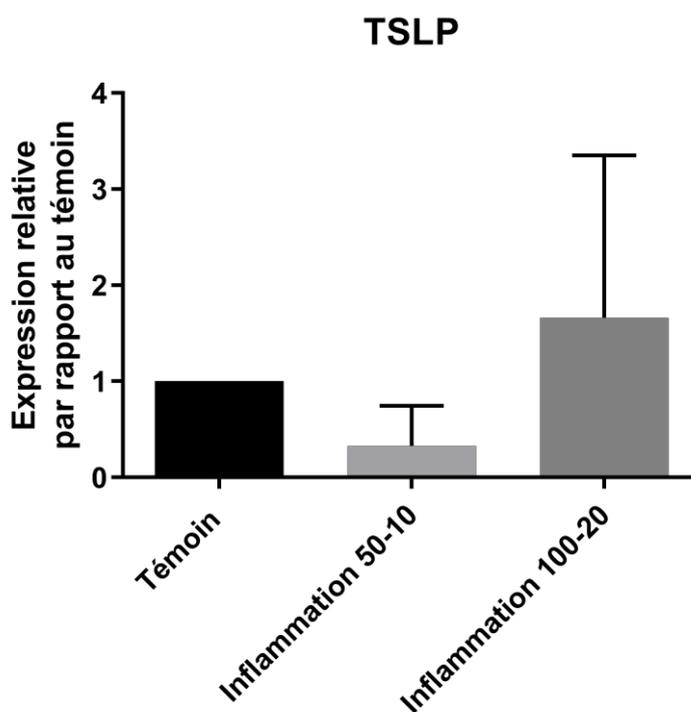


Figure 14 : Modification de l'expression de l'ARNm de la TSLP des kératinocytes primaires humains après ajout des différentes concentrations du cocktail inflammatoire. L'ARNm de la TSLP était augmenté après ajout d'IL-4,13 à 100 ng/ml et TNF- α à 20 ng/ml (n= 3, p=0,64). L'ajout d'IL-4,13 à 50 ng/ml et TNF- α à 10 ng/ml n'entraînait pas d'augmentation d'expression de l'ARNm de la TSLP.

La concentration d'IL-4,-13 à 100 ng/ml et TNF- α à 20 ng/ml produisait à la fois

- Une augmentation d'expression transcriptomique de la TSLP

- La présence de spongiose et d'exostose au niveau de l'épiderme qui sont des caractéristiques histologiques de la DA.

Cependant, le décollement de l'épiderme ne caractérise pas la DA et se retrouve dans des maladies bulleuses comme la pemphigoïde bulleuse ou des maladies toxiques. Devant la suspicion de toxicité de la forte concentration de TNF- α , nous avons réalisé un test de viabilité cellulaire (figure 15).

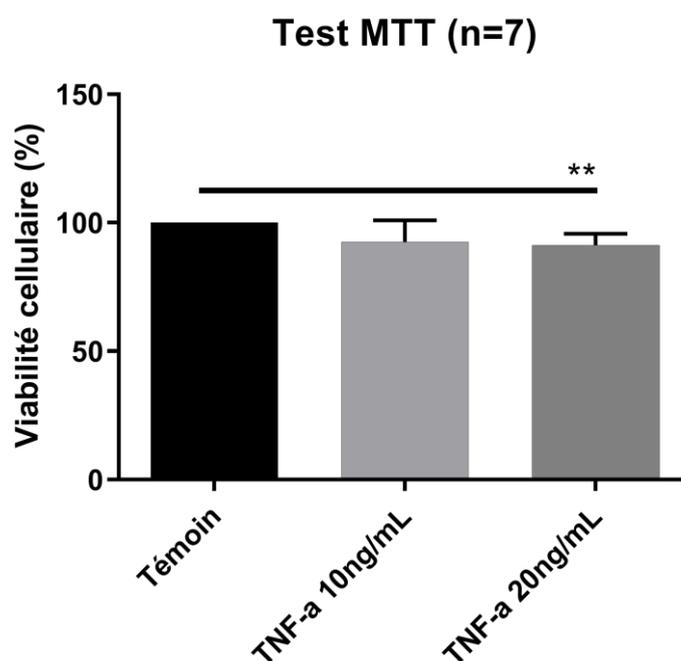


Figure 15 : Toxicité cellulaire induit par le TNF- α à 20ng/ml (test MTT). La viabilité cellulaire des kératinocytes primaires humains n'est pas diminuée par rapport au témoin lors de l'ajout de TNF- α à 10ng/ml. Elle est significativement diminuée lors de l'ajout du TNF- α à 20ng/ml. n=7, **=p<0,01.

Devant la toxicité cellulaire du TNF- α à 20ng/ml, nous avons décidé d'utiliser pour les expériences suivantes le cocktail inflammatoire avec de l'IL-4 et 13 à 100 ng/ml et du TNF- α à 10ng/ml.

b. Poly I:C

Afin de définir la concentration de Poly I:C de notre cocktail inflammatoire, nous avons testé différentes concentrations et regardé s'il existait une différence sur l'expression de TLR3 (figure 16).

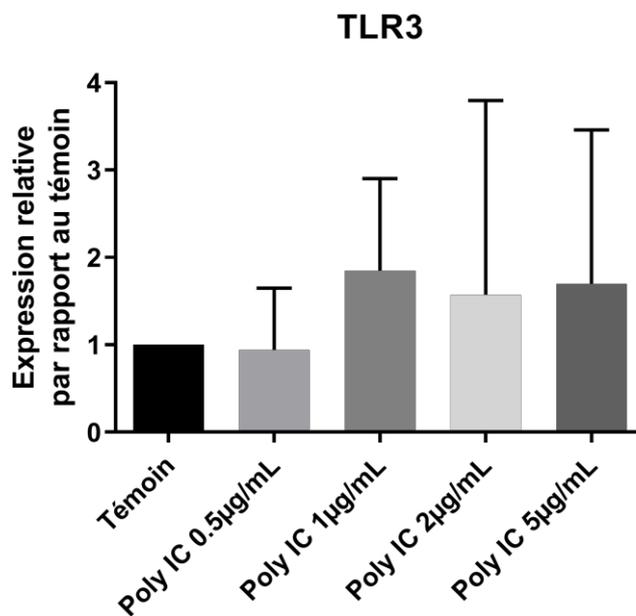


Figure 16 : Augmentation de l'expression de l'ARNm de TLR3 des kératinocytes primaires humains selon la concentration de Poly I:C. Ajout de Poly I:C à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 2 et 5 µg/ml) sur kératinocytes primaires humains (n=2).

Le Poly I:C entraînait une augmentation par 2 de l'expression de TLR3 par les kératinocytes sans effet dose à partir de 1µg/ml. La dose retenue pour les expériences suivantes était de 1µg/ml.

Au vu de l'ensemble des résultats, le cocktail inflammatoire était composé de :

- **IL-4 et 13 à 100 ng/ml**
- **TNF- α à 10ng/ml**
- **Poly I:C à 1µg/ml**

II. Temps d'activation du modèle

L'inflammation cutanée dans une poussée de DA durant plusieurs jours, nous avons effectué une double inflammation : soit à J1-J3 soit à J1-J4 de culture. Pour chaque condition, un contrôle sans TNF- α était réalisé afin d'évaluer le bénéfice de sa présence (figure 17).

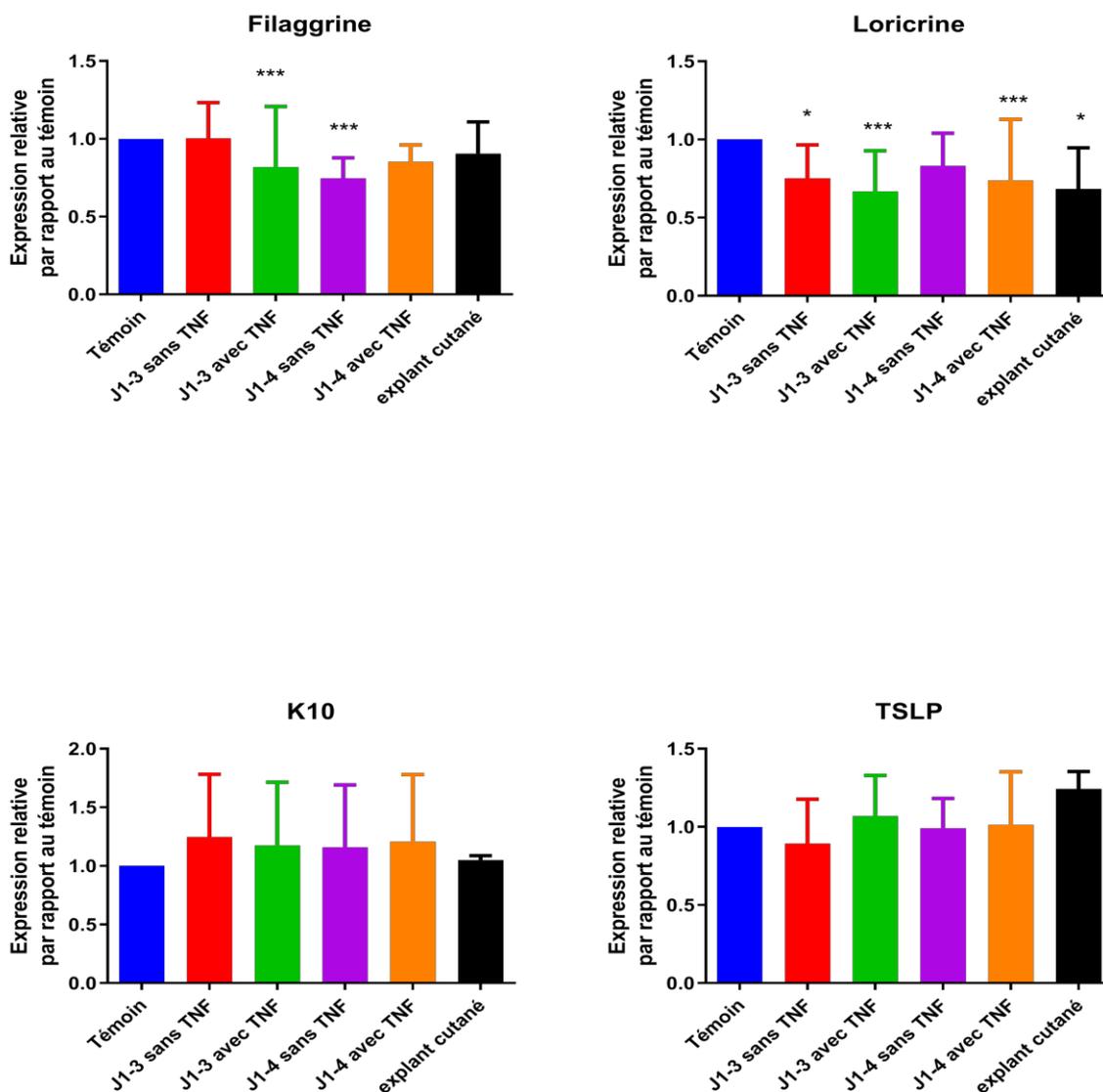


Figure 17 : Test de différents temps d'activation d'explant cutané humain par le cocktail inflammatoire, avec ou sans TNF- α . Immunohistochimie quantitative de la filaggrine, la loricrine, la kératine 10 (K10) et la thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (n= 3, *=p<0,05, ***=p<0,001). Le cocktail inflammatoire (IL-4 et 13 à 100 ng/ml, Poly I:C à 1 μ g/ml +/- TNF- α à 10ng/ml) était ajouté au milieu de culture à J1 et J3 (toutes les 48 heures) ou à J1 et J4 (toutes les 72 heures).

Les protéines de la couche cornée (filaggrine et loricrine) étaient significativement diminuées lors l'activation à J1 et J3 avec TNF- α . L'expression de la kératine 10, protéine des couches plus profondes de l'épiderme, n'était pas différente selon les différentes conditions.

Le marqueur de l'inflammation, la TSLP, était augmenté avec les activations avec TNF- α (J1 et J3 ou à J1 et J4).

Pour terminer de caractériser les différents temps d'activation, la densité nucléaire de l'épiderme était mesurée (figure 18) ainsi que l'épaisseur de l'épiderme.

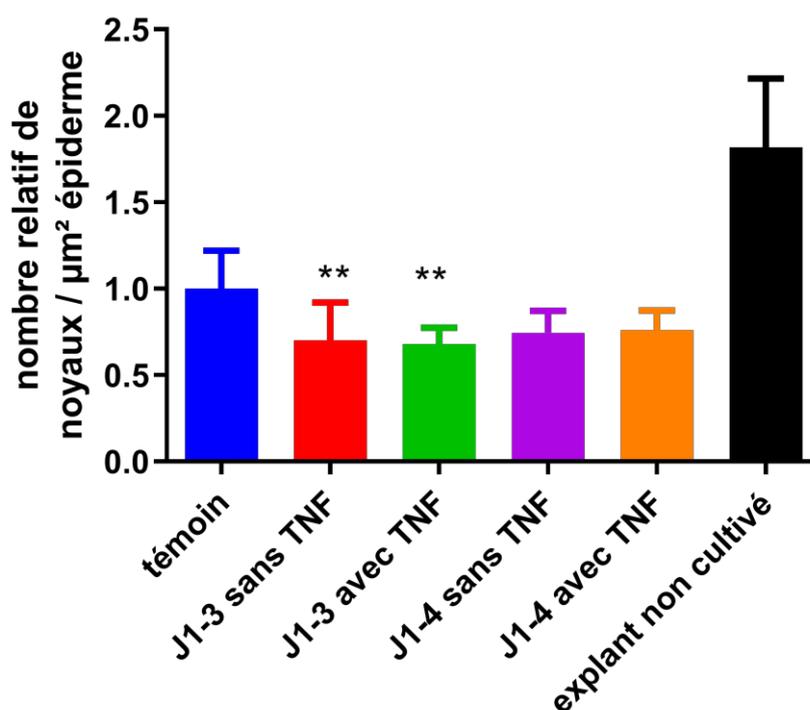


Figure 18 : Densité nucléaire après 7 jours de culture des explants cutanés selon les différents temps d'activation. Le cocktail inflammatoire (IL-4 et -13 à 100 ng/ml, Poly I :C à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +/- TNF- α à 10ng/ml) était ajouté au milieu de culture à J1 et J3 (toutes les 48 heures) ou à J1 et J4 (toutes les 72 heures). Le nombre de noyaux était rapporté par rapport à la surface carrée de l'épiderme. (n= 3, **= $p < 0,01$). A titre informatif, la même mesure a été réalisée sur des explants non mis en culture (J0).

L'épaisseur de l'épiderme n'était pas différente selon les différentes conditions (n=3). La diminution de la densité nucléaire lors de l'activation à J1 et J3 traduit un retard de différenciation cellulaire dans notre modèle inflammatoire retrouvé dans la DA.

III. Discussion

Dans nos tests préliminaires nous avons mis en place un cocktail inflammatoire comprenant les interleukines -4 et -13 de la voie Th2, une cytokines pro-inflammatoire le TNF- α et un activateur des TLR et du TLR3 notamment, le poly I :C. Ce cocktail déposé dans le milieu de culture créait un environnement inflammatoire pour notre explant cutané et permettait d'obtenir les principales caractéristiques de la DA (Soter, 1989). L'expression de la filaggrine et la loricrine, protéines principales de la couche cornée, était diminuée et associée à un retard de la différenciation cellulaire.

1. Choix des molécules du cocktail inflammatoire

Deux cytokines sont présentes dans la quasi-totalité des modèles *in vitro* mimant la DA : l'IL-4 et l'IL-13 (De Vuyst et al., 2017; Huet et al., 2018). L'IL-4 et -13 entraînent la différenciation des lymphocytes T auxiliaires en lymphocytes de type Th2 puis une auto-amplification Th2 ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'anticorps IgE et une hyperéosinophilie (Nakagawa et al., 2018). Dans un modèle d'EHR, l'IL-4 et -13 avec ou sans TNF- α montrait également une spongiose, une altération de la couche cornée ainsi qu'une augmentation de l'expression de la TSLP (Danso et al., 2014). Dans un autre modèle, l'IL-4 et -13 était associée à de l'IL-25 (E. De Vuyst et al., 2016). Cette association entraînait une altération de la barrière épidermique avec une diminution d'expression de la loricrine

ainsi qu'une altération de la composition lipidique. Cependant, l'expression de l'ARNm de la TSLP n'était pas augmentée. L'IL-4 et -13 semblent être les 2 IL clés de la DA à l'heure actuelle (Mansouri & Guttman-Yassky, 2015) comme le supposent les recherches dans le traitement de la DA. En effet, ces 2 ILs sont la cible de traitements très prometteurs. Le dupilumab, un anti-IL-4 est déjà commercialisé, tandis que des traitements ciblant plus spécifiquement les IL-13 sont en cours d'essai (F. Huet et al., 2020). De plus, l'IL-4 et l'IL-13 induisent un prurit en activant directement les neurones sensoriels cutanés via la sous-unité α du récepteur de l'IL-4. A noter que cette sous unité α du récepteur de l'IL-4 est commune au récepteur de l'IL-4 mais aussi de l'IL-13 (Yosipovitch et al., 2018).

Malgré tout, les cytokines de la voie Th2 semblent devoir être associées avec d'autres molécules pour induire l'augmentation de la production de la TSLP (De Vuyst et al., 2016). Le TNF- α ou l'IL-1 semblent être des molécules qui agissent en synergie avec les cytokines de la voie Th2 pour entraîner la production de TSLP (Bogiatzi et al., 2007).

Le poly I:C est une autre molécule capable de créer une inflammation cutanée en activant les kératinocytes *via* leur TLR (Lebre et al., 2007). Le poly I:C, activateur TLR3 est connu pour induire une sécrétion de TSLP (Köllisch et al., 2005; Suri et al., 2018; Takai et al., 2014). Dans un modèle sur 2D de kératinocytes humains, son association avec un cocktail contenant de l'IL-4 et du TNF- α potentialisait la production de TSLP (Fitoussi et al., 2020) ; alors que l'association seule d'IL-4 et TNF- α n'entraînant pas de production de TSLP. Le poly I:C a également été utilisé dans un modèle 3D où l'expression de TSLP était plus élevée que dans des modèles sans poly I:C (Rouaud-Tinguely et al., 2015). Les auteurs attribuaient cette expression supérieure à l'ajout de poly I:C.

2. Choix des marqueurs d'étude

a. Marqueurs de l'inflammation

L'inflammation neurogène cutanée dans la DA se traduit en partie par la présence de TSLP, cytokine pro-inflammatoire de la voie Th2 dont l'expression est augmentée au niveau dans les lésions de DA et qui va activer la voie de signalisation du prurit par l'intermédiaire de son récepteur situé sur les fibres nerveuses cutanées (Soumelis et al., 2002; Wilson et al., 2013). Obtenir une augmentation de son expression dans notre modèle était donc nécessaire.

b. Marqueurs de l'altération de la barrière épidermique

Concernant l'altération de la barrière épidermique, nous nous sommes intéressés à l'altération des protéines de la couche cornée, composée principalement de la filaggrine, la loricrine et l'involucrine. Le déficit en filaggrine peut-être génétique mais il est dans la majorité des cas secondaire à l'inflammation cutanée (Hönzke et al., 2016; Kezic et al., 2012; Palmer et al., 2006), ce que nous montrons suite à l'application du cocktail inflammatoire sur nos explants de peau. La loricrine, autre protéine importante dans la différenciation épidermique, était également significativement diminuée. La présence de la kératine 10 qui est normalement un marqueur des couches plus profondes de l'épiderme, dans les couches superficielles traduit un retard de la différenciation épidermique. L'observation de l'altération de toutes ces protéines de la différenciation épidermique traduit la présence d'un environnement cytokinique pro-inflammatoire et l'action de celui-ci sur les kératinocytes (Hönzke et al., 2016). Ces altérations sont conformes à celles attendues et décrites dans un contexte de DA.

IV. Conclusion

Les résultats montrent qu'après l'ajout du cocktail inflammatoire à la concentration choisie, l'explant cutané exprime des caractéristiques de DA.

Premièrement, le marqueur de l'inflammation, la TSLP, est augmenté.

Deuxièmement, l'ajout du cocktail inflammatoire détériore la synthèse de protéines de la différenciation épidermique avec des altérations retrouvées dans les autres modèles de DA *in vitro* et chez les patients atteints de DA.

Une fois ces conditions expérimentales de stress inflammatoire définies, nous sommes passés à l'étape suivante qui a consisté à la mise en place de la co-culture peau humaine/neurones sensoriels de rat en condition « DA-like »

Ce travail ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant « **Model *in vitro* of human atopic dermatitis-like reinnervated** » soumis au *British Journal of Dermatology*.

Chapitre 2 : Modèle *in vitro* humain de dermatite atopique-like réinnervé (article en cours de soumission au *British Journal of Dermatology*)

Reinnervated *in vitro* model of human atopic dermatitis

Flavien Huet^{1, 2}, Adeline Bataille-Savattier¹, Nicolas Lebonvallet¹, Joachim W. Fluhr^{1,3}, Matthieu Talagas¹, Jean-Luc Carré^{1,4}, Laurent Misery^{1,2}, Christelle Le Gall-Ianotto^{1,2}

¹ Univ Brest, LIEN, F-29200 Brest, France

² University Hospital of Brest, Department of Dermatology, Brest, France

³ Department of Dermatology and Allergology, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

⁴ Department of Biochemistry, University Hospital of Brest, Brest, France

Corresponding author: christelle.ianotto@chu-brest.fr, Dr Christelle Le Gall-Ianotto, Univ Brest, LIEN, F-29200 Brest, France.)

Manuscript word count: 2975/3000

Abstract word count: 174/250

References: 36

Figures: 6 Supplementary figures: 0

Tables: 2 Supplementary tables: 0

Funding source: none

Conflicts of interest:

FH: Beiersdorf, Clarins

AB; Beiersdorf, Nestlé (Galderma)

JF; Pierre Fabre, CEBA Paharm, Nestlé Skin Health, Bioderma, Expanscience

NL; Johnson & Johnson, Expanscience,

CLG; Beiersdorf, Clarins, Nestlé (Galderma), Pierre Fabre, Shiseido

LM: Bayer, Beiersdorf, Bioderma, Expanscience, Dermira, Galderma, Johnson & Johnson, Pierre Fabre, Roche-Posay, Sanofi, Solabia, Uriage

What's already known about this topic?

Atopic dermatitis (AD) is a frequent inflammatory and itchy skin disease. The role of the nervous system in AD pathophysiology remains to some extent unclear. Consequently, the need for an *in vitro* model including nerve endings is essential for improving knowledge in AD pathogenesis and testing new molecules.

What does this study add?

This study reports the first *in vitro* model of AD including epidermal nerves fibers. Consequently, it is showed that small fibers play an important role to protect and restore epidermal barrier in inflammatory context and control markers of inflammation such as thymic stromal lymphopoietin and substance P.

Keywords: atopic dermatitis, in vitro, innervation, model, neurogenic inflammation, prurit

Background: Atopic dermatitis (AD) is a frequent inflammatory skin disease. Pruritus is present in all patients and skin nerve endings are known to be hyperactivated. Although several three-dimensional *in vitro* models mimicking AD have been published, no one considered neurogenic inflammation and pruritus pathways.

Objectives: To develop a re-innervated human skin explant in Th2 inflammatory context of AD to improve our knowledge on the impact of reinnervation.

Methods: Human skin explants were reinnervated by primary sensory neurons derived of dorsal root ganglion of rats. Then, an inflammatory cocktail (interleukin-4, interleukin-13, tumour necrosis factor- α and polyinosinic–polycytidylic acid) was added to mimic AD.

Results: Human skin explants were reinnervated after 5 days of culture. Thymic stromal lymphopoietin and substance P were not produced by reinnervated skin explants. Regarding epidermal barrier, filaggrin expression was not decreased in inflammatory context after re-innervation.

Conclusions: We characterized the first 3D model mimicking AD taking cutaneous nerves fibers into account after addition of an inflammatory cocktail. Surprisingly, nerve fibers seem protect keratinocytes and prevent inflammation and disruption of epidermis barrier.

Introduction

Atopic dermatitis (AD) is relapsing frequent inflammatory disease (1) during which itch is a predominant symptom (2) with frequent psychiatric comorbidity (3–5) and high negative impact on the quality of life (6) and a high disease burden (7,8).

AD is a multifactorial skin disease involving the immune system, an alteration of epidermal barrier and genetic factors (especially filaggrin (FLG)-null mutations) (9). The pathophysiological immune mechanisms include a shift towards Th2 helper cells in the initiation phase. A deficient epidermal barrier function due to abnormal lipid metabolism and/or epidermal structural protein formation in combination with an abnormal microbial colonization with potentially pathogenic organisms such as *Staphylococcus aureus* and neurogenic inflammation, are central pathogenetic factors in AD (2). Interactions between environmental factors and alterations of epidermal barrier lead to an hyperactivation of innate immunity with a cytokine release by keratinocytes and antigen-presenting cells cytokines such thymic stromal lymphopoietin (TSLP). These cytokines promote Th-naïve lymphocytes towards the Th2 phenotype and the secretion of Th2 cytokines (interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13 and IL-31)(10). In addition, Th2 cytokines and TSLP play an important role in the pathogenesis of AD mediated by JAK/STAT pathway (11). The expression of epidermally derived chemokines and a cascade of pro-inflammatory cytokines are upregulated while structural epidermal proteins such cytokeratin 10 (CK10), involucrin (IVL), loricrin (LOR) and FLG are downregulated. Consequently, inflammatory Th2 responses will in turn aggravate the defects of epidermal barrier and contribute to the increase of pruritus and scratching further altering the epidermal barrier defect and stimulating innate immunity, inducing a vicious circle: itch-scratch cycle.

AD treatment is currently under dramatic changes with the advent of new treatments options (12). However, the role of the nervous system in AD pathophysiology remains to some extent unclear while there is a need for an in vitro model including pruritus-related pathways for improving knowledge in AD pathogenesis and testing new molecules. A few in vitro model mimicking AD exist, some in two-dimensional and others more complex in three-dimensional (3D) skin models (13). 3D models include reconstructed human epidermis (RHE), skin

equivalent or skin explants. These models allow to study AD pathogenesis focusing mainly on barrier disruption with a deficit in FLG expression or on inflammation (14). However, these models do not take into account neurogenic inflammation and the importance of cross-talk between keratinocytes and cutaneous nerve endings.

Sensory neurons increase keratinocytes proliferation and promote skin wound healing (15). Pruritus appears to originate in the epidermal or subepidermal free nerve endings. These nerve fibers, mainly C fibers, are considered as pruritus receptors (16,17). Pruritus in AD is severe, persistent and correlates with severity of AD (18,19). Epidermal hyperinnervation is described in AD and maybe partly responsible for peripheral itch sensitization (20). Furthermore, TSLP secreted by keratinocytes binds to its receptor, namely TSLPR, located on sensory nerve fibers. Activated sensory nerves fibers release neuropeptides such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) both activating keratinocytes leading to an activation loop (21). These interactions support the concept of close communications between keratinocytes and sensory nerve fibers (21). Consequently, we were interested in the cross-talk between keratinocytes and sensory nerves and the impact of re-innervation in a 3D model mimicking AD.

The aim of our study was to establish an ex-vivo skin explant model for AD in humans. This model would be based on a re-innervated human skin explant and the Th2 inflammatory context of AD. After the formal establishment of an innervated AD-model we were interested in testing the following hypothesis:

- i. Inflammatory reactions are modulated in a re-innervated human skin explant model by Th-2 cytokines
- ii. Sensory innervation protects epidermis and specially keratinocyte and protein of cornified envelope in Th2 inflammatory context
- iii. Sensory innervation modulates release of SP.

Materials and method

Cell culture

Human skin explants (5mm Ø) and human primary keratinocytes (HPK) were obtained from abdominoplasties after informed consent of patients. Human experiments and sample collections had local authorization, referenced under DC 2008-214 at the “Ministere de la Recherche” in France and were conducted following the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

HPK were isolated after Dispase® incubation (20 U/ml in Ham's F12) at 4°C on overnight. The epidermis was then removed using forceps, and basal and suprabasal keratinocytes were dissociated from the epidermal layer by three digestions with 0.05% trypsin-EDTA solution and filtered. The cells were cultured in KSM with 5ng/ml EGF (epidermal growth factor) and 50 µg/ml BPE (bovine pituitary extract). For experiments, HPK were used from passage 1 to 5 with enzymatic dissociation using trypsin/EDTA for each passage.

Each human skin explant was co-cultured with or without primary sensory neurons (PSNs) in one well supplemented with Neuron Growth Factor (NGF) (10 ng/ml), insulin (10 µg/ml) and hydro-cortisone (HC) (10 ng/ml) and placed at 37°C. At the end of the experiment, the supernatants were frozen with anti-proteases at -20°C for biochemical analyzes. The cell layers of PNS were recovered in 500µL of Tri-reagent (Sigma T9424) and biopsies cut in half and put in 4% Paraformaldehyde (PAF) for 24-48 hours and then after rinsing in 10% sucrose for an equivalent time. ½ of the biopsy was frozen in liquid nitrogen being used subsequently for immunohistochemistry.

PSNs were obtained from 2 to 3 days old newborn rats dorsal root ganglion (DRG). Newborn rats were sacrificed by decapitation. PSNs and glial cells were dissociated from the DRG by using collagenase type IV, 35 minutes at 37°C. Then, DRG were mechanically dissociated twice and plated in 12-wells culture plate coated with Poly-L-Lysine (1 mg/ml). The culture medium used is different depending on whether they are seeded with keratinocytes or skin biopsy: respectively supplemented KSM and Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F12 (DMEM-

F12) and DMEM (3:1), both supplemented with 1X B27, 100ng/mL NGF, 10µg/mL insulin, 10ng/mL Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF) and 10ng/mL HC.

Induction of inflammation

The inflammatory cocktail was chosen to be as close as possible to AD inflammation. Molecules that composed the inflammatory cocktail and their concentrations were selected according to literature (22–25). After concentrations tests (data not shown), the final cocktail was constituted by IL-4 and IL-13 (100ng/ml), TNF-α (10ng/ml) and Poly I:C (1µg/ml).

Immunofluorescence analyses

Skin explant

Explant skin sections (10 µm) were saturated for 30 minutes at room temperature (RT) in DPBS supplemented with 10% of Bovine Sera Albumin (BSA). Primary and secondary antibodies were incubated with a solution of 1% BSA and 0.3% of Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8532) in DPBS (Table 1). Sections were incubated with primary antibodies and placed at RT for PAR-2 and PGP9.5 overnight, at 4°C for all other antibodies. Subsequently, sections were incubated with the secondary antibody coupled with a fluorochrome during 2 hours at RT (Table 1). A negative control was obtained by omitting the primary antibody. After three new washes, 40,6-diamidino- 2-phenylindole (DAPI, 100 mg/ml) was used to stain nuclei and sections were analysed under the immunofluorescence microscopy (AxioStar plus microscopy). Figures were taken with AxioCam® camera and analyzed with Axiovision® software. Relative staining intensity (RI) of each condition was measured using the ImageJ software.

Cell culture

The cells were fixed with 4% PAF and stored at -20°C. After thawing, drying and incubation in a humidity-saturated chamber, the slides were saturated with a 10% BSA solution for 1 hour at RT.

RNAs extraction of keratinocytes and PSN

HPK and PSN were preserved in 500 µl of Tri-Reagent. RNA extraction was performed following manufacturer's protocol. Briefly, to extract RNA, 100µl of chloroform was added then samples were shaken. After 15 minutes, samples were centrifuged at 12000g during 15 minutes at 2-8°C. Then samples were composed of 3 phases: the aqueous phase containing RNAs, the interface containing DNA and the organic phase containing proteins. The aqueous phase was transferred in a new tube with 250µL 2-propanolol. After centrifugation at 12000g during 10 minutes, supernatant was discarded. Then, the precipitated RNA was cleaned 3 times with ethanol 75%, vortexed and centrifuged at 7500g during 5 minutes. To finish, after drying, RNA was mixed with 10 µl of water RNase free.

The purity of Total RNAs and their concentrations were measured by spectrophotometry (Nanophotometer, IMPLEM GmbH, Munich, Germany).

Reverse transcriptase and Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RNAs from each sample (HPK and PSNs) were reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using the "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). RT-qPCRs were carried out using StepOne™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). For every reaction, 1 µL of cDNA of each sample was added to 10µl of Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 0.2 µl of each interest gene primers (Forward and Reverse) and 8.6 µl of water. The rest was carried out in accordance with instructions of the manufacturer's protocol. Cycle numbers were normalized to the housekeeping gene expression of each condition tested (18S expression) performed simultaneously using the $\Delta\Delta C_t$ comparative method. All genes studied are listed in Table 2.

Statistical analyses

All data are expressed as mean \pm SEM and were analysed by One Way Anova or Kruskal Wallis test when more than 2 groups were compared and Student's t-test or

Mann-Whitney test when individual treatment was compared to vehicle (Graph Pad Prism 6, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All results were normalized to control.

Results

The impairment of epidermal barrier was analysed through the expression of FLG, LOR or IVL (proteins of the cornified envelope) and CK10 or claudin (proteins of deeper epidermal layers) whereas of the epidermal inflammation was analyzed through TSLP expression.

Effects of inflammatory cocktail

No toxicity

The used inflammatory cocktail was not toxic on keratinocytes (figure 1A and 1B) nor on DRGs cells (figure 1C).

Structural protein expression of epidermal barrier was altered by Th-2 cytokines

In the 2D model (HPK), mRNA expression of epidermal differentiation proteins was determined by RT-PCR (n=5) (figure 2A). Expression of FLG was significantly decreased with the 3 conditions containing IL-4/IL-13 (+/- Poly I:C +/- TNF- α) (p<0.05). IVL expression was significantly decreased after addition of IL-4/IL-13 and this tendency was maintained when combined with Poly I:C +/- TNF- α . Results showed a tendency to increase of the claudin expression in the 3 same conditions.

In human skin explant (three-dimensional (3D) model), the proteins of epidermal differentiation were studied by immunofluorescence. Expression of FLG and LOR were decreased when adding the inflammatory cocktail (n=10, p<0.01 and p<0.05 respectively). CK10, protein of deeper layers of epidermis showed tendency to increase (figure 2B).

Inflammatory marker (TSLP) was increased by Th-2 cytokines

In the 2D model, mRNA expression of TSLP was increased with IL-4/IL-13 +/- Poly I:C +/- TNF- α (figure 3A). Likewise, secretion of TSLP by keratinocytes was increased with TNF- α (p<0.05) and with Th2 cytokines versus control (figure 3B).

TSLP was released by human skin explants in supernatant but the condition with the inflammatory cocktail didn't further increase the release (n=5) (figure 3C). In RT-qPCR, mRNA of TSLP was expressed but not different with or without addition of the inflammatory cocktail (figure 3D).

Effects of reinnervation on inflammatory 3D model

Human skin explant was reinnervated after 5 days of culture

After 5 days of co-culture, re-innervation (presence of nerves in dermis and epidermis) was effective with (p<0.0001) or without inflammation (p<0.0001) (between skin explant without PSNs) (figure 4A and 4B).

Epidermal nerve fibers protected epidermal barrier

FLG and cytokeratin 10 expressions were not decreased after re-innervation (n=5) (figure 5A). On the other hand, loricrin expression was significantly decreased when inflammatory cocktail was added. Interestingly, this decrease was less important when re-innervation was present (n=5).

Epidermal nerve fibers control inflammatory markers

Re-innervation of explants with or without the addition of the used inflammatory cytokines did not modified TSLP expression when measured by immunofluorescence (n=5) (figure 5B). After inflammation, ELISA results demonstrated marked increase in SP in not re-innervated explant (n=5, p<0.01) (figure 5C). Interestingly, after re-innervation, inflammation did not led to increase of SP.

DRG functionality

In the face of improvement of cutaneous barrier and decrease of inflammation in skin explant re-innervated versus no-re-innervated, DRG functionality was studied by ELISA. DRG cells were activated by the inflammatory cocktail or human TSLP or a

positive control (resiferatoxin, a TRPV1 activator, RTX)(26). Release of SP were significantly increased after activation by RTX but not after activation by TSLP or inflammatory cocktail (n=3, $p<0.05$) (figure 6).

Discussion

In our study, we characterized the first 3D model mimicking AD (thanks to the after addition of an inflammatory cocktail) taking cutaneous nerves fibers into account (13). The re-innervation was effective but the number of epidermal nerve fibers was not modified by the addition of such a cocktail. Until now, a hyper-innervation was described in AD, sometimes called neuro-dermatitis (20). In a recent study using a 3D imaging, a significant reduction in epidermal nerve fibers was detected both in lesional skin and non-lesional skin of AD (27). In any case, nerve fibers are primordial both in pruritus pathway and inflammation in AD through the hypersensitization of epidermal nerve fibers from an upregulation of nerves receptors (28).

Cytokines and their concentrations used were selected according the literature (22-25). IL-4 and 13 are known as the most important IL in AD and different therapies against these IL are in studies or already available to treat AD (12,29). AD skin lesions are characterized by the overexpression of pro-inflammatory type 2 molecules such as IL-4, -13 and TSLP secreted by keratinocytes (30). TNF- α is a pro-inflammatory cytokine that alone or with IL-4 and 13 synergistically induces release of TSLP (25). Its role seems important since in some models its absence in inflammatory cocktail could explain absence of presence of TSLP (31,32). Thus, Poly I:C is a synthetic double-stranded RNA and upregulates also the expression of TSLP and induces the release of the TSLP protein in keratinocytes (33,34). Furthermore, both Poly I:C and Th2 cytokine (IL-4 and 13) upregulate carbonic anhydrase II (35). In our models (2D and 3D), the use of the association of these inflammatory factors induced hallmarks of AD. Both inflammation and alteration of epidermal barrier were presented with a decrease of protein of cornified (FLG, LOR and IVL). Presence of TSLP in our model confirmed induction of inflammation. TSLP is a key cytokine and its association with nerve fibers in an AD-like model is important as inflammation is maintained, enhanced or triggered by neurogenic inflammation (21). TSLP directly activates cutaneous sensory nerve endings via its specific receptor and then promotes itching (21). In the same way, SP release after inflammation induction in 3D model without re-innervation is a supplementary argument for inflammation induction. Indeed, SP bind its receptors (neurokin-1 receptor) on nerve fibers and lead to neurogenic inflammation (36). But surprisingly, the SP levels returned to

control when reinnervation was present suggesting that nerve fibers could inhibit the production of markers of inflammation such as SP. This protective role was reinforced by results obtained on epidermal barrier proteins expression. Indeed, alteration of epidermal barrier was no longer present when skin explants were re-innervated as showed by the attenuation of the decrease of LOR expression in inflammatory conditions when reinnervation was effective. Epidermal nerve fibers appear a key element to restore cutaneous barrier. Such a positive influence of nerve fibers for LOR expression by keratinocyte in a 2D co-culture has been show in others experimentation of our laboratory in 2D (data no show).

Nevertheless, in AD, nerve fibers via neurogenic inflammation play a role of amplification both inflammation and disruption cutaneous barrier while in our model nerve fibers seem to protect epidermis against effect of inflammation. Many neurotransmitters and nerve growth factors released from nerve endings in the blood or skin are involved in neurogenic inflammation, dramatically enhancing and maintaining the inflammation induced by immune cells. In our model, the lack of aggravation of hallmarks of AD can be explained by absence of stimulation of nerve fibers endings. Indeed, DRG did not released SP after stimulation by TSLP or inflammatory cocktail. This no-stimulation is likely on the heterologous side of the model with human skin explant, so human TSLP, and nerve fibers of rat, so TSLPR of rat. Consequently, nerve fibers are activated and not release neurotransmitters that will be stimulated keratinocytes and the cycle of neurogenic inflammation is not produced. Conversely, nerve fibers protect epidermis and down-regulate inflammation. This effect of nerves fibers in cutaneous barrier restoration has been demonstrated in wound (15).

To conclude, inflammatory cocktail composed of Th2 cytokines (IL-4 and IL-13), Poly I:C and TNF- α induces hallmarks of AD in skin explant. Nevertheless, nerve fibers did not lead to neurogenic inflammation in 3D model re-innervated. Conversely nerve fibers protect keratinocyte and prevent inflammation and disruption of epidermis barrier. This absence of neurogenic inflammation was due to a no-stimulation of nerve fibers coming from rats by human TSLP. To free from the bias of a heterogeneous model, a homologous model will have to be created from sensory neurons derived from stem cells. We need a skin explant re-innervated 100% to

better understand pathophysiology of AD and especially importance of epidermis nerve fibers.

From a clinical point of view, our model proves that if we could protect our nerves from inflammation and opens up new fields of study. By protecting them, the inflammatory vicious circle of AD would be broken and these nerves would restore the skin barrier.

Acknowledgments

We want to thank the department of Pr Hu for the abdominoplasties.

References

1. Roduit C, Frei R, Depner M, Karvonen AM, Renz H, Braun-Fahrländer C, et al. Phenotypes of Atopic Dermatitis Depending on the Timing of Onset and Progression in Childhood. *JAMA Pediatr.* 2017;171(7):655- 62.
2. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primer.* 2018;4(1):1.
3. Deckers IAG, McLean S, Linssen S, Mommers M, van Schayck CP, Sheikh A. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PloS One.* 2012;7(7):e39803.
4. Dieris-Hirche J, Gieler U, Kupfer JP, Milch WE. [Suicidal ideation, anxiety and depression in adult patients with atopic dermatitis]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb.* 2009;60(8):641 - 6.
5. Drucker AM, Wang AR, Li W-Q, Sevetson E, Block JK, Qureshi AA. The Burden of Atopic Dermatitis: Summary of a Report for the National Eczema Association. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):26- 30.
6. Huet F, Faffa M-S, Poizeau F, Merhand S, Misery L, Brenaut E. Characteristics of Pruritus in Relation to Self-assessed Severity of Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2019 Mar 1;99(3):279-283;
7. Dalgard FJ, Gieler U, Tomas-Aragones L, Lien L, Poot F, Jemec GBE, et al. The psychological burden of skin diseases: a cross-sectional multicenter study among dermatological out-patients in 13 European countries. *J Invest Dermatol.* 2015;135(4):984- 91.
8. Misery L, Seneschal J, Reguiat Z, Merhand S, Héas S, Huet F, et al. Patient Burden is Associated with Alterations in Quality of Life in Adult Patients with Atopic Dermatitis: Results from the ECLA Study. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(7):713- 4.
9. Kezic S, O'Regan GM, Lutter R, Jakasa I, Koster ES, Saunders S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):1031-1039.

10. Oyoshi MK, Larson RP, Ziegler SF, Geha RS. Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(5):976-84, 984.
11. Bao L, Zhang H, Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAK-STAT*. 2013;2(3):e24137.
12. Huet F, Gouin O, Misery L. New treatments and therapeutic perspectives in atopic dermatitis. *Ann Dermatol Venereol*. 2020;147(6-7):466-74.
13. De Vuyst E, Salmon M, Evrard C, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Front Med*. 2017;4:119.
14. Huet F, Severino-Freire M, Chéret J, Gouin O, Praneuf J, Pierre O, et al. Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *J Dermatol Sci*. 2018;89(3):213-218;
15. Chéret J, Lebonvallet N, Carré J-L, Misery L, Le Gall-Ianotto C. Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2013;21(6):772-88.
16. Potenzieri C, Udem BJ. Basic mechanisms of itch. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2012;42(1):8-19.
17. Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1997;17(20):8003-8.
18. Zeidler C, Pereira MP, Huet F, Misery L, Steinbrink K, Ständer S. Pruritus in Autoimmune and Inflammatory Dermatoses. *Front Immunol*. 2019;10:1303.
19. Dawn A, Papoiu ADP, Chan YH, Rapp SR, Rasette N, Yosipovitch G. Itch characteristics in atopic dermatitis: results of a web-based questionnaire. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):642-4.
20. Tominaga M, Takamori K. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications. *J Dermatol*. 2014;41(3):205-12.

21. Wilson SR, Thé L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 2013;155(2):285-95.
22. Castex-Rizzi N, Galliano MF, Aries MF, Hernandez-Pigeon H, Vaissiere C, Delga H, et al. In vitro approaches to pharmacological screening in the field of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2014;170 Suppl 1:12-8.
23. Rouaud-Tinguely P, Boudier D, Marchand L, Barruche V, Bordes S, Coppin H, et al. From the morphological to the transcriptomic characterization of a compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2015;173(4):1006-14.
24. Kamsteeg M, Bergers M, de Boer R, Zeeuwen PLJM, Hato SV, Schalkwijk J, et al. Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. *Am J Pathol*. 2011;178(5):2091-9.
25. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet J-C, Marloie-Provost M-A, Volpe E, Sastre X, et al. Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178(6):3373-7.
26. Marshall I, Owen D, Cripps TV, McNulty S, Smart D. Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. *Br J Pharmacol*; 2003;138(1):172-6.
27. Tan Y, Ng WJ, Lee SZX, Lee BTK, Nattkemper LA, Yosipovitch G, Ng LG, Tey HL. 3-Dimensional Optical Clearing and Imaging of Pruritic Atopic Dermatitis and Psoriasis Skin Reveals Downregulation of Epidermal Innervation. *J Invest Dermatol*. 2019 May;139(5):1201-1204
28. Nattkemper LA, Tey HL, Valdes-Rodriguez R, Lee H, Mollanazar NK, Albornoz C, et al. The genetics of chronic itch: gene expression in the skin of atopic dermatitis and psoriasis patients with severe itch. *J Invest Dermatol*. 2018;138(6):1311-1317.
29. Misery L, Huet F, Gouin O, Ständer S, Deleuran M. Current pharmaceutical developments in atopic dermatitis. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;46:7-13.

30. Heratizadeh A, Werfel T. Anti-inflammatory therapies in atopic dermatitis. *Allergy*. 2016;71(12):1666-75.
31. De Vuyst É, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Chrétien A, Salmon M, Poumay Y. The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. *Arch Dermatol Res*. 2015;307(4):309-18.
32. De Vuyst E, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Malaisse J, Mound A, Bourtembourg M, et al. M β CD concurs with IL-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol*. 2018;27(4):435-43.
33. Vu AT, Chen X, Xie Y, Kamijo S, Ushio H, Kawasaki J, et al. Extracellular double-stranded RNA induces TSLP via an endosomal acidification- and NF- κ B-dependent pathway in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2011;131(11):2205-12.
34. Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, et al. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(1):179-86.
35. Suri BK, Verma NK, Schmidtchen A. Toll-like Receptor 3 Agonist, Polyinosinic-polycytidylic Acid, Upregulates Carbonic Anhydrase II in Human Keratinocytes. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(8):762-5.
36. Gouin O, Lebonvallet N, L'Herondelle K, Le Gall-Ianotto C, Buhé V, Plée-Gautier E, et al. Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. *Exp Dermatol*. 2015;24(10):723-6.

Table 1: List of primary and secondary Antibodies with concentration used and manufacturer's references.

<u>Primary antibodies</u>	<u>Target</u>	<u>Host</u>	<u>Dilution</u>	<u>References</u>	<u>Supplier</u>
	Cytokeratin 10	Mouse	1/100	ab9025	Abcam
	Filaggrin	Mouse	1/100	sc-66192	Santa Cruz
	Loricrin	Rabbit	1/100	ab240345	Abcam
	PGP9.5	Rabbit	1/100	Ab27053	Abcam
	TSLP	Rabbit	1/100	ab47943	Abcam
<u>Secondary antibodies</u>	<u>Reactivity</u>	<u>Host</u>	<u>Fluorescence</u>	<u>References</u>	<u>Supplier</u>
	Rabbit IgG	Goat	FITC	111-095-003	Jackson (interchim)
	Mouse	Goat	Alexa 488	ab6785-1	Abcam
	Goat	Donkey	Alexa 488	ab150129	Abcam

PGP9.5: protein gen product 9.5; TSLP: thymic stromal lymphopoeitin.

Table 2: Primers sequences of genes expression analysed with RT-qPCR.

Target	Primers sequences (Forward)	Primers sequences (Reverse)	Hybridation temperature
CK 10	CAG-TCC-CAA-CTG-GCC- TTG-AA	GGG-CCT-GAA-TCT-GTG- AGA-GC	60°C
FLG	AAG-GAA-CTT-CTG-GAA- AAG-GAA-TTT-C	TTG-TGG-TCT-ATA-TCC- AAG-TGA-TCC-AT	60°C
INV	GCC-TCA-GCC-TTA-CTG- TGA-GT	GAG-CTC-CTG-ACT-GAG- GGC-A	60°C
LOR	GCA-AAC-CTC-GGG-TAG- CAT-CA	GCC-GTC-CAA-ATA-GAT- CCC-CC	60°C
TSLPr	ACA-TCC-TCC-ATA-GCC- TTC-ACC	GAG-TGG-CAG-TCC-AAA- CAG-GAA	60°C
18S	GGCTACCACATCCAAGGAA GG	CCAATTACAGGGCCTCGAA AG	60°C

CK = cytokeratin 10; FLG= Filaggrin; INV = Involucrin; LOR= Loricrin; TSLP= Thymic Stromal Lymphopietin

Figure 1: No toxicity (MTT test) of inflammatory cocktail with simple (24h) or double inflammation (24-72h)

A. Keratinocytes in proliferation: no toxicity. Cell viability was increased after double inflammation. B. Keratinocytes in differentiation: no toxicity. C. DRG: no toxicity. (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$) DRG: dorsal root ganglion.

Figure 2: Epidermal barrier is altered by Th2 cytokines

A. Expression of mRNA of epidermal differentiation protein on RT-qPCR in model 2D of human primary keratinocytes on differentiation (*= $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$). Protein of cornified envelope was decreased by Th2 cytokines (IL-4 and 13). Filaggrin was also decreased when Poly I:C +/- TNF- α were added in inflammatory cocktail. Inflammatory cocktail increased Claudin expression. B. Quantitative (immunohistomorphometry (QIH) in epidermis for loricrin, filaggrin and cytokeratin 10 (CK10) protein were assessed in model 3D. The relative intensity was normalized to control. Data represent the mean +/- SEM of 20 samples of 10 independent experiments (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$).

Figure 3: Inflammatory marker (TSLP) is increased by Th2 cytokines

A. mRNA expression of TSLP on RT-qPCR in human primary keratinocytes on differentiation. Expression of TSLP had tendency to increased with Th2 cytokines +/- Poly I:C +/- TNF- α . B. Release of TSLP by human primary keratinocytes in supernatant (ELISA). All the conditions increased release of TSLP. (TNF- α : *= $p < 0.05$). C. Release of TSLP by human skin explant in supernatant after inflammation. TSLP was presented in supernatant but there is no difference between the conditions. D. QIH in epidermis for TSLP protein were assessed in 3D model. The relative intensity was normalized to control. Data represent the mean +/- SEM of 20 samples of 10 independent experiments.

Figure 4: Reinnervation of the 3D model of human skin explant of impact of Th2 cytokines.

A. Representative photo of immunohistochemistry of cutaneous nerve fibers in the human skin explants after 5 days of culture. The sensory nerve fibers were stained by PgP9.5 antibody. White arrow= nerve fibers in epidermis; orange arrows= nerve fibers in dermis B. Relative proportion of epidermal sensory nerves fibers per mm² of epidermis in skin explant with or without inflammation (**=p<0.001).

Figure 5: Epidermal nerve fibers protect model 3D of human skin explant of impact of Th2 cytokines.

A. Epidermal nerve fibers protect epidermal barrier of Th2 cytokines in skin explant. The relative intensity (QIH) of epidermal protein expression of loricrin, filaggrin and cytokeratin 10 (CK10) was normalized to control. Data represent the mean +/- SEM of 10 samples of 5 independent experiments. B. Epidermal nerve fibers control expression of TSLP in skin explant. QIH in TSLP protein were assessed. The relative intensity was normalized to control. Data represent the mean +/- SEM of 10 samples of 5 independent experiments. C. Epidermal nerve fibers inhibit release of inflammatory marker substance P (SP) after inflammation in skin explant (n=10). Release of SP by human skin explant or reinnervated skin explant in supernatant with or without inflammation (**=p<0.01) (ELISA).

Figure 6: Release of substance P (SP) by dorsal root ganglion (DRG)

Release of SP by DRG. Activation by inflammatory cocktail or human TSLP or a positive control (RTX) (n=3, *=p<0.05).

Figure 1: No toxicity (MTT test) of inflammatory cocktail with simple (24h) or double inflammation (24-72h)

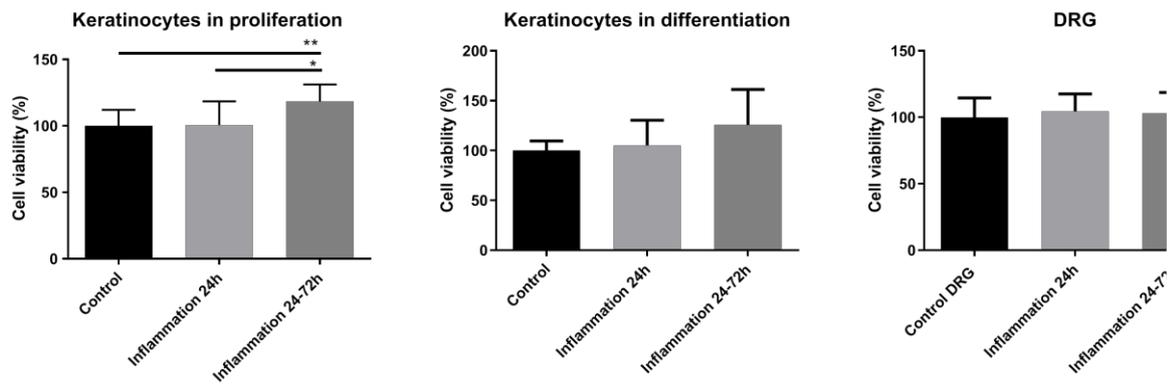


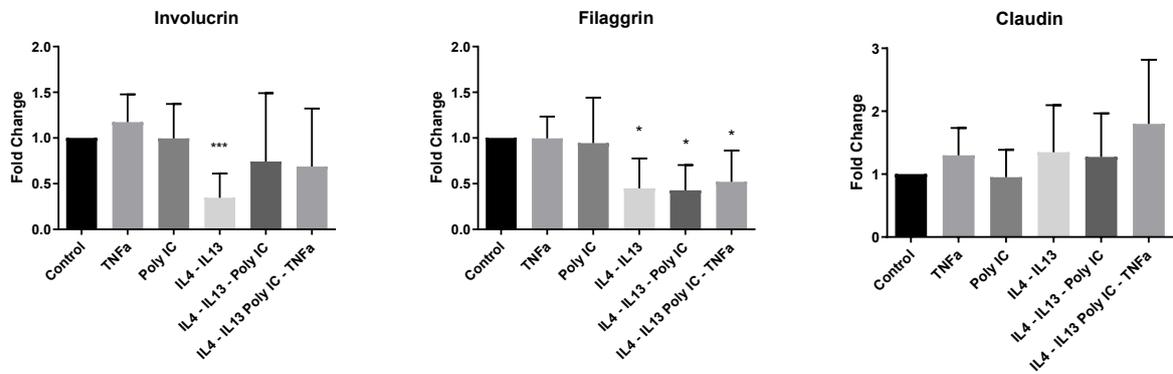
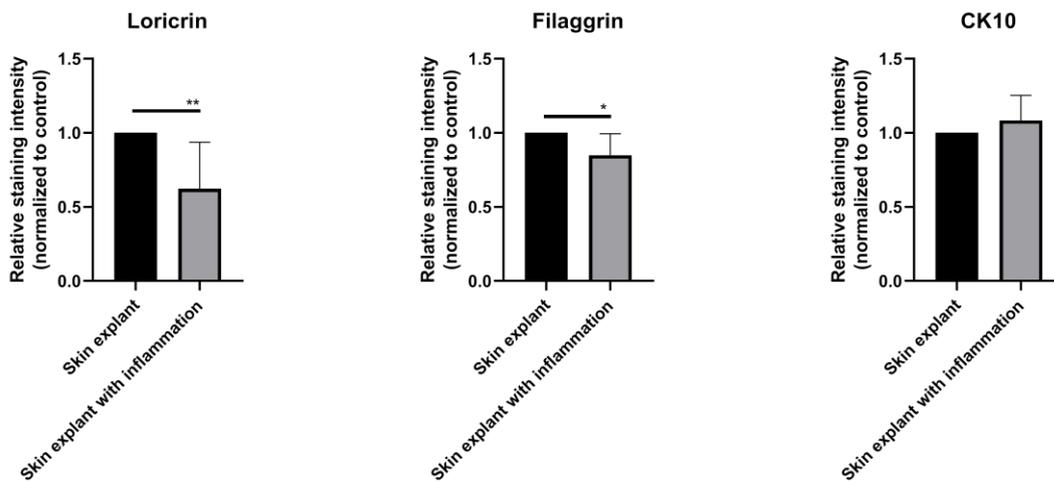
Figure 2: Epidermal barrier is altered by Th2 cytokines**A****B**

Figure 3: Inflammatory marker (TSLP) is increased by Th2 cytokines

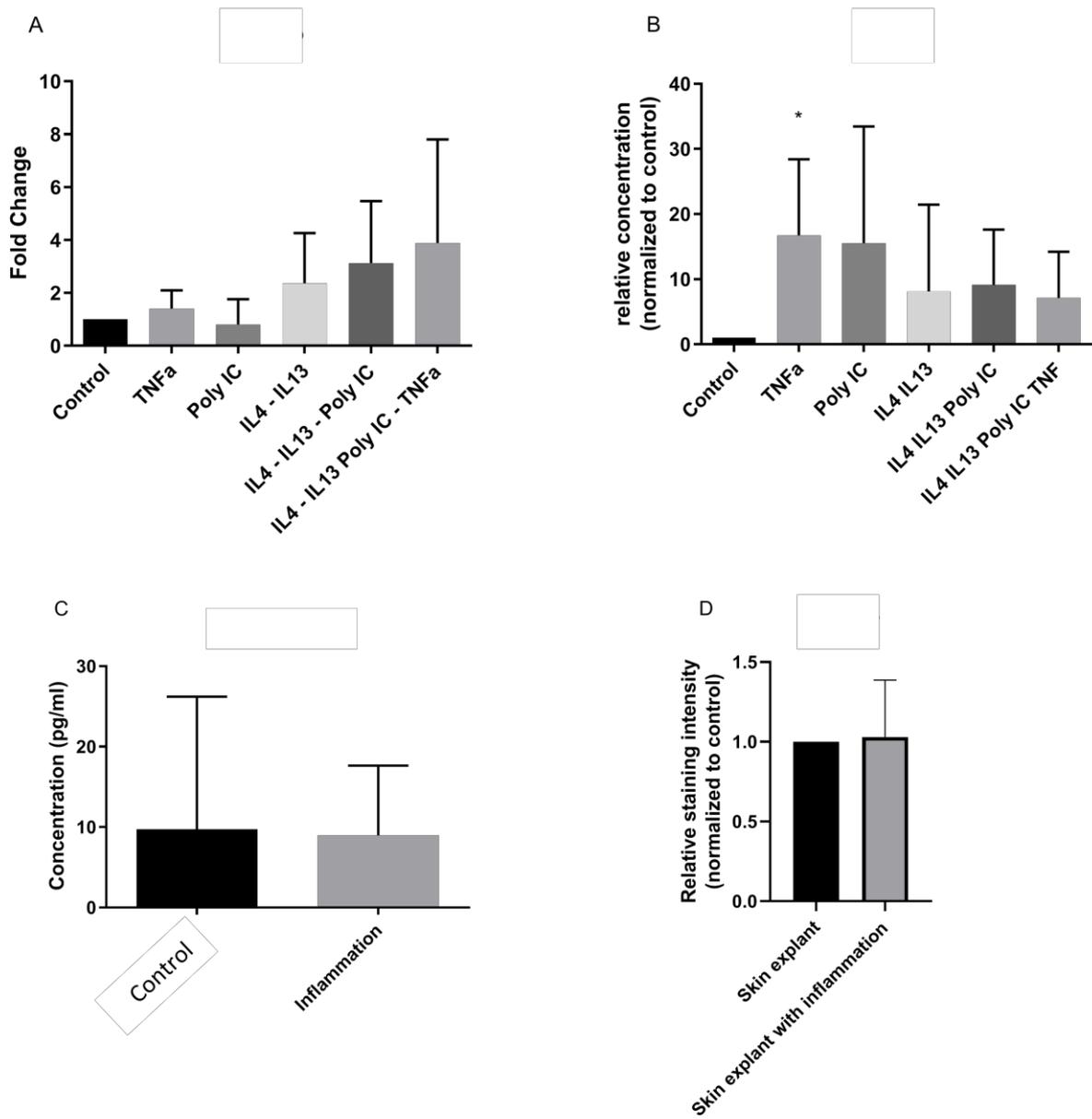


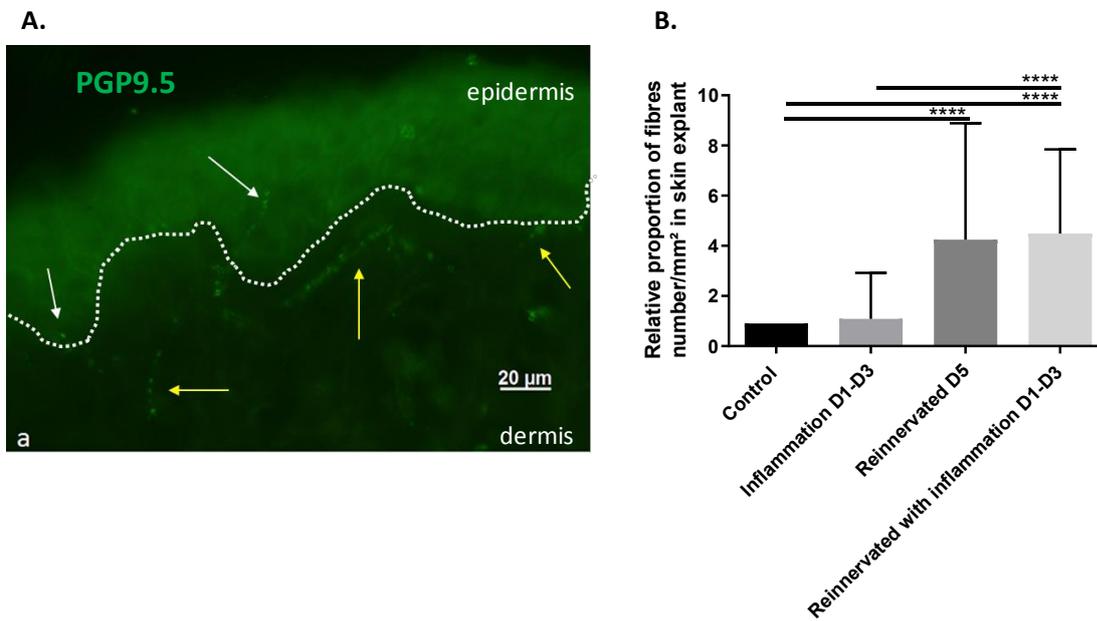
Figure 4: Impact of inflammation of reinnervation of human skin explants

Figure 5: Epidermal nerve fibers protect model 3D of human skin explant of impact of Th2 cytokines.

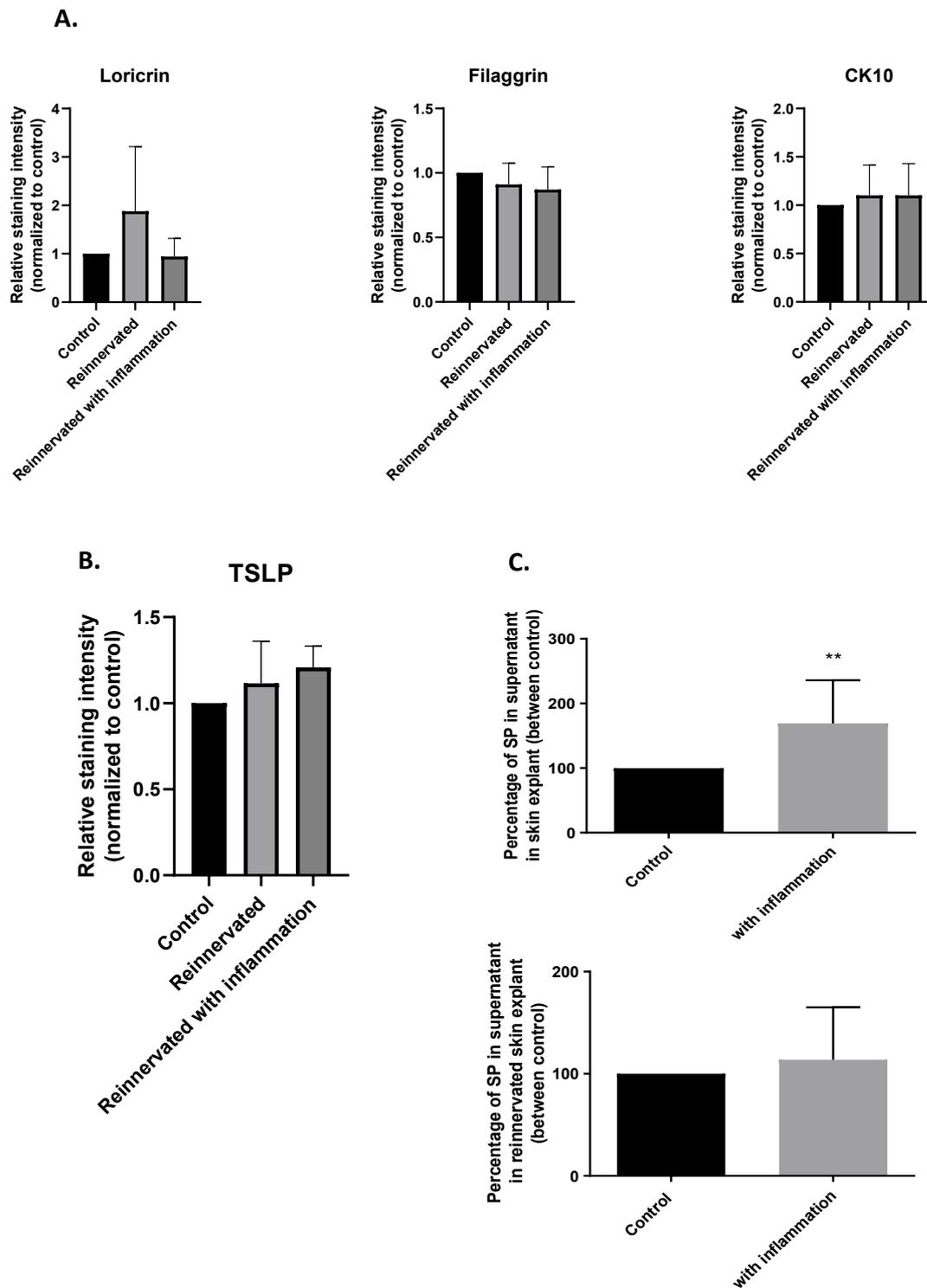
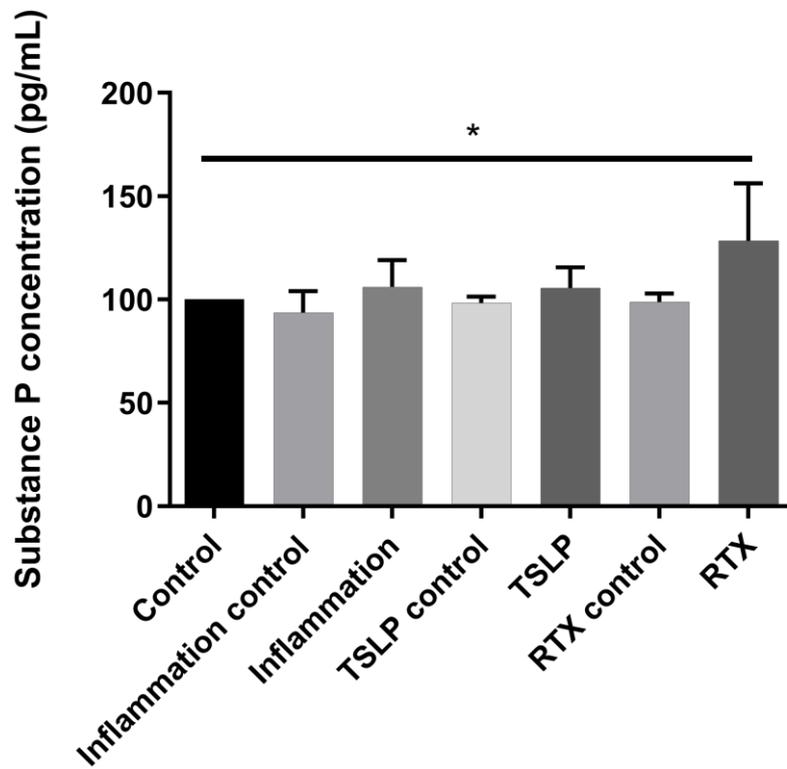


Figure 6: Release of substance P (SP) by dorsal root ganglion (DRG)



Supplementary “Material and Methods”

Toxicity test

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test was used to measure cellular cytotoxicity after different treatments. Approximately 10 000 keratinocytes were seeded by well and incubated for 2 days in proliferative state in poor containing calcium medium (KSFM, 90 μ M) and 1 day in differentiation state in high containing calcium medium (DMEM, 1.8mM calcium). For sensory neurons, one rat was dissected and DRG were put in culture for 5 days. The supernatant of each well was removed, and a solution of 2.5 mg / ml of thiazolyl blue tetrazolium bromide was added to each well (300 μ L/well). After 1.5 hours at 37°C, the MTT solution was replaced by 100 μ L of DMSO. The optical density (OD) was read with a spectrophotometer at 540nm after 15min under gentle agitation.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (EIA)

The levels of TSLP, CGRP and SP released into the medium were assessed using commercially available EIA kits following the manufacturer’s recommendations, respectively “Human TSLP DuoSet EIA kit” (R&D Systems, Minneanopolis, USA) and “Rat CGRP EIA kit” (SPiBio Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France) and “Substance P Parameter Assay Kit” (R&D systems, Minneapolis, EU).

OD were assayed by spectrophotometry at 405nm for SP and CGRP and 450nm then 540nm for TSLP. The samples concentrations were calculated from the standard curve realized for each kit.

Chapitre 3 : Résultats complémentaires

I. Introduction

La mise en place d'un modèle expérimental que ce soit au niveau *in vivo* et encore plus *in vitro* mimant une pathologie est un défi complexe. A ce jour, aucun modèle ne peut reproduire fidèlement la pathologie visée dans ces moindres détails. Un modèle va se focaliser sur certaines caractéristiques et essayer de les reproduire. Par conséquent, un modèle est toujours adaptable, modifiable et perfectible. Le modèle que nous avons mis en place et décrit dans le chapitre précédent (Chapitre 2 des résultats) ne déroge pas à cette règle. L'objectif de notre modèle était la mise en place de la réinnervation pour pouvoir en étudier le rôle dans la DA (impact de l'inflammation sur la réinnervation, impact de la réinnervation sur les marqueurs de la DA). Cet objectif a été atteint avec une réinnervation effective dans notre modèle après 5 jours de co-culture. Le second objectif était d'analyser les modifications des protéines de la barrière épidermique, en particulier de l'enveloppe cornée (filaggrine et loricrine), et un marqueur de l'inflammation la TSLP.

Cependant, les atteintes de la DA ne se cantonnent pas à ces seuls éléments. De nombreuses modifications à la fois de la barrière épidermique au niveau protéique mais également lipidiques ou du microbiote, sont présentes. Sur le plan de l'inflammation cutanée, la TSLP est le marqueur le mieux défini dans la DA, cependant d'autres cytokines pro-inflammatoires sont présentes, comme l'IL-8 ou l'IL-1 β (Abramovits et al., 2013; Wilson et al., 2013). La colonisation à *Staphylococcus Aureus* lors de poussée de DA joue un rôle, cause ou conséquence (Son et al., 2014; Anh Tuan Vu et al., 2010). D'autres éléments de l'immunité sont aussi impliqués dans la DA. L'immunité adaptative par la voie Th2 est la plus importante avec ces IL-4 et -13, mais d'autres ILs participent. La voie Th22 a été décrite ainsi

que l'IL-31 en particulier dans la voie du prurit (Cevikbas et al., 2014). A côté de l'immunité adaptative, l'immunité innée bien que moins décrite pour le moment est altérée. Au niveau cutané, l'immunité innée est la première ligne de défense dont l'IL-1 fait partie. Les récepteurs cellulaires de l'immunité innée situés sur différents types de cellules comme les kératinocytes, les cellules dendritiques ou les mastocytes : les PRR (pattern recognition receptor). Ces récepteurs sont capables de reconnaître des éléments spécifiques de pathogènes qu'on appelle les PAMP (pour PathogenAssociated Molecular Patterns). Les kératinocytes ont un rôle primordial car en première position au vu de leur situation anatomique. Les TLRs font partie des PRR. Le rôle de certains TLRs, autre que le TLR3 a été mis en avant, en particulier le TLR2 (Flynn et al., 2019).

Par conséquent notre modèle peut être mieux caractérisé. De nouvelles expérimentations ont été réalisées pour renforcer les données existantes que ce soit sur la barrière épidermique ou l'inflammation. De nouveaux éléments, complémentaires, ont également été recherchés.

Les questions posées étaient :

- (i) Une réinnervation était-elle possible après inflammation de l'explant ? A l'inverse, quelles sont les effets de l'ajout d'un cocktail inflammatoire sur un explant déjà innervé ?
- (ii) Amélioration la caractérisation du marqueur de l'inflammation TSLP et analyser d'autres marqueurs de l'inflammation comme l'IL-8, et TLR2, un récepteur de l'immunité innée impliqué dans la réponse inflammatoire
- (iii) Mieux caractériser notre modèle sur le plan de la barrière cutanée avec une analyse par RT-qPCR
- (iv) Compléter le cocktail inflammatoire par de l'IL-1 β

II. Résultats

1. La réinnervation n'est pas effective sur une culture longue

Deux protocoles étaient mis en place pour étudier la réinnervation des explants cutanés avec le cocktail inflammatoire défini au chapitre 2 (figure 19).

- Le premier consistait à évaluer la faisabilité de réinnover un explant cutané déjà soumis au cocktail inflammatoire.
 - Le cocktail inflammatoire était ajouté à J0 sur l'explant cutané seul,
 - L'explant était ensuite mis en co-culture (explant-GRD) à partir de J3,
 - Avec ou sans activation avec le cocktail inflammation à J4-J6,
 - La culture était analysée à J8.
- Le deuxième protocole consistait à évaluer la possibilité d'ajouter le cocktail inflammatoire sur un explant déjà réinnervé.
 - L'explant était mis en co-culture avec les GRD à J0,
 - A J5 la réinnervation était effective,
 - Le cocktail inflammatoire était ajouté à J5 et J7,
 - La culture était analysée à J9.

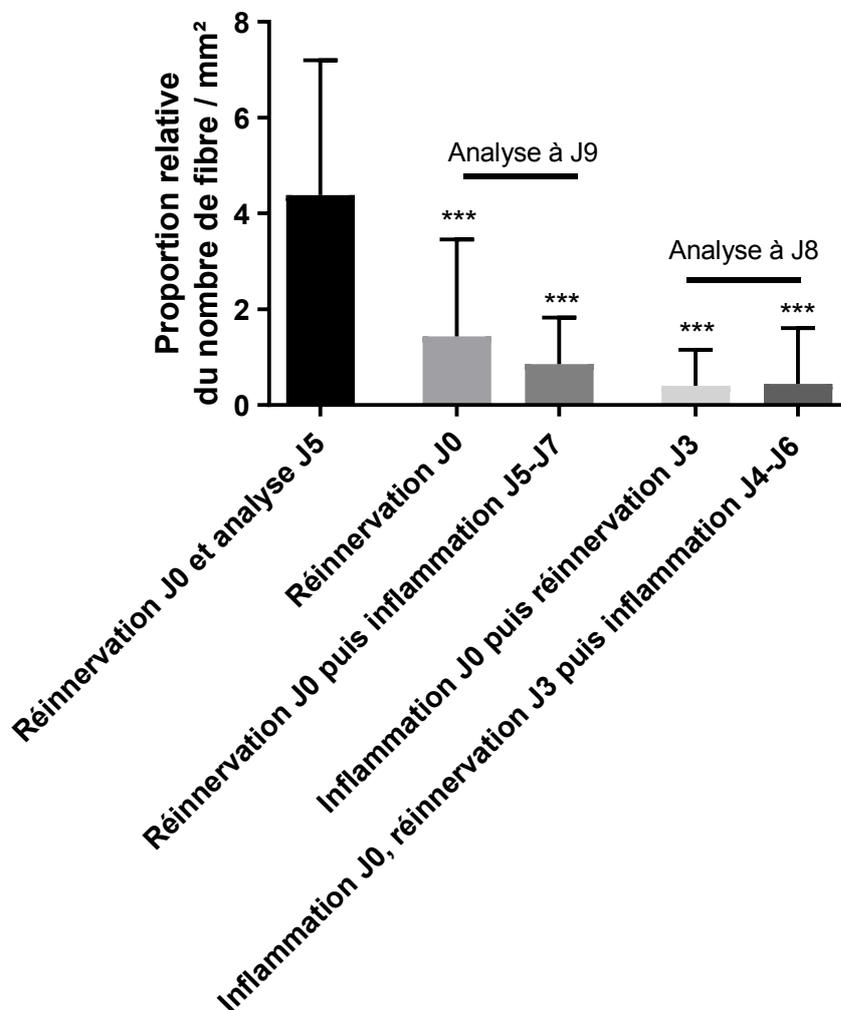


Figure 19 : Absence de réinnervation effective sur la culture longue. Calcul du nombre de fibres nerveuses marquées après immunomarquage par le PGP9.5 sur coupe histologique de 30 μm . Proportion relative de fibres nerveuses sensorielles par mm^2 dans les explants cutanés ($n=5$). Différence significative par rapport au témoin (réinnervation à J0 et analyse à J5) des 4 autres conditions. $n=5$, ***= $p<0,001$.

Au moment de l'analyse des explants cutanés de ces cultures longues (J9 pour la réinnervation de l'explant puis l'ajout du cocktail inflammatoire, ou J8 pour l'inflammation initiale puis réinnervation), la réinnervation n'est effective dans aucune des conditions.

2. Etude de l'environnement inflammatoire

a. Analyse de l'expression de TSLP dans le modèle «DA-like » réinnervé

Dans notre modèle 3D, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de la TSLP ainsi que sa libération dans le surnageant.

Comme nous l'avons montré dans l'article aucune différence significative entre les intensités de marquage de la TSLP des peaux inflammées *versus* peaux non-inflammées n'a pu être mise en évidence ni une augmentation du taux de TSLP dans les surnageants de co-culture soumises au cocktail inflammatoire. Ne trouvant pas de variation d'expression au niveau protéique, nous avons réalisé en complément une analyse par RT-qPCR afin de rechercher son expression transcriptomique. Pour rappel, les explants cutanés étaient mis en culture à J0 puis le cocktail inflammatoire composé d'IL-4 et d'IL-13 à 100 ng/ml, de TNF- α à 10ng/ml et de Poly I :C à 1 μ g/ml était ajouté à J1 et J3 dans le surnageant. L'explant était récupéré à J5 (figure 20A). Concernant le modèle réinnervé, le protocole était identique avec une co-culture explant-GRD à J0 (figure 20B). L'inflammation était effectuée selon le protocole classique de culture, c'est-à-dire à J1 et J3 avec récupération à J5.

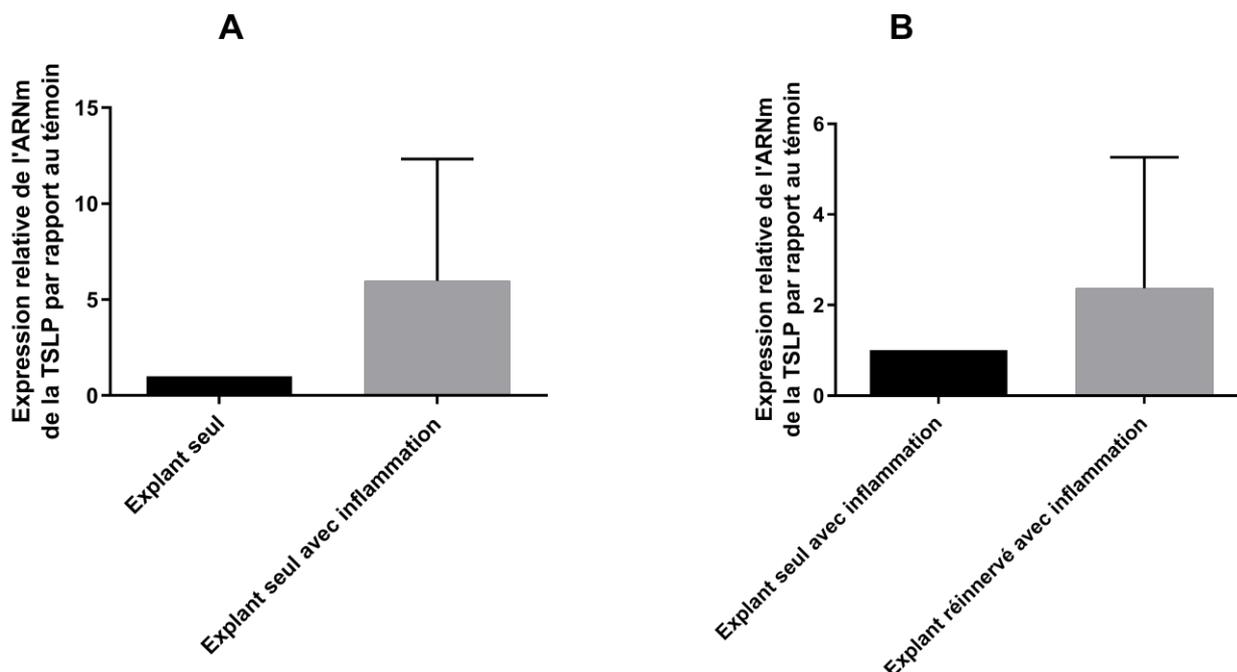


Figure 20 : Augmentation de l'expression de l'ARNm de la TSLP en RT-qPCR sur des explants cutanés avec inflammation. A. L'expression relative de l'ARNm de la TSLP était augmentée lors de l'ajout du cocktail inflammatoire par rapport à l'explant seul (n=5, p=0,11). B. L'expression relative de l'ARNm de la TSLP était augmentée lors de l'ajout du cocktail inflammatoire sur explant réinnervé par rapport à l'explant réinnervé sans inflammation (n=5, p=0,31).

L'analyse de l'ARNm de la TSLP montrait une tendance à l'augmentation lors de l'ajout du cocktail inflammatoire avec une expression 5 fois plus importante. Cette expression était seulement augmentée d'un facteur 2 lors de l'ajout du cocktail inflammatoire sur un explant réinnervé.

b. Analyse de l'expression du TLR-2 dans le modèle « DA-like » réinnervé

Nous nous sommes également intéressés à l'expression, transcriptomique et protéique, d'un récepteur de l'immunité innée impliqué dans la réponse inflammatoire, le TLR2 dans

notre modèle d'explant cutané réinnervé (figure 21). L'inflammation était effectuée selon le protocole classique de culture, c'est-à-dire à J1 et J3 avec récupération à J5.

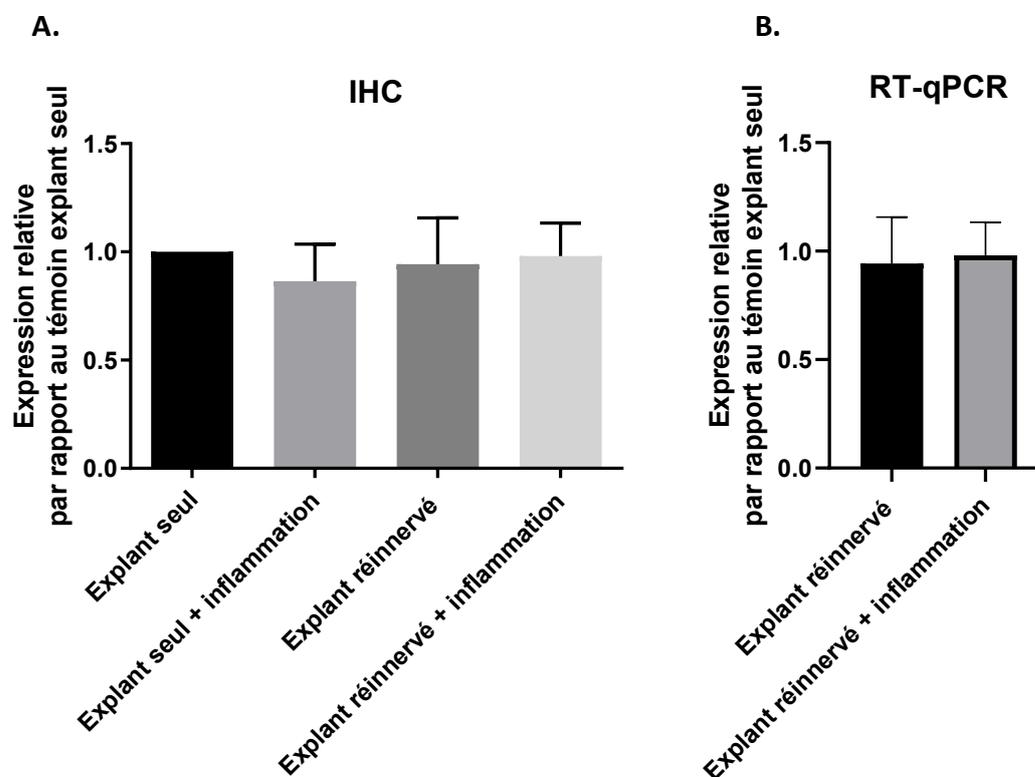


Figure 21 : Expression de TLR2 à la fois protéique (A.) et transcriptomique (B.) après ajout du cocktail inflammatoire dans le modèle 3D réinnervé. A. Analyse en Immunomarquage (IHC) et B. RT-qPCR de l'expression relative de TLR2 dans un explant +/- réinnervé +/- avec inflammation (n=4).

L'expression relative en IHC du TLR2 montrait une diminution faible lors de l'ajout du cocktail inflammatoire. Cette tendance disparaissait dans le modèle réinnervé.

L'expression relative de l'ARNm du TLR2 n'était pas différente lors de l'ajout du cocktail inflammatoire (n=4).

3. Etude de la barrière épidermique : analyse transcriptomique de l'expression des protéines de l'épiderme dans le modèle DA-like réinnervé

Dans le même temps, nous avons poursuivi les investigations concernant l'analyse de la barrière épidermique. Comme pour la TSLP, nous avons réalisé de la RT-qPCR afin d'analyser l'expression transcriptomique de la Filaggrine, de la CK10 et de la Loricrine. L'inflammation était effectuée selon le protocole classique de culture, c'est-à-dire à J1 et J3 avec récupération à J5 (figure 22).

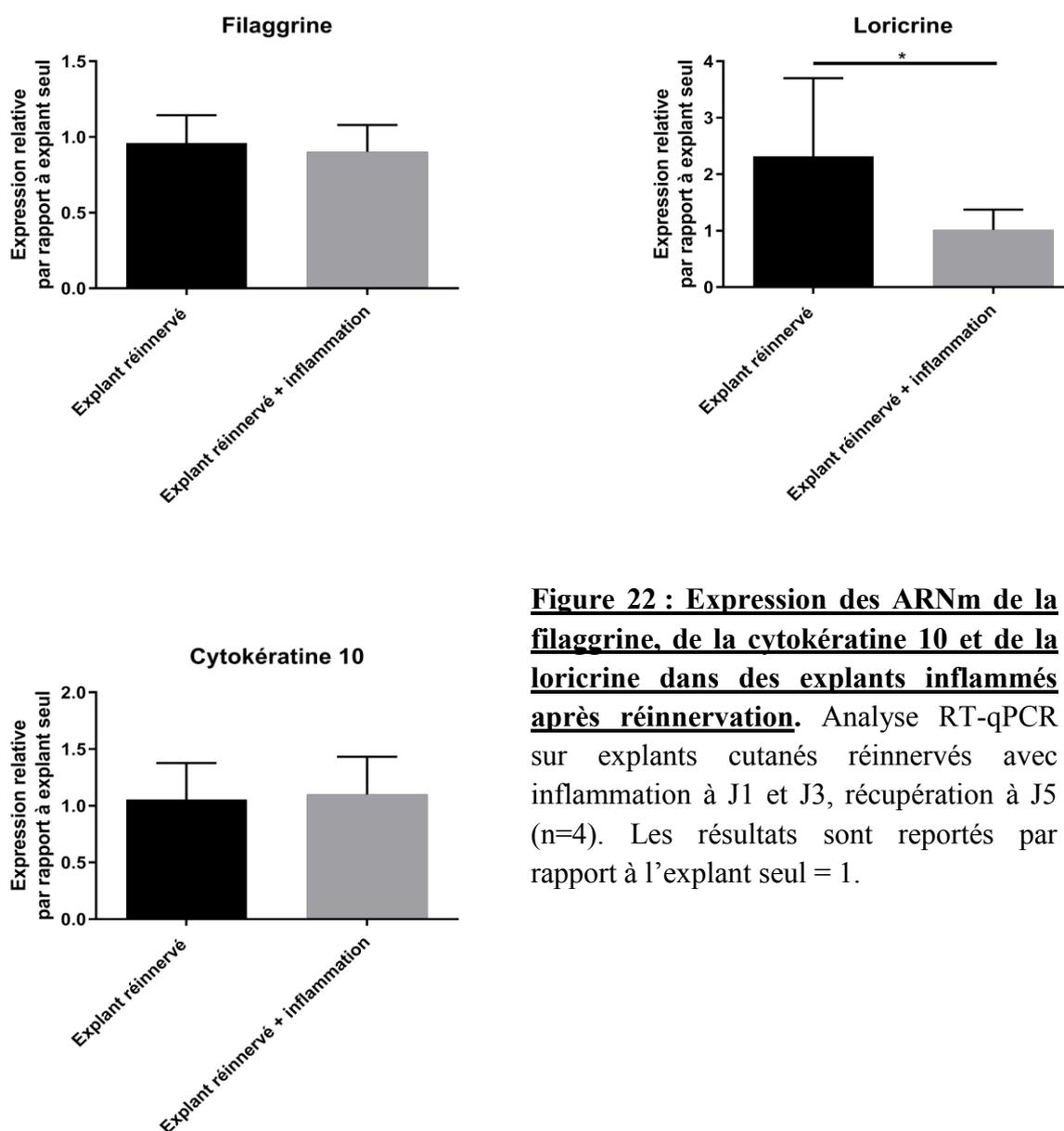


Figure 22 : Expression des ARNm de la filaggrine, de la cytokératine 10 et de la loricrine dans des explants inflammés après réinnervation. Analyse RT-qPCR sur explants cutanés réinnervés avec inflammation à J1 et J3, récupération à J5 (n=4). Les résultats sont reportés par rapport à l'explant seul = 1.

Pour rappel, en immuno-histochimie l'expression de la filaggrine et la cytokératine 10 n'était pas différente selon la condition réinnervée ou réinnervée avec inflammation. L'expression relative de l'ARNm de la filaggrine, et la cytokératine 10 n'était pas différente lors de l'ajout du cocktail inflammatoire (n=4).

Concernant la loricrine, son expression était diminuée (un peu moins de 50%) lors de l'ajout du cocktail inflammatoire sur explant non réinnervé (Partie Résultat-Chapitre 2-figure 2B). Lors de la réinnervation, son expression était augmentée dans la condition réinnervée seule pour revenir à la normale dans la condition réinnervée avec inflammation (Partie Résultat-chapitre 2-figure 5). Lors de l'analyse en RT-qPCR, l'expression relative de l'ARNm de la loricrine était également augmentée dans l'explant réinnervé et diminuait lors de l'ajout du cocktail inflammatoire (n=4 ; $p < 0,05$).

4. Apport de l'IL-1 β dans le cocktail inflammatoire

a. Marqueurs de l'inflammation

Analyse en culture 2D sur kératinocytes humains différenciés

Le cocktail inflammatoire était composé initialement par des IL-4 et -13, du TNF- α et du poly I:C. Lors de son ajout sur le modèle d'explant réinnervé, l'expression protéique de TSLP n'était pas augmentée et l'expression transcriptomique montrait une tendance à l'augmentation mais non significative. Dans ce contexte, nous avons évalué l'apport de l'IL-1 β dans notre cocktail. Différentes conditions ont été testées : l'IL-1 β seule, associée au cocktail inflammatoire avec ou sans TNF- α . Ces tests ont dans un premier temps été réalisés sur des kératinocytes différenciés (culture 2D)

Le cocktail a été ajouté sur des cultures 2D de kératinocytes en différenciation et les expressions de l'ARNm de TSLP et de l'IL-8 étaient analysées (figure 23). Le TLR2 étant un récepteur de l'immunité innée impliqué dans la réponse inflammatoire, son expression a également été analysée (figure 24).

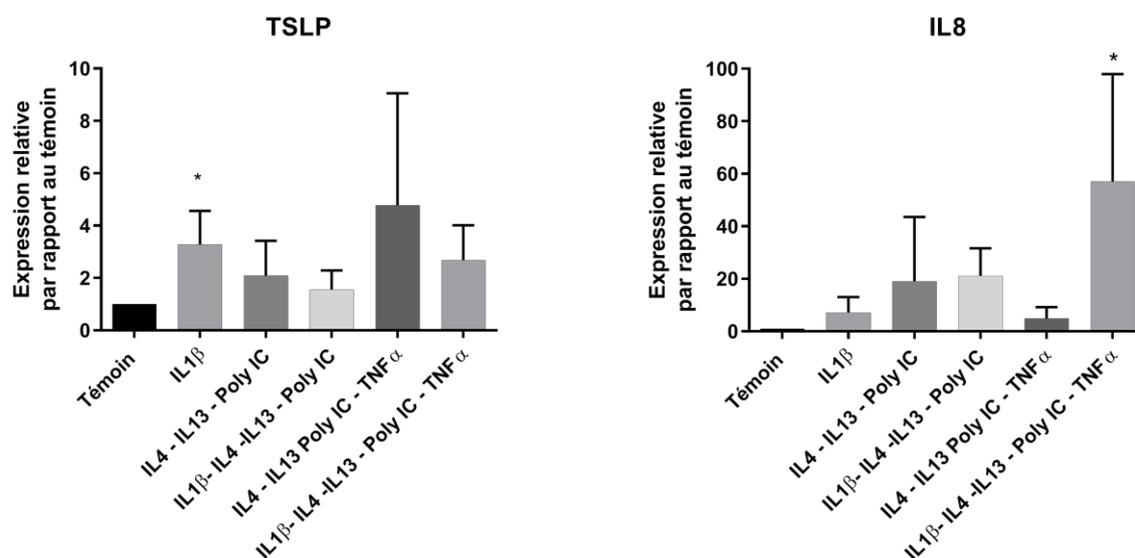


Figure 23: Expression de l'ARNm des marqueurs de l'inflammation TSLP et IL-8 en RT-qPCR sur des kératinocytes humains primaires en différenciation lors de l'ajout de l'IL-1β. Mesure de l'expression relative par rapport au témoin (n=3, *=p<0.05).

L'expression d'ARNm de la TSLP était augmentée de manière significative lors de l'ajout de l'IL-1β seule. L'ajout des autres combinaisons cytokiniques montraient une tendance à l'augmentation (figure 23).

Concernant l'expression de l'ARNm de l'IL-8, nous voyons qu'elle était augmentée par rapport au témoin en présence du cocktail inflammatoire « classique » mais que cette expression était fortement amplifiée lorsque l'IL-1β était ajouté au cocktail (figure 23 ; p<0.05).

Concernant l'expression du TLR2, nous observons que l'ajout de TNF- α et de poly I:C n'entraînait pas de modification d'expression du TLR2. Par contre, les IL-4 et -13 associées ou non au poly I:C et au TNF- α montraient une tendance à l'augmentation de l'expression du TLR2 (figure 24).

L'ajout de l'IL-1 β au cocktail inflammatoire complet potentialisait l'effet sur l'expression de TLR2, mais ces résultats n'étaient pas significatifs.

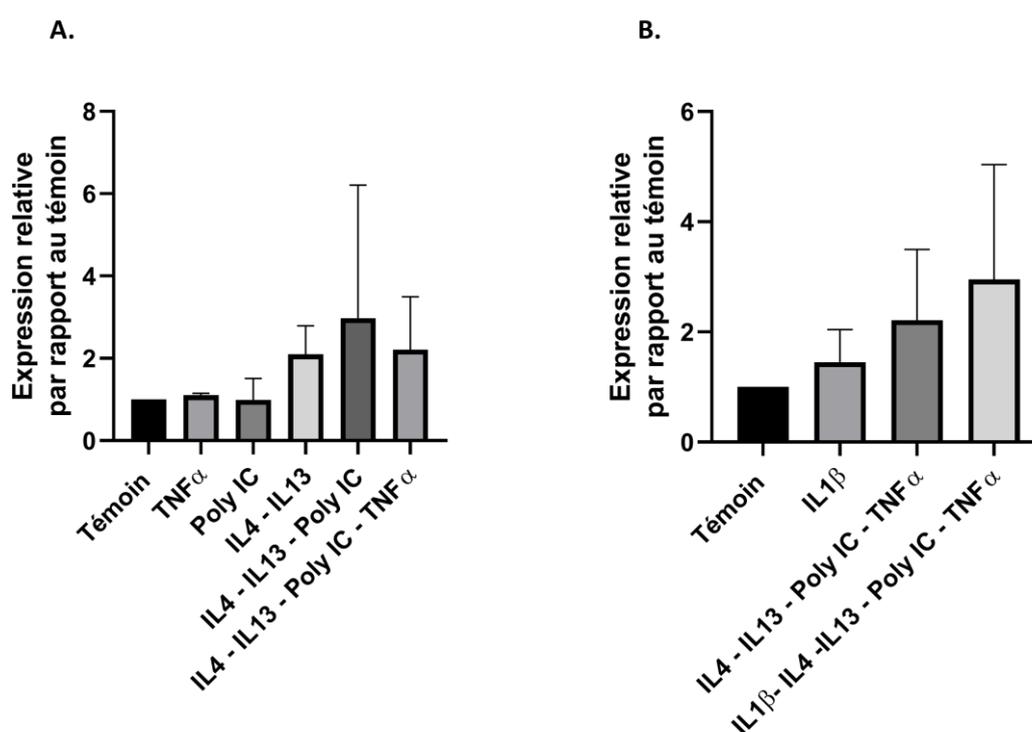


Figure 24 : Expression de l'ARNm du TLR2 en RT-qPCR sur des kératinocytes primaires humains en différenciation lors de l'ajout des différents composés du cocktail inflammatoire (A) et avec ou sans IL-1 β dans le cocktail (B). Ajout des différents éléments du cocktail inflammatoire séparément ou en association. Comparaison avec et sans ajout de l'IL-1 β . Expression relative par rapport au témoin. (n=3).

Analyse de la TSLP dans les surnageants de culture 3D

Ayant montré une augmentation de son expression transcriptomique en culture 2D, nous avons surtout voulu vérifier si l'apport de l'IL-1 β dans le cocktail inflammatoire

permettait de stimuler la libération de TLSP dans nos cultures d'explants de peau. L'IL-1 β était testée seule ou associée avec le cocktail inflammatoire (figure 25). L'inflammation était effectuée selon le protocole classique de culture, c'est-à-dire à J1 et J3 avec récupération à J5.

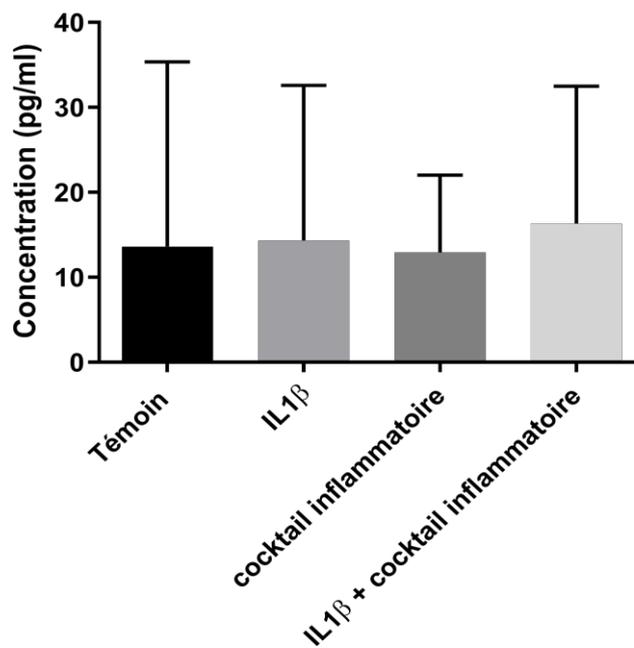


Figure 25: Concentrations de TSLP libérée dans les milieux de culture des explants cutanés non réinnervés en présence ou non d'IL-1 β . Les taux de TSLP étaient mesurés par test ELISA. (n=4).

L'ajout d'IL-1 β n'entraînait pas de modification d'expression de la TSLP lors de son ajout avec ou sans le cocktail inflammatoire sur les explants cutanés.

b. Marqueurs de la barrière épidermique

Dans le même temps, l'impact de l'ajout de l'IL-1 β dans l'environnement inflammatoire était évalué sur les protéines de la différenciation épidermique.

Différentes conditions ont été testées : l'IL-1 β seule, associée au cocktail inflammatoire avec ou sans TNF- α . Le cocktail a été ajouté sur des cultures 2D de kératinocytes en

différenciation et les expressions de l'ARNm de la filaggrine, l'involucrine et la claudine étaient analysées (figure 26).

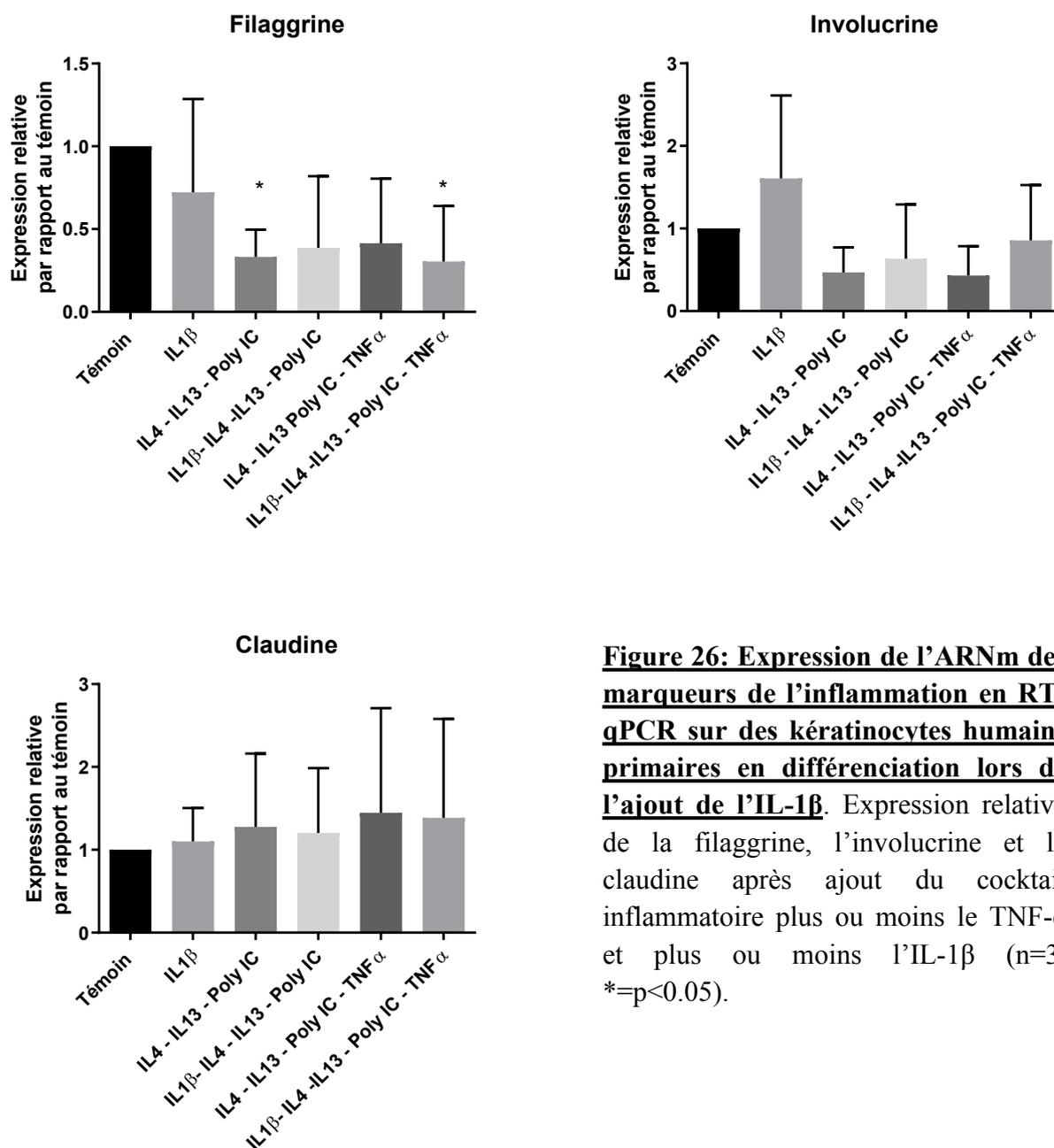


Figure 26: Expression de l'ARNm des marqueurs de l'inflammation en RT-qPCR sur des kératinocytes humains primaires en différenciation lors de l'ajout de l'IL-1 β . Expression relative de la filaggrine, l'involucrine et la claudine après ajout du cocktail inflammatoire plus ou moins le TNF- α et plus ou moins l'IL-1 β (n=3, *=p<0.05).

L'ajout de l'IL-1 β n'entraînait de modification de l'expression de la claudine ou l'involucrine par rapport au cocktail inflammatoire « classique » (IL-4, IL-13, poly I:C et

TNF- α). Concernant le filaggrine, le cocktail inflammatoire supplémenté en IL-1 β entraînait une diminution significative de l'expression de l'ARNm.

III. Discussion

1. Réinnervation et inflammation

L'inflammation neurogène dans la DA est un cercle vicieux avec une inflammation cutanée qui active (altère) les fibres nerveuses, qui à leur tour vont créer de l'inflammation cutanée. Dans notre modèle et pour être au plus proche de l'environnement retrouvé dans la DA, l'explant cutané est réinnervé et mis dans un environnement inflammatoire en même temps. Pour décomposer ce cercle vicieux, il semblait intéressant d'analyser le rôle de l'inflammation sur un explant déjà innervé (rôle 1: impact de l'inflammation sur l'innervation) ainsi que le rôle de l'innervation sur un explant déjà soumis à un environnement inflammatoire (rôle 2 : impact de la ré-innervation sur les marqueurs de l'inflammation). Nous souhaitons notamment étudier l'impact de l'inflammation sur la réinnervation cutanée. Une augmentation de cette dernière étant souvent décrite dans la DA (Sugiura et al., 1997; Tominaga & Takamori, 2014; Urashima & Mihara, 1998)

Classiquement, dans notre modèle de co-culture, les GRDs sont mis en culture quelques jours (7 à 10 jours en moyenne) afin de laisser le réseau de neurites se créer avant de mettre l'explant de peau sur ce tapis cellulaire. Une fois la co-culture en place, l'innervation est généralement effective à J5 et optimale jusqu'à 7 jours de culture (fin de la co-culture). Afin de décomposer ce cercle vicieux comme évoqué plus haut, nous devons donc changer ces conditions de culture. Dans cette optique, le modèle de co-culture avec une réinnervation déjà mise en place en place (à partir de J5 de culture) était soumis à un environnement inflammatoire (rôle 1). Malheureusement, la co-culture durait 9 jours et cela induisait une

diminution drastique du nombre de fibres nerveuses dans les explants de peau. L'effet de l'inflammation sur la réinnervation n'a pas pu être analysé

A l'inverse, l'explant cutané a d'abord été soumis au cocktail inflammatoire dès J0 puis réinnervé secondairement (à J3) (rôle 2). Malheureusement, cette inflammation initiale ne permettait pas la réinnervation de l'explant par les fibres nerveuses sensorielles. Ils nous étaient donc impossible d'apporter des réponses à nos questions.

2. Etude de l'environnement inflammatoire

a. Analyse de l'expression de TSLP dans le modèle DA-like réinnervé

L'expression transcriptomique de la TSLP était augmentée dans nos expérimentations suite au stress inflammatoire. Dans notre modèle sans réinnervation, l'expression était 5 fois plus importante par rapport à l'explant contrôle non réinnervé. La non significativité des résultats est probablement dû à un manque de puissance. Lorsque la réinnervation était présente cette augmentation était également observée mais plus de 2 fois moins importante que dans le modèle non réinnervé. Cette augmentation moindre lors de la réinnervation (mais non statistiquement significative) suggère à nouveau l'effet protecteur des fibres nerveuses sensoriels vis-à-vis de l'environnement inflammatoire et de ces conséquences. En effet, dans les résultats présentés dans l'article, nous montrions que la présence des fibres nerveuses dans l'épiderme avait un effet bénéfique sur la rupture de la barrière cutanée en réduisant l'effondrement de la loricine, confirmés par l'analyse de l'expression de son ARNm ci-dessus (figure 22). Les terminaisons nerveuses semblent montrer également un effet de contrôle dans la libération de la TSLP ; ce même effet avait été observé pour la libération de la SP. Ce rôle bénéfique et protecteur du système nerveux périphérique cutané n'est pas nouveau (Chéret et al., 2014; Lebonvallet et al., 2012; Roosterman et al., 2006; Tominaga et

al., 2007). Cependant, nous le montrons ici dans un contexte d'inflammation de type DA. Or, *in vivo*, cela ne semble pas être le cas puisque la sur-innervation observée dans la DA s'accompagne de prurit intense et contribue et favorise le cercle vicieux de l'inflammation (Tominaga & Takamori, 2014). Cette action bénéfique se transformerait alors en action délétère lorsque les conditions environnantes deviennent incontrôlées.

Dans notre modèle 3D « DA-like » réinnervé, l'expression protéique de la TSLP n'était pas augmentée lors de l'ajout du cocktail inflammatoire. Il était intéressant d'aller voir en amont, c'est-à-dire la production d'ARNm. Les temps de demi-vie des ARNm varient de 15 minutes à maximum 24 heures (Meyer et al., 2004). L'augmentation de l'ARNm de la TSLP 48h après notre dernière inflammation (récupération à J5 pour inflammation à J1 et J3) suggère donc la mise en place d'une inflammation chronique avec une production « continue » d'ARNm de la TSLP. Inflammation qui était régulée à la baisse lors de la réinnervation. L'absence d'augmentation de concentrations dosables de la TSLP dans les surnageants de culture malgré l'augmentation de son expression transcriptomique pourrait s'expliquer par le fait que nous travaillons sur des explants de peau (épiderme + un peu de derme) et que la libération de TSLP au sein de l'épiderme rend difficile sa mesure dans le surnageant de culture. De manière générale les différentes publications relatant une augmentation de TSLP dans les surnageants de culture reportent rarement de fortes concentrations de TSLP suite à une inflammation (Castex-Rizzi et al., 2014; Rouaud-Tinguely et al., 2015). Nos tentatives pour révéler par western blot l'augmentation de l'expression protéique de la TSLP dans nos explants inflammés ce sont révélées infructueuses.

b. Apport de l'IL-1 β dans le cocktail inflammatoire

Malgré tout, nous avons entrepris de modifier notre cocktail inflammatoire en ajoutant à celui-ci de l'IL-1 β , cytokine pro-inflammatoire ayant montré sa capacité à stimuler l'expression de la TSLP dans un modèle d'EHR (Bernard et al., 2017). En effet, l'IL-1 est produite dans l'épiderme par les kératinocytes suite à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires ou des facteurs de stress environnementaux (Zepter et al., 1997). Cette libération d'IL-1 contribue à l'induction de l'environnement inflammatoire dans la DA en entraînant une inflammation cutanée à travers l'induction de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Krause et al., 2012; Renne et al., 2010). Différentes études apportent de plus en plus de preuves cliniques suggérant que l'IL-1 β joue un rôle important dans les voies inflammatoires impliquées dans la phase aiguë et chronique de la DA (Abramovits et al., 2013):

- (i) L'IL-1 joue un rôle dans la fonction barrière. Les ligands de l'IL-1 (IL-18) sont associés à l'évolution chronique des lésions dans la DA
- (ii) La production d'IL-1 β et l'activation de l'inflammasome par différents allergènes de la DA a été décrit (Dai et al., 2011)
- (iii) L'IL-1 β était fortement exprimé dans une étude comparant des biopsies cutanées de 20 patients atteints de DA (versus 20 témoins) (Abramovits et al., 2013)
- (iv) Le taux d'IL-1 β était augmenté dans le sang chez des patients souffrant de DA, avec une corrélation selon la gravité clinique (Nutan et al., 2012). Le taux était diminué après amélioration clinique.

De plus, comme évoqué plus haut, l'IL-1 β entraînait la production de TSLP à 24h et une altération des protéines de la différenciation épidermique dans un modèle d'EHR (Bernard et

al., 2017). Nous avons entrepris des tests sur kératinocytes primaires humains différenciés en ajoutant de l'IL-1 β à notre cocktail inflammatoire. Les résultats se sont avérés assez prometteurs avec une augmentation des taux d'ARNm de molécules impliquées dans l'inflammation comme la TSLP et l'IL-8 et une diminution des protéines impliquées dans la barrière épidermique comme la filaggrine, lorsque l'IL-1 β était ajouté au cocktail inflammatoire classique. Malheureusement, concernant la TSLP, cela ne s'est pas traduit par une augmentation de son taux dans les surnageants de culture des explants. Ces résultats seraient en faveur de son utilisation dans le cocktail inflammatoire d'induction de la DA.

c. Augmentation de l'expression d'un autre marqueur de l'inflammation : IL-8

Lors de nos tests avec l'IL-1 β , nous sommes intéressés à l'expression de l'IL-8. En effet, la DA est caractérisée par une surexpression cytokinique pro-inflammatoire comme l'IL-4 et 13, la TSLP mais également l'IL-8 (Yamanaka & Mizutani, 2011). L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire présente dans la DA et classiquement sécrétée par les cellules immunitaires après sensibilisation avec une antigène (Kimata & Lindley, 1994). La présence d'IL-8 dans la couche cornée est également proportionnelle à la sévérité de la DA et pourrait être un marqueur de sévérité de la maladie (Amarbayasgalan et al., 2013). De plus, l'IL-8 est également corrélée à des marqueurs biologiques comme le taux d'IgE et une atteinte de l'intégrité de la barrière cutanée. Dans un modèle d'épiderme humain reconstruit mimant la DA, la sécrétion d'IL-8 était également augmenté (Rouaud-Tinguely et al., 2015). Cette augmentation d'expression d'IL-8 dans notre modèle est un argument supplémentaire pour prouver la présence d'un environnement inflammatoire mimant la DA.

d. Inflammation et marqueur de l'immunité innée : le TLR2

Concernant le TLR2, une tendance à la diminution fût retrouvée dans le modèle 3D non réinnervé, alors qu'aucune modification protéique ou transcriptomique de TLR2 n'était retrouvée dans le modèle 3D réinnervé. Les TLR2 sont des protéines transmembranaires codées par le gène TLR2 et intervenant dans la reconnaissance des peptides antimicrobiens ou de peptides endogènes libérés en réponse à une agression cutanée. Elles ont plusieurs rôles importants :

- (i) La reconnaissance de plusieurs produits de la paroi cellulaire du *Staphylococcus Aureus* (Skabytska et al., 2016)
- (ii) La stimulation de la production de peptides antimicrobiens (β -defensines humaines et cathélicidines) par les kératinocytes. Ces peptides antimicrobiens vont limiter la croissance bactérienne (Sumikawa et al., 2006)
- (iii) Le maintien des jonctions serrées et donc l'intégrité de la barrière cutanée (Kuo et al., 2013; Waton, 2017)
- (iv) La stimulation de la production de TSLP par les kératinocytes et l'induction de la voie de signalisation de l'IL-6 (Flynn et al., 2019; Le et al., 2011)

Dans le modèle EHR décrit dans le paragraphe précédent (Résultat-IL-1b), l'ajout d'un activateur des TLR2 avec l'IL-1 β avait une action synergique sur la production d'IL-6 (Bernard et al., 2017). Deux mutations entraînant une diminution de son expression et une altération de ces différentes fonctions, ont été identifiées dans la DA sur les gènes codant pour le TLR2 (Waton, 2017; Niebuhr et al., 2010). Ainsi, l'expression des TLR2 est diminuée dans les kératinocytes et monocytes circulants des patients atteints de DA (Kuo et al., 2013) ce que nous montrons dans nos explants soumis au cocktail inflammatoire. De nouveau, le

rôle bénéfique des terminaisons nerveuses peut être souligné puisque cette diminution d'expression du TLR2 était abolie en présence de la réinnervation.

Chapitre 4 : Mise en place d'un modèle 3D d'explant cutané réinnervé à partir de neurones sensoriels issus de « skin-derived precursors » (projet soutenue par la Société Française de Dermatologie septembre 2019)

I. Introduction

Modéliser la DA *in vitro* est un challenge. La plupart des modèles décrits dans la littérature ont été entrepris selon l'hypothèse « inside-outside » par l'ajout de cytokines pro-inflammatoires spécifiques de la DA afin de créer un défaut de la barrière épidermique et de générer une inflammation cutanée (Bernard et al., 2017; Bogiatzi et al., 2007; F. Huet et al., 2018). Et tous ces modèles y arrivent. Cependant, aucun d'eux ne prend en compte et ne reproduit le symptôme le plus caractéristique et handicapant de cette pathologie, le prurit. C'est toute l'originalité de ce projet. Nous avons précédemment mis en place un modèle innervé présentant les caractéristiques de la DA, dans lequel des explants de peau humaine étaient co-cultivés avec des GRD de rat (Résultats Chapitre 1-2 et 3). Un cocktail pro-inflammatoire composé de cytokines Th2, IL-4 et IL-13, TNF- α et Poly I:C était ajouté pour induire l'inflammation dans le modèle réinnervé. La TSLP n'était pas détectée lors de la stimulation avec le cocktail inflammatoire. Même s'il existe une forte homologie de séquence entre les neuropeptides du rat et de l'homme, on ne peut exclure que les cytokines humaines ne puissent pas stimuler correctement les neurones du rat. De plus, les tests effectués sur GDRs de rat avec de la TSLP humaine ont montré l'impossibilité d'activer les neurones sensoriels : ce modèle hétérologue a montré ses limites. C'est pourquoi, nous avons entrepris dans une deuxième partie de ce projet de mettre en place un modèle de peau innervée

entièrement humain. Ce modèle 100 % humain est une perspective très intéressante pour les études ultérieures de la physiopathologie de la DA et plus particulièrement de la voie du prurit (Muller et al., 2018).

Les neurones sensoriels humains pouvaient être obtenus soit à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC), soit à partir de précurseurs dérivés de la peau (SKP) (Muller et al., 2018; Toma et al., 2001). Le laboratoire ayant accès de façon régulière à des prélèvements de peau humaine, il a opté il y a 5 ans à l'optimisation de l'extraction, la culture et la différenciation des SKPs en neurones sensoriels à partir de protocoles déjà existants (Lebonvallet et al., 2012; Toma et al., 2005; Wong et al., 2006) afin de mettre en place son propre protocole (Bataille et al., 2020). Ces cellules se situent dans différentes "niches" de la peau et plus particulièrement dans le derme au niveau de la couche papillaire, la région périvasculaire ou dans la matrice extracellulaire. Les SKPs sont des cellules précurseurs multipotentes dérivées de la crête neurale qui possèdent des caractéristiques des cellules souches telles qu'un auto-renouvellement indéfini et une capacité à générer différentes lignées (Toma et al., 2001; Toma et al., 2005).

L'objectif de nos travaux était de mettre en place un modèle homologue *in vitro* de peau réinnervé en substituant les GRD de rat par des neurones sensoriels humains dérivés des SKP :

- (i) Adaptation du protocole avec analyse la cytotoxicité et l'expression phénotypique des SKPs au cours des dernières étapes de différenciation en neurones sensoriels :
 - a. Marqueurs neuronaux
 - b. Marqueurs de la voie de signalisation du prurit
- (ii) Evaluer l'impact du cocktail inflammatoire et la fonctionnalité des neurones sensoriels dérivés des SKPs

II. Résultats

Dans le protocole existant pour la différenciation des SKPs en neurones sensoriels, les SKPs étaient cultivés initialement dans des boîtes de Petri puis en flasque. Dans l'optique de pouvoir réinnervier des explants cutanés, une étape supplémentaire de décollement des SKPs était nécessaire afin de pouvoir les mettre en culture dans une plaque de culture de type 12 puits, par exemple. Cette nouvelle étape posait 2 questions :

- La trypsination des SKPs pour leur décollement-recollement était-il cytotoxique ?
- Cette étape devait-elle être effectuée avant ou après la maturation ?

1. Etude de la cytotoxicité lors du décollement-recollement des SKPs.

Afin de savoir s'il était possible de décoller les cellules au cours des étapes de différenciation, les cellules étaient décollées après ajout de trypsine pendant 30 secondes avant (J20) et après (J35) l'étape de maturation. Les surnageants étaient collectés le jour de la trypsinisation puis un et deux jours après le traitement. La cytotoxicité était analysée avec le test ToxiLight™ (figure 27).

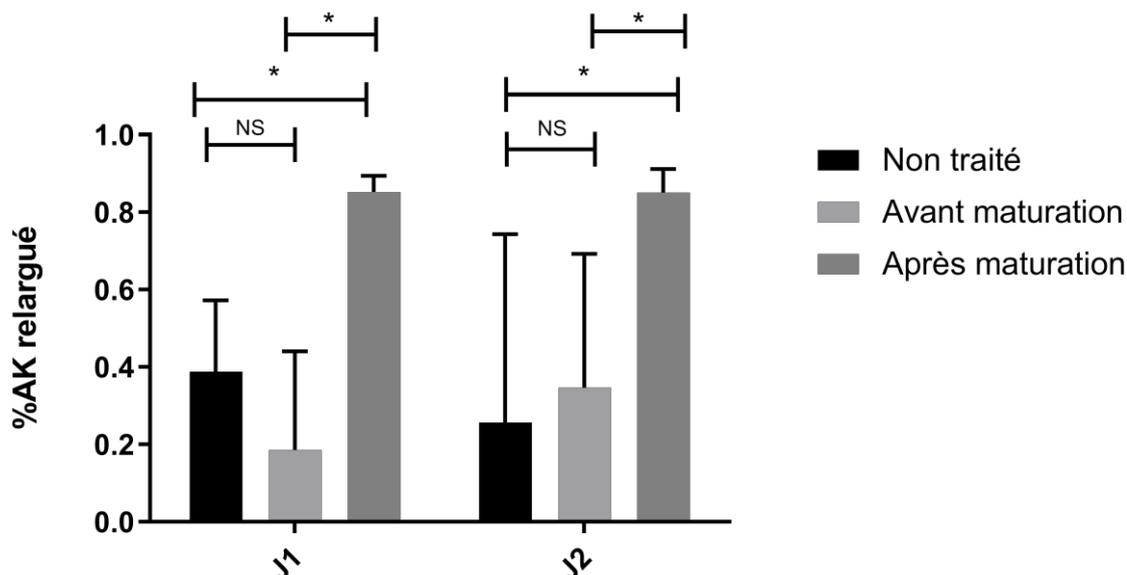


Figure 27 : Absence de cytotoxicité de la trypsinisation avant la maturation au test ToxiLight™ (n=3, *= p<0,05). Le pourcentage de libération d'adénylate kinase à J1 et J2 après trypsinisation était calculé par rapport au jour de la trypsinisation des cellules (J0).

Lorsque les cellules étaient décollées avant la maturation, la cytotoxicité n'était pas augmentée par rapport au contrôle, alors que la cytotoxicité était significativement plus élevée pendant les deux jours suivant la trypsinisation lorsque les cellules étaient décollées puis réensemencées à la fin du processus de différenciation (p<0,05).

Le nombre de cellules était similaire au jour 35 entre les cellules ayant été décollées avant l'étape de maturation et celles du contrôle. Les cellules présentaient des excroissances de neurites et étaient organisées en réseau, ce qui n'était pas observé lorsque les cellules étaient décollées après l'étape de maturation. De plus, la confluence était significativement diminuée lorsque les cellules étaient décollées après l'étape de maturation, avec une perte du réseau neuronale.

Ces éléments nous indiquent qu'en terme de viabilité cellulaire, il est nécessaire de décoller les SKPs avant leur maturation, à la fin de la différenciation (J20) pour pouvoir les ensemercer dans les conditions de culture relatives à la co-culture (plaque 12 puits).

2. Etude de l'expression des marqueurs neuronaux après décollement

Les étapes de décollement des cellules (utilisation de la trypsine, centrifugations successives...) sont d'une manière générale, relativement contraignantes pour tous types cellulaires. Les neurones sensoriels issus de SKPs demeurent des cellules relativement fragiles et nous venons de voir l'impact de cette étape sur leur viabilité. L'étape suivante consistait à vérifier par RT-qPCR l'incidence ou non d'une telle étape sur la présence des marqueurs neuronaux BRN3A et PRDM12 dans les neurones sensoriels dérivés des SKPs à la fin de culture (figure 28).

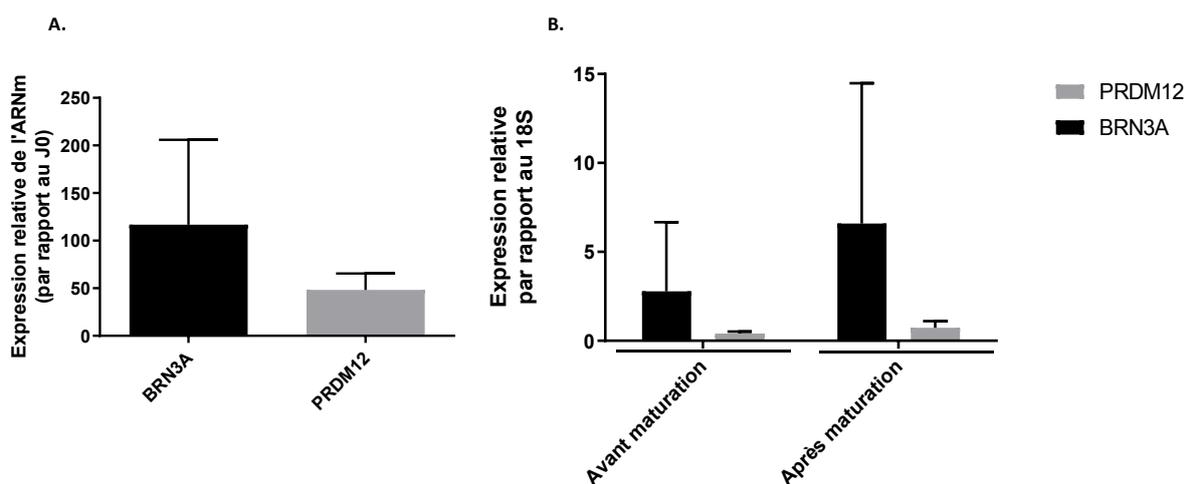


Figure 28 : Expression des gènes neuronaux BRN3A et PRDM12 dans les SKPs à la fin de la maturation (A.) et impact du décollement des neurones sensoriels dérivés des SKPs sur l'expression de ces gènes (B). A. L'expression des ARNm de BRN3A et PRDM12 était mesurée par RT-qPCR à J0 de la culture et à la fin de la différenciation. (=3). B. L'expression de PRDM12 et BRN3A était analysé après décollement-réensemencement avant ou après l'étape de maturation et le résultat était normalisé par rapport à l'absence de décollement.

Les marqueurs des gènes neuronaux BRN3A et PRDM12, facteurs de transcription exprimés dans les neurones sensoriels, étaient respectivement augmentés de 116,8 et 20,6 fois par rapport à l'état indifférencié (SKPs) (figure 28A). Nous observons également que le

décollement des cellules n'entraînait aucune perte d'expression des marqueurs neuronaux testés (figure 28B).

3. Etude de l'expression des gènes des marqueurs de la voie de signalisation du prurit par les neurones sensoriels dérivés des SKPs

Comme nous souhaitons utiliser ces cellules pour étudier les voies de signalisation du prurit dans un modèle *in vitro* de DA, nous avons d'une part, étudié la présence ou non de protéines impliquées dans la voie de signalisation du prurit (analyse jamais effectuée à ce jour encore) et d'autre part, vérifié que cette étape de décollement-réensemencement avant maturation n'avait aucune incidence sur leur expression.

Cette première analyse était réalisée par RT-qPCR à la fin de la maturation (figure 29).

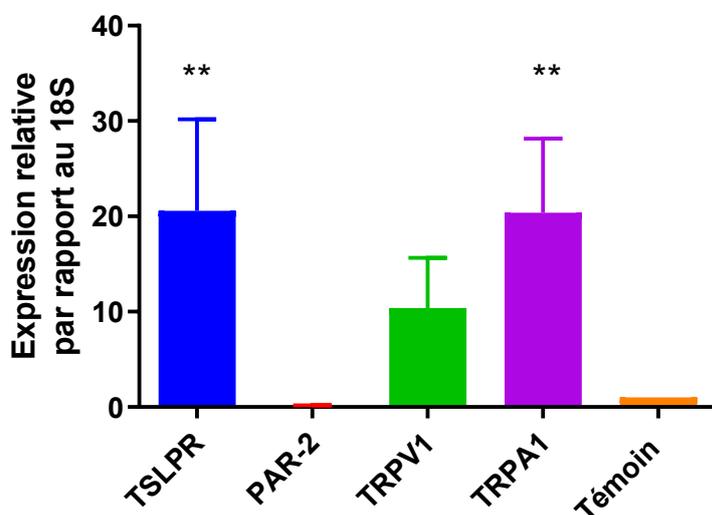


Figure 29 : Expression des marqueurs de la voie de signalisation du prurit dans les neurones sensoriels issus de SKPs à la fin de la maturation. Expression des ARNm de protéines impliquées dans la voie de signalisation du prurit : TSLP receptor (TSLPR), PAR2, TRPV1, TRPA1 (n=3, **=p<0.01). Chaque expression de gène a été calibrée par rapport à l'état indifférencié (SKP).

PAR: Protease activated receptor; TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ; TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1 ; TSLPR : Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor.

Les neurones sensoriels dérivés des SKPs exprimaient des gènes codant pour des récepteurs impliqués dans de la voie de signalisation du prurit. Ainsi, les expressions des ARNm du récepteur de la TSLP (TSLPR), du TRPA1 et du TRPV1 étaient respectivement 20,6 ; 10,4 et 20,39 fois plus élevées que celles de SKPs indifférenciées. De façon surprenante, nous observons une diminution d'expression de l'ARNm du récepteur PAR2 dans les neurones différenciés par rapport au contrôle.

Ces marqueurs étaient à nouveau analysés après l'étape décollement-réensemencement des cellules que nous avons ajouté à la fin de la différenciation (figure 30).

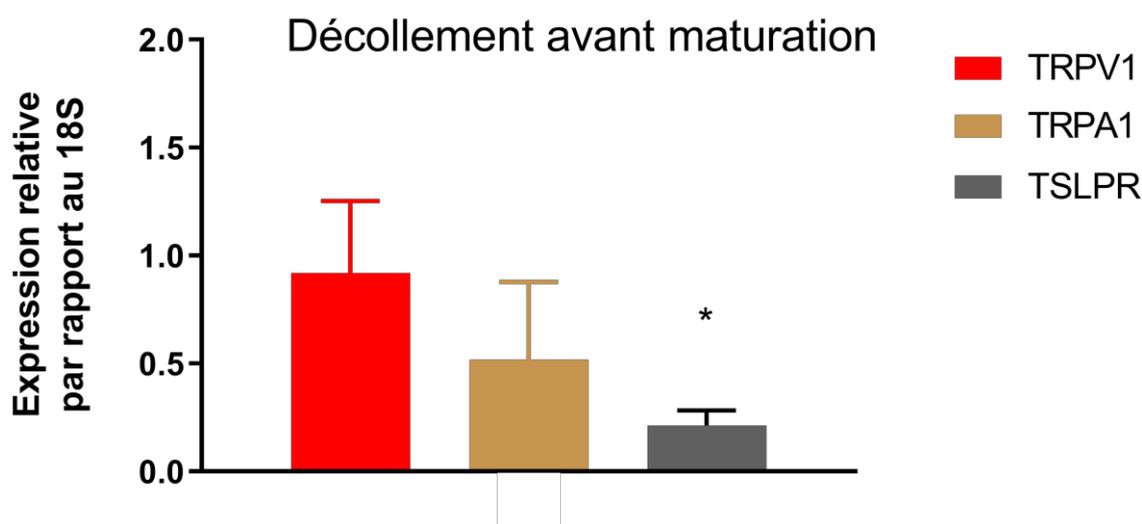


Figure 30 : Expression des marqueurs de la voie de signalisation du prurit après décollement des cellules. Expression des ARNm de protéines impliquées dans la voie de signalisation du prurit : TSLP receptor (TSLPR), TRPV1, TRPA1 (n=3, *=p<0.05). Chaque expression de gène a été calibrée par rapport aux cellules non décollées.
TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ; TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1 ; TSLPR : Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor.

Après décollement des neurones sensoriels dérivés des SKPs, les marqueurs de la voie du prurit (récepteur de la TSLP, TRPV1, TRPA1) étaient toujours exprimés.

4. Les neurones sensoriels humains dérivés de la SKP expriment des marqueurs spécifiques aux neurones sensoriels

Ayant démontré que cette étape de décollement-réensemencement n'avait aucune incidence ni sur la viabilité des cellules, ni sur l'expression de marqueurs neuronaux de type sensoriels et de récepteurs impliqués dans les voies de signalisation du prurit, nous avons complété notre caractérisation de ces neurones sensoriels issus de SKPs par une analyse par immunofluorescence de l'expression de marqueurs neuronaux ainsi que de marqueurs de la voie du prurit (figure 31).

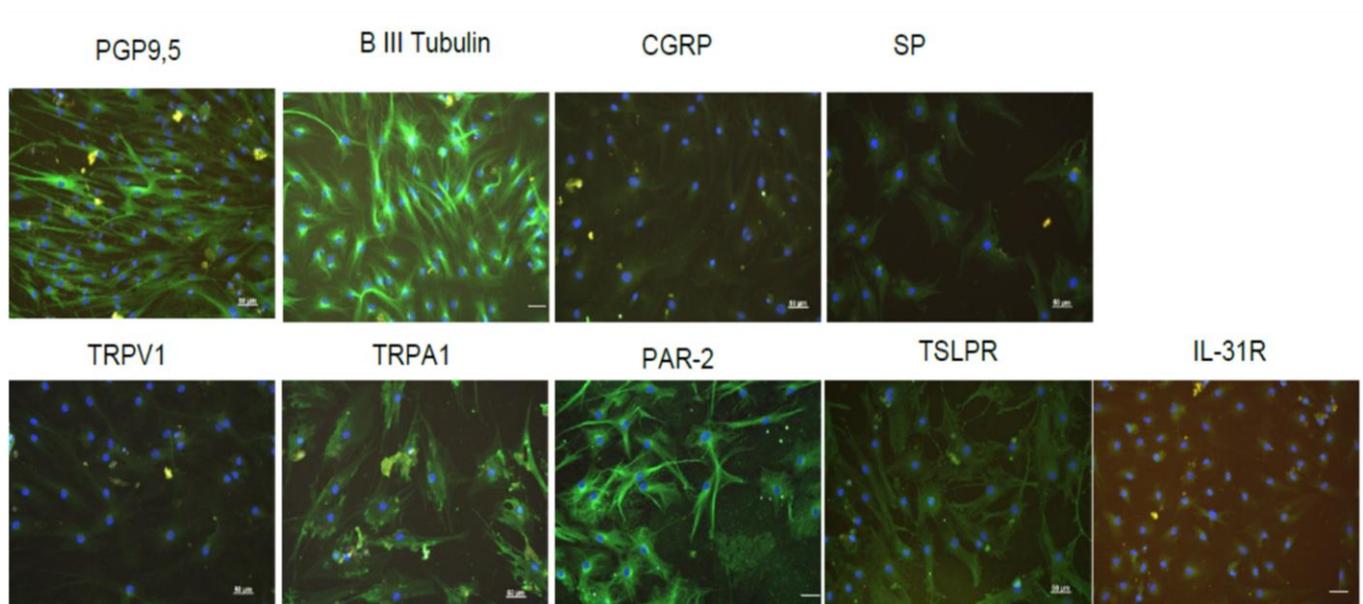


Figure 31 : Caractérisation par immunofluorescence des neurones sensoriels dérivés de SKPs. Les cellules étaient marquées par le PGP9.5 et la β III-tubuline pour les marqueurs neuronaux. La S), le CGRP, le TRPV1, le TRPA1, le PAR2, le TSLPR et l'IL-31R pour les voies du prurit. Barre d'échelle=50 μ m.

CGRP : Calcitonin Gene related Peptide; IL-31R : Il-31 receptor ; PAR2 : Protease Activated Receptor-2 ; Pgp9.5 : Protein gene product 9.5 ; SP : substance P ; TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ; TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1; TSLPR : Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor.

Comme le montre la figure 31, les neurones sensoriels dérivés des SKPs expriment des marqueurs de neurones tels que PGP9.5 et la β -III tubuline.

Les récepteurs connus pour être impliqués dans les voies de signalisation du prurit étaient également détectés avec succès. Bien que le TRPV1 et l'IL-31R étaient exprimés mais faiblement, d'autres récepteurs étaient fortement exprimés, tels que le TRPA1, le PAR2, le récepteur de l'IL-31 et le récepteur de la TSLP. Les neuropeptides CGRP et SP étaient également présents.

5. Effet de l'ajout du cocktail inflammatoire sur les neurones sensoriels issus de SKPs

a. Etude de la toxicité (Test MTT)

Un test de viabilité cellulaire était effectué sur les neurones sensoriels dérivés des SKPs pour déterminer si une cytotoxicité était induite par les molécules du cocktail inflammatoire. Nous avons ajouté à ces tests l'étude de l'effet de la TSLP et d'un activateur du TRPV1, le RTX (figure 32).

Après une incubation de 24 heures avec le cocktail inflammatoire ou le RTX ou la TSLP, nous n'observons aucune induction de cytotoxicité.

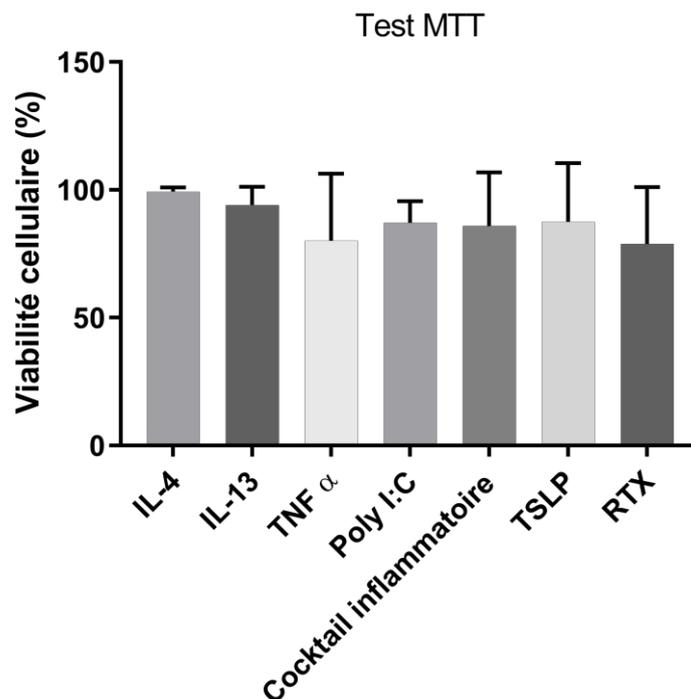
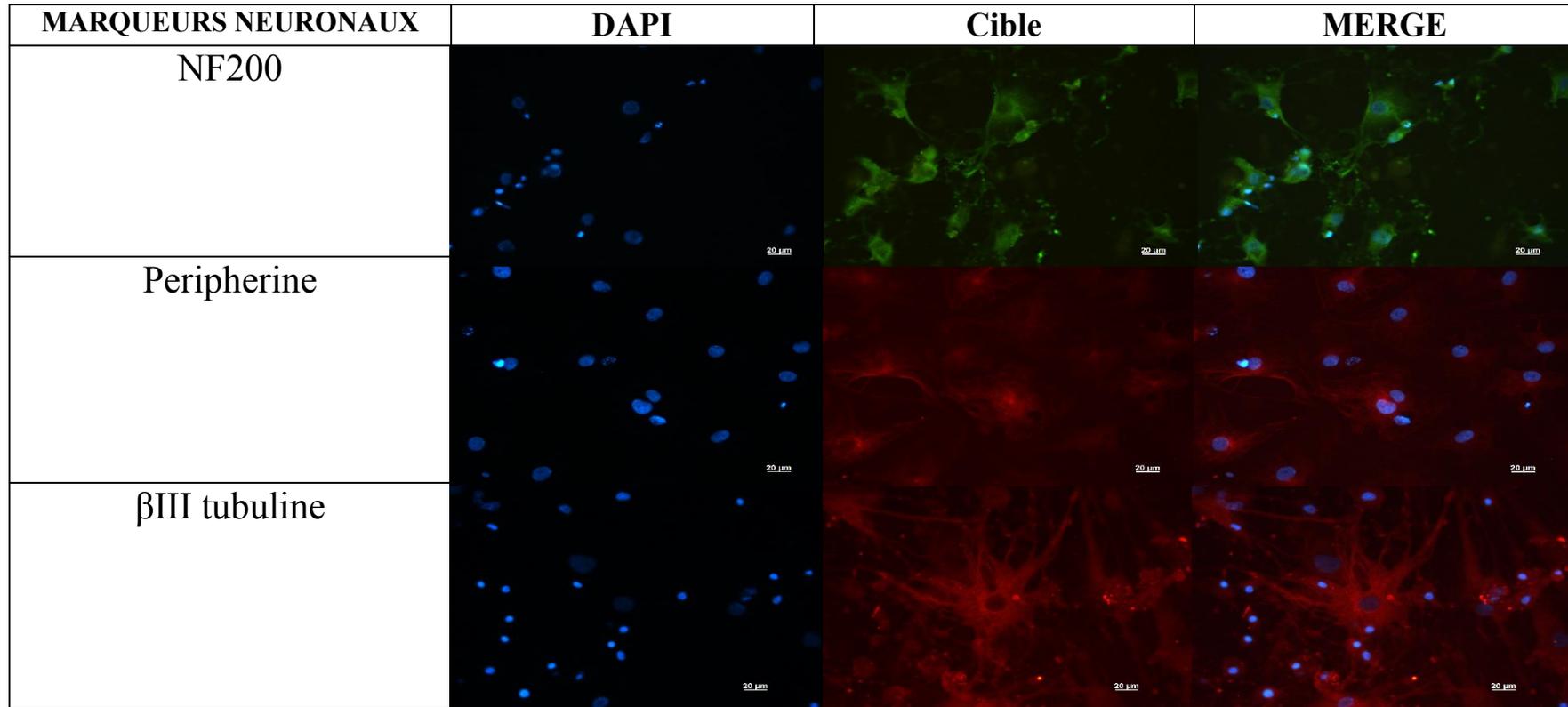


Figure 32 : Absence de cytotoxicité du cocktail inflammatoire sur les neurones sensoriels. Le test MTT était effectué après une stimulation de 24 heures avec 10 μ M RTX (n=3), 100 ng/mL de cytokines IL-13 (n=2), IL-4 (n=2), 10ng/mL TNF- α (n=3) et 1 μ g/mL Poly I:C (n=2) individuellement ou combinés dans un cocktail inflammatoire (n=3) ou 10 ng/mL TSLP (n=3).

b. Etude sur les marqueurs neuronaux et les protéines des voies du prurit.

Les neurones sensoriels dérivés des SKPs étaient cultivés pendant 5 jours avec ajout du cocktail inflammatoire à J1 et J3. Une analyse en immunomarquage était effectuée afin de vérifier la persistance des différents marqueurs neuronaux et l'absence de dé-différenciation des neurones sensoriels issus des SKPs lors de leur mise dans un environnement inflammatoire (figure 33A). Dans le même temps, les marqueurs de la voie de signalisation du prurit de la DA (TSLP et IL-31) après inflammation étaient analysés ainsi que les neuropeptides SP et CGRP (figure 33B).

A



B

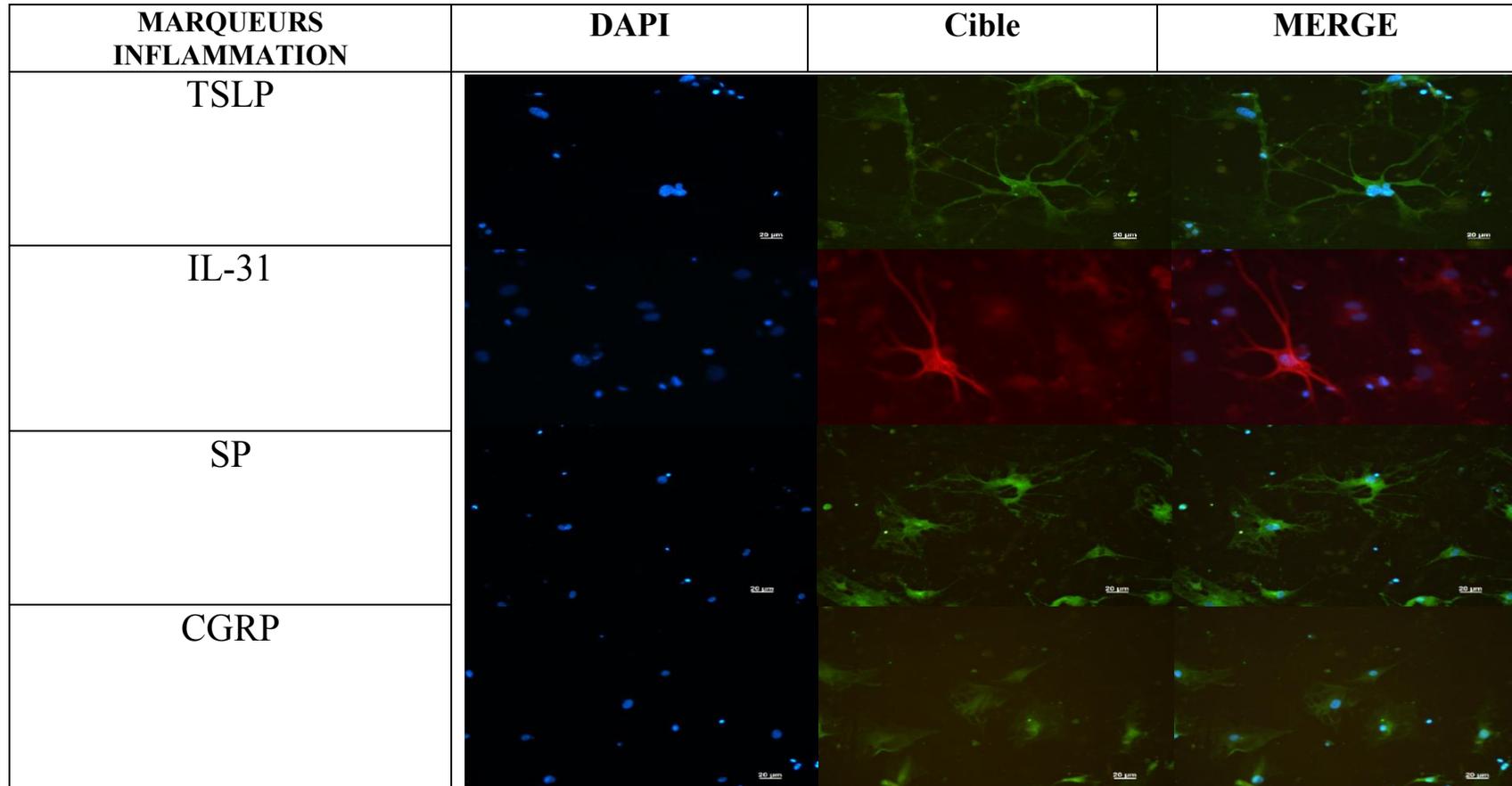


Figure 33 : Caractérisation des neurones sensoriels issus des SKPs dans un environnement inflammatoire. Les SKPs étaient activés à J1 et J3 avec le cocktail inflammatoire et analysés à J5. A. Analyse en immunomarquage de marqueurs neuronaux (NF200, periphérine et BIII tubuline). B. Analyse en immunomarquage des marqueurs de la voie de signalisation du prurit (TSLP et IL-31) et de neuropeptides (SP et CGRP).

NF200 : neurofilament 200 ; TSLP : thymic stromal lymphopoietin ; SP : substance P ; CGRP : calcitonin gene-related protein ; IL-31 : interleukine-31.

Concernant les marqueurs neuronaux, l'environnement inflammatoire n'entraînait pas de modification du phénotype neuronal et les neurones sensoriels exprimaient le neurofilament 200, la périphérine et la BIII-tubuline. Concernant la voie du prurit, la TSLP était fortement exprimé et à moindre mesure l'IL-31. Les neuropeptides (SP et CGRP) étaient aussi exprimés.

a. Effet du cocktail inflammatoire sur la libération de Substance P (SP) par les neurones dérivés des SKPs

Nous avons ensuite analysé la capacité de ces cellules à libérer le principal neuropeptide impliqué dans l'inflammation neurogène observée dans la DA : la SP.

Nous avons utilisé 3 cultures différentes de neurones sensoriels issus de SKPs et les avons soumis soit au stress inflammatoire, soit à la TSLP seule soit au RTX, un activateur du récepteur TRPV1. Les taux de neuropeptides libérés dans les surnageants de culture étaient mesurés par ELISA (figure 34).

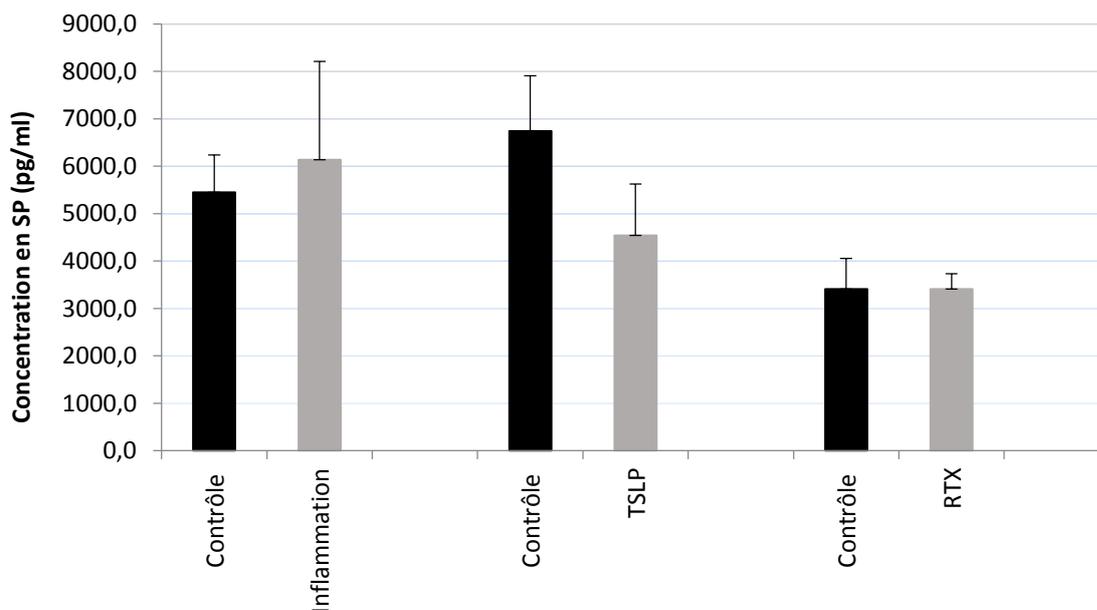


Figure 34 : Mesure du taux de Substance P libérée dans les surnageants de cultures de neurones sensoriels issus de SKPs activés ou non par le cocktail inflammatoire, la TSLP ou le RTX. Les neurones sensoriels issus de SKPs étaient activés pendant 15 minutes soit avec le cocktail inflammatoire, la TSLP (10ng/ml) ou le RTX puis les surnageants récupérés et congelés à -80°C. Les mesures de SP étaient réalisées par dosage ELISA. (n=3 pour cocktail inflammatoire, n=1 pour le RTX).

RTX; resiniferatoxin; SP : substance P; TSLP : thymic stromal lymphopoietin.

Nous observons que les taux de SP retrouvés dans les surnageants de culture sont très élevés. Malheureusement, aucune différence n'a pas été mise en évidence entre les conditions non activées et les conditions activées. Même le RTX, spécifique activateur du TRPV1, responsable de la libération de SP, n'a montré d'efficacité.

Nous retenons malgré tout que ces cellules synthétisent et peuvent libérer de la SP.

6. Comparaison du phénotype des neurones sensoriels issus de SKPs entre le de culture SKP et le milieu de culture des GRDs

Classiquement, nous incubons nos co-cultures explant de peau humaine/GRDs de rat dans un autre milieu que celui dans lesquelles murent les neurones sensoriels issus de SKPs.

Nous avons voulu vérifier comment se « comportaient » ces derniers dans le milieu de co-culture dit « classique ».

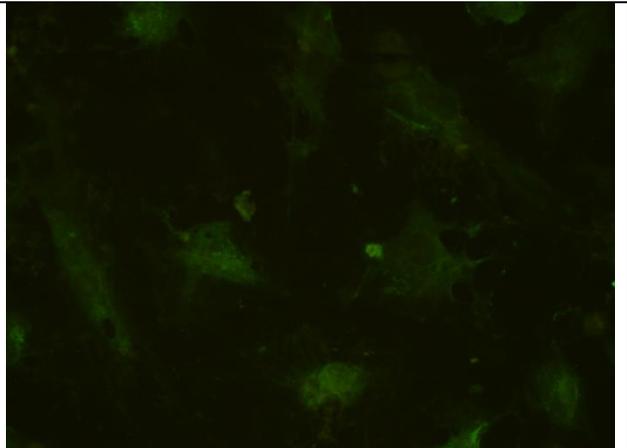
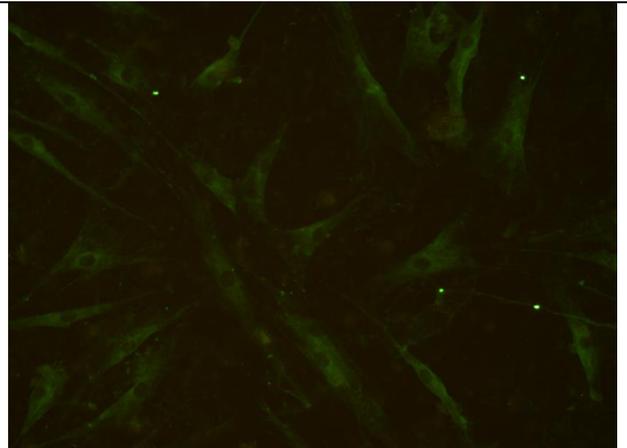
Milieu de culture de SKPs « classique »	Milieu de culture de GRD
DMEM/DMEMF12/Neurobasal 1/1/2	DMEM/DMEMF12 (1 :1)
NB-21-A (100X)	NB-21-A (50X)
N2 (200X)	NGF 100 ng/ml
NGF 100 ng/ml	BDNF 10 ng/ml
GDNF 10 ng/ml	Insuline 10µg/ml
BDNF 10 ng/ml	Hydrocortisone 10ng/ml
dbc AMP 500 µM	
	

Figure 35 : Modifications morphologique des neurones sensoriels lors de la culture avec le milieu des ganglions rachidiens dorsaux. Les neurones sensoriels dérivés des SKPs étaient cultivés 5 jours soit avec le milieu classique des SKPs ou avec le milieu de culture des GRDs. Analyse en immunohistochimie de la substance P. Grossissement X20.

Comme nous le voyons dans la figure 35, la morphologie des neurones dérivés des SKPs était différente selon le milieu de culture utilisé (pendant 5 jours) après la fin de la

maturation. Lors de la culture dans le milieu GRD, les neurones possédaient un aspect plus allongé, longiligne avec des neurites à leurs extrémités.

La suite des expérimentations devait être la mise en co-culture de ces neurones sensoriels issus de SKPs avec des explants de peau afin de mettre en place ce modèle 3D réinnervé 100% humain et d'y appliquer le stress inflammatoire préalablement défini. Malheureusement à cause de la crise sanitaire, toutes ces expérimentations n'ont pu être réalisées.

III. Discussion

La culture des SKPs permet d'obtenir des neurones sensoriels possédant les marqueurs de la voie du prurit et capable de sécréter de la SP. Dans l'objectif final de la mise en place d'un modèle homologue d'explant réinnervé, le protocole de base de culture des SKPs a dû être adapté (Bataille et al., 2020).

1. Pas de cytotoxicité ni de dédifférenciation des neurones sensoriels lors du décollement-réensemencement avant la maturation ni après ajout d'un environnement inflammatoire

Afin de déterminer le moment approprié pour décoller-réensemencer les cellules en prévision de la mise en présence avec l'explant cutané afin d'établir notre modèle 3D réinnervé 100% humain, les cellules étaient décollées à différentes étapes du processus de différenciation : soit avant la maturation (à la fin de la différenciation) soit à la fin de la maturation. La caractérisation de l'étape d'ensemencement des neurones sensoriels dérivées des SKPs permettait de savoir si cette étape devait être anticipée avant la maturation en neurones sensoriel ou si cette étape pouvait être réalisée après leur maturation, ce qui semblait le plus simple. Le test de cytotoxicité (ToxiLight™) montrait une cytotoxicité plus élevée lorsque le décollement était effectué sur des neurones matures qui présentaient déjà des longues neurites. À cette étape, la digestion enzymatique avec la trypsine induisait une mort cellulaire massive, interdisant leur utilisation pour les ensemercer pour le modèle 3D après l'étape de maturation. Pour éviter cette étape limitante, et la perte massive de cellules, les neurones sensoriels dérivés des SKPs doivent donc être décollés avant la croissance des

neurites. Ce résultat est conforme aux observations faites avec un modèle réinnervé utilisant des neurones sensoriels dérivés d'iPSC (Muller et al., 2018). Néanmoins, nous avons voulu vérifier que cela n'avait aucune incidence sur leur phénotype et l'analyse en RT-qPCR montrait que le décollement n'avait pas d'effet significatif sur l'expression des gènes et que le phénotype « neurones sensoriels différenciés » était stable dans le temps (maintien de la périphérine et de BRN3A notamment).

Les neurones dérivés des SKPs sont des cellules sensibles à leur environnement et il était ensuite important de vérifier que l'ajout de nouvelles molécules telles que le cocktail inflammatoire (IL-4, IL-13, TNF- α et Poly I:C) n'engendrait pas une modification des marqueurs exprimés. Nous montrons ici que l'ajout du cocktail inflammatoire n'entraînait aucune cytotoxicité ni de modification phénotypique (présence des marqueurs neuronaux BRN3A, périphérine et NF200).

2. Les neurones sensoriels dérivés des SKPs expriment des marqueurs de la voie de signalisation du prurit et sécrètent des neuropeptides

Une autre étape importante était de vérifier que les cellules finales pouvaient être utilisées dans l'étude des voies de signalisation du prurit car exprimant les récepteurs (pruricepteurs et autres) impliqués dans sa signalisation. La précédente étude réalisée au laboratoire avait montré en imagerie calcique une augmentation d'activité calcique lorsque ces neurones sensoriels dérivés des SKPs étaient activés par des agonistes spécifiques de TRPV1 (capsaïcine), TRPA1 (Polygodial) et PAR2 (PAR-AP) (Bataille et al., 2020). Cela suggérait la présence de ces récepteurs sur ces neurones. Nous montrons ici que TRPV1, TRPA1 mais également le récepteur à la TSLP, sont bien exprimés tant au niveau transcriptomique et protéique. A notre connaissance c'est la première fois que cette

démonstration est faite. En revanche, le niveau d'expression du PAR2 s'est révélé faible dans nos cultures. Nous n'avons pas d'explication à ce stade mais il semble que malgré cela ce récepteur est fonctionnel comme l'avait démontré Bataille et al dans leur étude (Bataille et al., 2020). La démonstration de l'expression des récepteurs comme TRPV1 et TRPA1 sur ces cellules est cruciale car ils régulent la libération des neuropeptides (Gouin et al., 2017). La délivrance de neuropeptides des terminaisons nerveuses cutanées induit une inflammation neurogène cutanée (Gouin et al., 2015). Cette inflammation neurogène participe à l'induction de la DA et de son prurit (Yosipovitch et al., 2018).

Lors de l'ajout de l'environnement inflammatoire, les neurones sensoriels dérivés des SKPs exprimaient de nombreux médiateurs présents dans le prurit et plus particulièrement dans le prurit de la DA comme la TSLP, ou l'IL-31. Dans un modèle de neurones sensoriels dérivés d'iPSC, une autre catégorie de cellules souches, l'ajout de l'IL-4 et l'IL-13 était analysé en imagerie calcique et qPCR sur des gènes impliqués dans la neurotransmission (Guo et al., 2018). Dans cette étude, l'IL-4 et l'IL-13 augmentaient la signalisation du Ca^{2+} dans les neurones sensoriels, suggérant que l'IL-4 et 13 pouvaient activer les neurones sensoriels dérivés des iPS. Il était également observé une régulation à la hausse de l'interféron α (IFNA7/8) et des gènes des IL-9 et -18. Des gènes impliqués dans la neurotransmission étaient régulés à la baisse, ce qui suggère que ces cytokines sont des récepteurs dysrégulateurs impliqués dans la neurotransmission. Bien que la TSLP reste à ce jour le marqueur principal du prurit de la DA, l'IL-31 semble jouer un rôle très important. Le taux d'IL-31 est augmenté chez les patients atteints de DA et va directement activer la voie de la signalisation du prurit via son récepteur situé sur les neurones sensoriels et les kératinocytes (Otsuka et al., 2011; Sonkoly et al., 2006). Le taux d'IL-31 sérique semble être corrélé à la gravité de la DA et de son prurit (Lu et al., 2018). La TSLP et l'IL-31 sont des cibles actuelles du traitement de la

DA. Le tezepelumab (analogue de la TSLP) et le nemolizumab (récepteur monoclonal de l'IL-31) sont en cours d'études (Kabashima et al., 2018; Simpson et al., 2019).

De plus, nous avons montré que les neurones sensoriels dérivés des SKPs exprimaient des neuropeptides impliqués dans l'inflammation neurogène et la voie du prurit : la SP et le CGRP (ICC). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la libération de SP (médiateur principal du prurit) dans les milieux de culture des cellules. Nous montrons la présence de ce neuropeptide, preuve que sa libération est totalement fonctionnelle. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activation spécifique de sa libération suite à l'utilisation d'agonistes spécifiques tels que le RTX, puissant activateur du TRPV1 ; aucune augmentation d'activité n'était détectée ni avec le cocktail inflammatoire ni avec la TSLP seule. La libération de neuropeptides traduit la fonctionnalité de ces neurones sensoriels et leur capacité à communiquer avec les kératinocytes pour participer à la voie de signalisation du prurit.

A ce stade, nous avons donc validé la possibilité d'utiliser les neurones sensoriels dérivés des SKPs afin d'étudier les voies de signalisation du prurit d'une manière générale et celui lié à la DA, plus particulièrement.

L'étape suivante consiste donc à la réinnervation d'explant cutané par ces cellules. Classiquement, notre modèle 3D réinnervé utilise un milieu de culture différent de celui utilisé pour la culture des neurones sensoriels dérivés des SKPs. Il nous fallait donc vérifier si ce changement n'avait aucune incidence sur ces cellules. Dans cette optique, les neurones sensoriels étaient cultivés 5 jours dans le milieu de culture habituel des co-cultures GRD-explant. La modification morphologique des neurones sensoriels était nette. Or, il n'est pas impossible qu'un changement morphologique neuronal s'accompagne d'un changement fonctionnel. Il nous faudra donc à nouveau réaliser une caractérisation phénotypique de ces neurones sensoriels. Il n'est pas aisé de trouver une ou des explications à ce changement

morphologique des neurones. La composition différente en Ca^{2+} et en facteurs de croissance entre les deux milieux peut être une explication. Cependant, ne connaissant malheureusement pas la composition précise du milieu NeurobasalTM utilisé pour la maturation des neurones sensoriels issus de SKPs, nous ne pouvons uniquement juger que sur les facteurs que nous rajoutons et sur la concentration calcique connue. Concernant le Calcium, sa concentration en Ca^{2+} est plus faible dans le milieu NeurobasalTM que celle du milieu des GRDs (200,0 mg/l contre 116,0 mg/l pour le DMEMF2 combiné au 200 mg/l pour le DMEM). Quant aux facteurs de croissance, le GDNF, le N2 et le dbAMPc étaient également absent du milieu de culture « GRD ».

En conclusion, bien que le processus de différenciation des SKPs en neurones sensoriels soit long et coûteux, les SKPs sont un outil novateur et précieux pour la création de futur un modèle d'explant réinnervé entièrement humain. Les neurones sensoriels issus des SKPs expriment les caractéristiques des neurones sensoriels périphériques, ainsi que les récepteurs impliqués dans la voie d'induction du prurit et libèrent également les neuropeptides impliqués dans la boucle d'induction de l'inflammation neurogène cutanée.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE

Synthèse de l'étude

Les résultats accumulés au cours de ces trois années sur la mise en place d'un modèle 3D réinnervé « DA-like » ont permis d'apporter des réponses sur l'impact des fibres nerveuses sensorielles cutanées dans la physiopathologie de la DA.

La première partie du projet décrite dans le chapitre 1 a permis de définir le cocktail inflammatoire le plus pertinent pour notre modèle (tableau 10). Un équilibre entre impact de l'inflammation et absence de toxicité a été trouvé avec l'association aux concentrations définies des IL-4 et -13 avec le TNF- α et le poly I :C. La physiopathologie de la DA se caractérise par une inflammation cutanée Th2 à la phase aiguë (Weidinger et al., 2018). Notre cocktail inflammatoire amène un environnement inflammatoire largement orienté vers la voie Th2 avec les IL-4 et -13. Nous l'avons complexifié avec l'ajout d'un activateur de TLR, le poly I :C. Cette activation de TLR3 des kératinocytes, récepteur de l'immunité innée, est connue pour induire la sécrétion de TSLP, tout comme le TNF- α (Bogiatzi et al., 2007; Suri et al., 2018). L'originalité de notre protocole réside en une double inflammation qui permet un maintien de notre peau dans un environnement inflammatoire, élément que les modèles actuels ne font pas (E. De Vuyst et al., 2017; F. Huet et al., 2018). L'inflammation toutes les 48h (à J1 et J3 et analyse à J5) présentait les meilleurs résultats et permettait d'obtenir les caractéristiques morphologiques de la DA.

Tableau 10 : Synthèse du chapitre 1

Composition du cocktail inflammatoire	IL-4 et 13 : 100 ng/ml TNF- α : 10 ng/ml Poly I :C : 1 μ g/ml
Particularité du TNF-α	Toxicité à 20 ng/ml Absence de toxicité à 10 ng/ml
Particularité du Poly I :C	Doublement de l'expression de TLR3 à 1 μ g/ml
Temps activation J1 et J3	Diminution de l'expression de la filaggrine et de la loricine Retard de différenciation épidermique

IL : interleukine ; Poly I :C : acide polyinosinique-polycytidylique ; TLR : Toll-like receptor ; TNF : tumor necrosis facteur.

La suite logique était d'incorporer à cet explant de peau humaine, des neurones sensoriels issus de rat, afin d'obtenir ce modèle 3D réinnervé « DA-Like » ; le protocole de réinnervation se basant sur celui utilisé en routine au laboratoire (Lebonvallet, 2013 ; Cheret, 2014). Les résultats décrits dans le chapitre 2 ont permis de mettre en évidence l'impact des fibres nerveuses sensorielles dans un modèle de DA-like. Nous avons réussi à réinnervier un explant cutané humain par des neurones sensoriels issus de GRDs de rat dans un environnement inflammatoire de DA. Nous aurions pu nous attendre à une amplification de l'effet du cocktail inflammatoire sur notre explant *via* l'inflammation neurogène. Au contraire, les fibres nerveuses sensorielles ont démontré un rôle plutôt protecteur vis à vis des kératinocytes. L'apport des fibres nerveuses sensorielles dans notre modèle « DA-like » permettait de restaurer la barrière épidermique (filaggrine, loricine) et de contrôler les marqueurs de l'inflammation tels que la TSLP et la substance P. Cet effet protecteur peut s'expliquer par une absence de stimulation de certains récepteurs neuronaux empêchant les

neurones sensoriels de rentrer dans la boucle de l'inflammation neurogène : inflammation-altération épidermique. De plus, et contrairement à ce que nous attendions, le nombre de fibres réinnervant l'épiderme n'a pas été plus important lorsque le stress inflammatoire était présent. Ce nombre de fibres non augmenté dans les peaux inflammées évitait peut-être un « emballement » du système et faisait conserver aux fibres nerveuses leur rôle protecteur et de contrôle dans la peau. L'inflammation ne semble donc pas être un facteur favorisant la croissance neuronale et la surinnervation observée dans les peaux de patients atteints de DA. Plusieurs hypothèses peuvent-être avancées comme la stimulation mécanique induite par le grattage et non reproductible dans notre modèle. L'absence d'IL-31 est une autre hypothèse. Cette IL importante dans la DA va directement activer la voie de la signalisation du prurit via son récepteur situé sur les neurones sensoriels et les kératinocytes (Otsuka et al., 2011; Sonkoly et al., 2006).

Nous avons continué à améliorer nos connaissances sur ce modèle hétérologue de « DA-like » (chapitre 3). Concernant les marqueurs de l'inflammation, l'analyse transcriptomique de la TSLP montrait une augmentation de son expression après ajout du cocktail inflammatoire mais à nouveau régulée à la baisse lors de la réinnervation. L'IL-8, autre facteur d'inflammation, était également augmentée. Nous avons également testé l'apport de l'IL-1 β dans notre cocktail inflammatoire. L'ajout d'IL-1 β n'entraînait pas de modification d'expression de la TSLP lors de son ajout sur les explants cutanés. Cependant, son action sur l'augmentation de l'IL-8 et certainement d'autres marqueurs de l'inflammation, nous fait réfléchir à son incorporation dans notre cocktail inflammatoire : des tests complets sur explants réinnervés et inflammés avec et sans cette cytokine nous permettront de mieux appréhender son utilisation. Concernant le TLR2, une tendance à la diminution était retrouvée dans le modèle d'explant non réinnervé, mais aucune modification protéique ou transcriptomique de TLR2 n'était retrouvé après réinnervation.

Tout ce travail de mise en place et d'optimisation du modèle nous a malheureusement aussi montré ses limites. En effet, ce modèle hétérologue peau humaine/neurones sensoriels de rat a permis au laboratoire depuis de nombreuses années de mieux analyser et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les voies de signalisation du prurit ; de nombreuses publications en témoignent. Cependant, dans notre projet d'étude de la physiopathologie du prurit de la DA, l'élément clé décrit par de nombreuses publications depuis Wilson en 2013, est la TSLP. Or, après de nombreuses interrogations sur certains résultats obtenus, nous nous sommes rendu compte que, malgré la présence du récepteur de la TSLP sur les neurones sensoriels de rat, celui-ci n'était peu ou pas activé par la TSLP humaine. Il nous fallait donc changer de stratégie qui s'avère être un véritable challenge (chapitre 4). Nous avons adapté et modifié le protocole de différenciation de neurones sensoriels issus des SKPs préalablement utilisé au laboratoire (Bataille et al., 2020). Tout d'abord nous avons montré que ces neurones sensoriels peuvent-être incorporés dans un modèle de réinnervation d'explant cutané. Le décollement des neurones sensoriels dérivés des SKPs avant l'étape de maturation n'entraînait pas de cytotoxicité ou de modification phénotypique. De plus et surtout, ces neurones possèdent une grande partie des marqueurs de la voie de signalisation du prurit de la DA. L'ajout du cocktail inflammatoire ne modifiait pas l'expression des marqueurs neuronaux ni de ceux de la voie du prurit. De plus, les neurones sensoriels dérivés des SKPs sont fonctionnels et sécrètent des neuropeptides comme la substance P.

Nous devons réaliser les tests de réinnervation avec les neurones sensoriels issus de SKPs dans le courant de l'année 2020. Malheureusement, la crise sanitaire nous a privées de cette ultime étape. Ceci sera donc l'objet de perspectives de travail.

Perspectives de l'étude

La poursuite de la caractérisation des modèles de « DA-like » ou la création de nouveaux modèles est indispensable pour améliorer notre compréhension de cette maladie à la physiopathologie complexe. De plus, la révolution thérapeutique en cours dans la DA rend nécessaire ces modèles pour, à la fois tester leur efficacité, et comprendre leur mécanisme d'action.

I. Modèle hétérologue de « dermatite atopique-like » réinnervé

Les perspectives concernant le modèle *in vitro* DA-like réinnervé sont multiples.

D'une part, de nombreuses caractéristiques du modèle n'ont pas encore été explorées. L'inflammation cutanée et plus particulièrement l'inflammation neurogène et des protéines de la barrière épidermique peuvent être développées. Au-delà de ces caractéristiques, il serait très intéressant de regarder la composition lipidique de notre épiderme. Les lipides, principalement composés de céramides, acides gras libres et cholestérol, sont modifiés dans la DA (Elias, 2012). Notre inflammation modifie probablement cette composition mais cela reste à démontrer et surtout quel est l'impact de la réinnervation sur cette composition lipidique. Dans le modèle de Danso et al. le TNF- α semble jouer un rôle important dans cette modulation de composition lipidique.

Dans le même principe, l'analyse du microbiote cutané semble très intéressante, en se focalisant plus particulièrement sur le *Staphylococcus Aureus* (Di Domenico et al., 2019; Geoghegan et al., 2018; Kim et al., 2019). Nous pouvons nous demander si le microbiote de nos explants en culture est modifié ? Quel est l'impact de l'inflammation ? Et surtout quel est

l'impact de la réinnervation sur cette composante ? Une analyse transcriptomique serait également un atout supplémentaire pour la caractérisation de notre explant.

D'autre part, une modification ou une complémentation du cocktail inflammatoire semble possible. Par exemple, quel est l'effet de l'IL-31, cytokine importante dans la voie de signalisation du prurit, dans notre modèle ? Cette cytokine agit-elle directement sur les terminaisons nerveuses sensorielles ? L'ajout d'antagoniste comme d'anti-IL-4 pourrait-être étudié.

Afin de complexifier ce modèle, la création d'une anomalie de la barrière cutanée peut-être réalisée. Une cible préférentielle pourrait-être la filaggrine mais la création d'une atteinte de la barrière lipidique peut également être réalisée (Weidinger et al., 2007). L'étude de l'impact de la réinnervation sur un modèle avec une anomalie de la barrière épidermique serait intéressante. Cette anomalie initiale de la barrière épidermique engendre-t-elle une inflammation neurogène et une aggravation des lésions ? Ou au contraire la réinnervation permet-elle sa correction ?

Ce modèle laisse place à de multiples questions et interrogations à explorer dans les années à venir.

II. Modèle homologue de dermatite atopique-like réinnervé

La mise en évidence d'une réinnervation d'un explant humain par les neurones sensoriels dérivés des SKPs est la prochaine étape du projet. Dans le même temps, l'analyse du comportement de ces neurones sensoriels dans un environnement inflammatoire ou non semble passionnante. En premier temps, l'environnement inflammatoire induit-il ou non une

modification du nombre de fibres sensorielles ou de leur morphologie ? Dans un second temps, l'analyse des marqueurs d'inflammation et de la barrière épidermique de la réinnervation par les neurones sensoriels serait intéressante. Et dans un troisième temps, une attention sur la voie de signalisation du prurit de la DA avec l'ajout d'IL-31 dans le cocktail inflammatoire.

Ce projet ayant été financé par la SFD en septembre 2019, il sera poursuivi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramovits, W., Rivas Bejarano, J. J., & Valdecantos, W. C. (2013). Role of interleukin 1 in atopic dermatitis. *Dermatologic Clinics*, 31(3), 437- 444. <https://doi.org/10.1016/j.det.2013.04.008>
- Amarbayasgalan, T., Takahashi, H., Dekio, I., & Morita, E. (2013). Interleukin-8 content in the stratum corneum as an indicator of the severity of inflammation in the lesions of atopic dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 160(1), 63- 74. <https://doi.org/10.1159/000339666>
- Andersen, H. H., Elberling, J., Sølvsten, H., Yosipovitch, G., & Arendt-Nielsen, L. (2017). Nonhistaminergic and mechanical itch sensitization in atopic dermatitis. *Pain*, 158(9), 1780- 1791. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000980>
- Angelova-Fischer, I., Dapic, I., Hoek, A.-K., Jakasa, I., Fischer, T. W., Zillikens, D., & Kezic, S. (2014). Skin barrier integrity and natural moisturising factor levels after cumulative dermal exposure to alkaline agents in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, 94(6), 640- 644. <https://doi.org/10.2340/00015555-1815>
- Ashrafi, M., Baguneid, M., & Bayat, A. (2016). The Role of Neuromediators and Innervation in Cutaneous Wound Healing. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(5), 587- 594. <https://doi.org/10.2340/00015555-2321>
- Bao, L., Zhang, H., & Chan, L. S. (2013). The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAK-STAT*, 2(3), e24137. <https://doi.org/10.4161/jkst.24137>
- Barbarot, S., Auziere, S., Gadkari, A., Girolomoni, G., Puig, L., Simpson, E. L., Margolis, D. J., de Bruin-Weller, M., & Eckert, L. (2018). Epidemiology of atopic dermatitis in adults : Results from an international survey. *Allergy*, 73(6), 1284- 1293. <https://doi.org/10.1111/all.13401>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267- 284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Bataille, A., Leschiera, R., L'Héronnelle, K., Pennec, J.-P., Le Goux, N., Mignen, O., Sakka, M., Plée-Gautier, E., Brun, C., Oddos, T., Carré, J.-L., Misery, L., & Lebonvallet, N. (2020). In Vitro Differentiation of Human Skin-Derived Cells into Functional Sensory Neurons-Like. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9041000>
- Bergeron, L., Busuttill, V., & Botto, J.-M. (2020). Multipotentiality of skin-derived precursors : Application to the regeneration of skin and other tissues. *International Journal of Cosmetic Science*, 42(1), 5- 15. <https://doi.org/10.1111/ics.12587>
- Bernard, M., Carrasco, C., Laoubi, L., Guiraud, B., Rozières, A., Goujon, C., Duplan, H., Bessou-Touya, S., Nicolas, J.-F., Vocanson, M., & Galliano, M.-F. (2017). IL-1 β induces thymic stromal lymphopoietin and an atopic dermatitis-like phenotype in reconstructed healthy human epidermis. *The Journal of Pathology*, 242(2), 234- 245. <https://doi.org/10.1002/path.4887>
- Biernaskie, J., Sparling, J. S., Liu, J., Shannon, C. P., Plemel, J. R., Xie, Y., Miller, F. D., & Tetzlaff, W. (2007). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *The Journal*

of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 27(36), 9545- 9559. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1930-07.2007>

Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., & Vescovi, A. L. (1999). Turning brain into blood : A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5401), 534- 537. <https://doi.org/10.1126/science.283.5401.534>

Bogiatzi, S. I., Fernandez, I., Bichet, J.-C., Marloie-Provost, M.-A., Volpe, E., Sastre, X., & Soumelis, V. (2007). Cutting Edge : Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(6), 3373- 3377.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761- 771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>

Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., & Blau, H. M. (2000). From marrow to brain : Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), 1775- 1779. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1775>

Brunner, P. M., Leung, D. Y. M., & Guttman-Yassky, E. (2018). Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 120(1), 34- 41. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.09.055>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines : Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611- 622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Castex-Rizzi, N., Galliano, M. F., Aries, M. F., Hernandez-Pigeon, H., Vaissiere, C., Delga, H., Caruana, A., Carrasco, C., Lévêque, M., Duplan, H., & Bessou-Touya, S. (2014). In vitro approaches to pharmacological screening in the field of atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, 170 Suppl 1, 12- 18. <https://doi.org/10.1111/bjd.13106>

Cevikbas, F., Wang, X., Akiyama, T., Kempkes, C., Savinko, T., Antal, A., Kukova, G., Buhl, T., Ikoma, A., Buddenkotte, J., Soumelis, V., Feld, M., Alenius, H., Dillon, S. R., Carstens, E., Homey, B., Basbaum, A., & Steinhoff, M. (2014). A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch : Involvement of TRPV1 and TRPA1. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 448- 460. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.048>

Chéret, J., Lebonvallet, N., Buhé, V., Carre, J. L., Misery, L., & Le Gall-Ianotto, C. (2014). Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. *Journal of Dermatological Science*, 74(3), 193- 203. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.02.001>

Chéret, J., Gherardini, J., Soeberdt, M., Hundt, J. E., Abels, C., Bertolini, M., & Paus, R. (2020). Non-neuronal kappa-opioid receptor activation enhances epidermal keratinocyte

- proliferation, and modulates mast cell functions in human skin ex vivo. *The Journal of Dermatology*, 47(8), 917- 921. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15407>
- Chéret, J., Lebonvallet, N., Carré, J.-L., Misery, L., & Le Gall-Ianotto, C. (2013). Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 21(6), 772- 788. <https://doi.org/10.1111/wrr.12101>
- Choi, J. E., & Di Nardo, A. (2018). Skin neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 40(3), 249- 259. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0675-z>
- Chren, M.-M., & Weinstock, M. A. (2004). Conceptual issues in measuring the burden of skin diseases. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 9(2), 97- 100. <https://doi.org/10.1111/j.1087-0024.2004.09119.x>
- Cottrell, G. S., Amadesi, S., Schmidlin, F., & Bunnett, N. (2003). Protease-activated receptor 2: Activation, signalling and function. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 6), 1191- 1197. <https://doi.org/10.1042/bst0311191>
- Dai, R., Hua, W., Xie, H., Chen, W., Xiong, L., & Li, L. (2018). The Human Skin-Derived Precursors for Regenerative Medicine: Current State, Challenges, and Perspectives. *Stem Cells International*, 2018, 8637812. <https://doi.org/10.1155/2018/8637812>
- Dai, X., Sayama, K., Tohyama, M., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Tokumaru, S., Yang, L., Hirakawa, S., & Hashimoto, K. (2011). Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 806-814.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.006>
- Dalgard, F. J., Gieler, U., Tomas-Aragones, L., Lien, L., Poot, F., Jemec, G. B. E., Misery, L., Szabo, C., Linder, D., Sampogna, F., Evers, A. W. M., Halvorsen, J. A., Balieva, F., Szepietowski, J., Romanov, D., Marron, S. E., Altunay, I. K., Finlay, A. Y., Salek, S. S., & Kupfer, J. (2015). The psychological burden of skin diseases: A cross-sectional multicenter study among dermatological out-patients in 13 European countries. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(4), 984- 991. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.530>
- Dang, N. N., Pang, S. G., Song, H. Y., An, L. G., & Ma, X. L. (2015). Filaggrin silencing by shRNA directly impairs the skin barrier function of normal human epidermal keratinocytes and then induces an immune response. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 48(1), 39- 45. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20144047>
- Danso, M. O., Van Drongelen, V., Mulder, A., Van Esch, J., Scott, H., Van Smeden, J., El Ghalbzouri, A., & Bouwstra, J. A. (2014). TNF- α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), 1941- 1950. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.83>
- Dawn, A., Papoiu, A. D. P., Chan, Y. H., Rapp, S. R., Rasette, N., & Yosipovitch, G. (2009). Itch characteristics in atopic dermatitis: Results of a web-based questionnaire. *The British Journal of Dermatology*, 160(3), 642- 644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08941.x>

- De Vuyst, E., Charlier, C., Giltaire, S., De Glas, V., de Rouvroit, C. L., & Poumay, Y. (2014). Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1195, 191- 201. https://doi.org/10.1007/7651_2013_40
- De Vuyst, E., Giltaire, S., Lambert de Rouvroit, C., Malaisse, J., Mound, A., Bourtembourg, M., Nikkels, A. F., Chrétien, A., Salmon, M., & Poumay, Y. (2016). M β CD concurs with IL-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Experimental Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/exd.13113>
- De Vuyst, E., Mound, A., Lambert de Rouvroit, C., & Poumay, Y. (2016). Modelling atopic dermatitis during the morphogenetic process involved in reconstruction of a human epidermis. *Current Research in Translational Medicine*, 64(4), 179- 183. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.005>
- De Vuyst, E., Salmon, M., Evrard, C., Lambert de Rouvroit, C., & Poumay, Y. (2017). Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Frontiers in Medicine*, 4, 119. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00119>
- De Vuyst, E., Giltaire, S., Lambert de Rouvroit, C., Chrétien, A., Salmon, M., & Poumay, Y. (2015). The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. *Archives of Dermatological Research*, 307(4), 309- 318. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1537-3>
- Deckers, I. A. G., McLean, S., Linssen, S., Mommers, M., Van Schayck, C. P., & Sheikh, A. (2012). Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010 : A systematic review of epidemiological studies. *PloS One*, 7(7), e39803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039803>
- Dharmage, S. C., Lowe, A. J., Matheson, M. C., Burgess, J. A., Allen, K. J., & Abramson, M. J. (2014). Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy*, 69(1), 17- 27. <https://doi.org/10.1111/all.12268>
- Di Domenico, E. G., Cavallo, I., Capitanio, B., Ascenzioni, F., Pimpinelli, F., Morrone, A., & Ensoli, F. (2019). Staphylococcus aureus and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090301>
- Dieris-Hirche, J., Gieler, U., Kupfer, J. P., & Milch, W. E. (2009). [Suicidal ideation, anxiety and depression in adult patients with atopic dermatitis]. *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, 60(8), 641- 646. <https://doi.org/10.1007/s00105-009-1744-y>
- Dréno, B. (2009). [Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes]. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, 136 Suppl 6, S247-251. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(09\)72527-X](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(09)72527-X)
- Drucker, A. M., Wang, A. R., Li, W.-Q., Sevetson, E., Block, J. K., & Qureshi, A. A. (2017). The Burden of Atopic Dermatitis : Summary of a Report for the National Eczema Association. *The Journal of Investigative Dermatology*, 137(1), 26- 30. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.012>

- Duplan, H., & Nocera, T. (2018). Hydratation cutanée et produits hydratants. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 145(5), 376- 384. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2018.03.004>
- Eckert, L., Gupta, S., Amand, C., Gadkari, A., Mahajan, P., & Gelfand, J. M. (2017). Impact of atopic dermatitis on health-related quality of life and productivity in adults in the United States : An analysis using the National Health and Wellness Survey. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(2), 274-279.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.04.019>
- Eckl, K.-M., Alef, T., Torres, S., & Hennies, H. C. (2011). Full-thickness human skin models for congenital ichthyosis and related keratinization disorders. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(9), 1938- 1942. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.126>
- Elenkov & Chrousos. (1999). Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 10(9), 359- 368.
- Elias, P. M. (2012). Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(9), 2131- 2133. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.246>
- Eller, E., Kjaer, H. F., Høst, A., Andersen, K. E., & Bindslev-Jensen, C. (2009). Food allergy and food sensitization in early childhood : Results from the DARC cohort. *Allergy*, 64(7), 1023- 1029. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.01952.x>
- Engelhart, K., El Hindi, T., Biesalski, H.-K., & Pfitzner, I. (2005). In vitro reproduction of clinical hallmarks of eczematous dermatitis in organotypic skin models. *Archives of Dermatological Research*, 297(1), 1- 9. <https://doi.org/10.1007/s00403-005-0575-7>
- Ernandez, T., & Stoermann-Chopard, C. (2012). [Vitamin D and chronic kidney disease : Increasing role for an old vitamin]. *Revue Medicale Suisse*, 8(361), 2140- 2145.
- Ewald, D. A., Noda, S., Oliva, M., Litman, T., Nakajima, S., Li, X., Xu, H., Workman, C. T., Scheipers, P., Svitacheva, N., Labuda, T., Krueger, J. G., Suárez-Fariñas, M., Kabashima, K., & Guttman-Yassky, E. (2017). Major differences between human atopic dermatitis and murine models, as determined by using global transcriptomic profiling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(2), 562- 571. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.029>
- Eyerich, K., Brown, S. J., Perez White, B. E., Tanaka, R. J., Bissonette, R., Dhar, S., Bieber, T., Hijnen, D. J., Guttman-Yassky, E., Irvine, A., Thyssen, J. P., Vestergaard, C., Werfel, T., Wollenberg, A., Paller, A. S., & Reynolds, N. J. (2019). Human and computational models of atopic dermatitis : A review and perspectives by an expert panel of the International Eczema Council. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(1), 36- 45. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.033>
- Fernandes, K. J. L., Kobayashi, N. R., Gallagher, C. J., Barnabé-Heider, F., Aumont, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2006). Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Experimental Neurology*, 201(1), 32- 48. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.03.018>

- Fernandes, K. J. L., McKenzie, I. A., Mill, P., Smith, K. M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N. R., Toma, J. G., Kaplan, D. R., Labosky, P. A., Rafuse, V., Hui, C.-C., & Miller, F. D. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology*, *6*(11), 1082- 1093. <https://doi.org/10.1038/ncb1181>
- Fitoussi, J., Virassamynaïk, S., Callejon, S., Weber, S., Collet, E., Scalia, J., Chavagnac-Bonneville, M., Trompezinski, S., & Sayag, M. (2020). Inhibition of thymic stromal lymphopoietin production to improve pruritus and quality of life in infants and children with atopic dermatitis. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *19*(8), 2061- 2069. <https://doi.org/10.1111/jocd.13515>
- Flynn, C. M., Garbers, Y., Lokau, J., Wesch, D., Schulte, D. M., Laudes, M., Lieb, W., Aparicio-Siegmund, S., & Garbers, C. (2019). Activation of Toll-like Receptor 2 (TLR2) induces Interleukin-6 trans-signaling. *Scientific Reports*, *9*(1), 7306. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43617-5>
- Frankart, A., Malaise, J., De Vuyst, E., Minner, F., de Rouvroit, C. L., & Poumay, Y. (2012). Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Experimental Dermatology*, *21*(11), 871- 875. <https://doi.org/10.1111/exd.12020>
- Geoghegan, J. A., Irvine, A. D., & Foster, T. J. (2018). Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis : A Complex and Evolving Relationship. *Trends in Microbiology*, *26*(6), 484- 497. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008>
- Giustizieri, M. L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pità, O., Chinni, L. M., Giannetti, A., Girolomoni, G., & Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *107*(5), 871- 877. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114707>
- Gouin, O., Lebonvallet, N., L'Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.-L., Lefeuvre, L., & Misery, L. (2015). Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. *Experimental Dermatology*, *24*(10), 723- 726. <https://doi.org/10.1111/exd.12798>
- Gouin, O., L'Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.-L., Lefeuvre, L., Misery, L., & Le Garrec, R. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation : Pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein & Cell*, *8*(9), 644- 661. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>
- Gowda, S., Goldblum, O. M., McCall, W. V., & Feldman, S. R. (2010). Factors affecting sleep quality in patients with psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *63*(1), 114- 123. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.07.003>
- Guo, Z., Tong, C., Doucet, Y., Abaci, H., Jackow, J., Zeng, W., Hansen, C., Lumpkin, E., & Christiano, A. (2018). 1446 Atopic cytokines IL4/13 perturb iPSC-derived itch-specific sensory neurons. *Journal of Investigative Dermatology*, *138*(5), S245.
- Hanifin, J. M., & Rajka, G. (1980). Diagnostic criteria of dermatitis. *Acta Derm Venereol.*

- Heratizadeh, A., & Werfel, T. (2016). Anti-inflammatory therapies in atopic dermatitis. *Allergy*, *71*(12), 1666- 1675. <https://doi.org/10.1111/all.13065>
- Hidaka, T., Ogawa, E., Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Fujimura, T., Aiba, S., Nakayama, K., Okuyama, R., & Yamamoto, M. (2017). The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nature Immunology*, *18*(1), 64- 73. <https://doi.org/10.1038/ni.3614>
- Hönzke, S., Wallmeyer, L., Ostrowski, A., Radbruch, M., Mundhenk, L., Schäfer-Korting, M., & Hedtrich, S. (2016). Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and β -Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. *The Journal of Investigative Dermatology*, *136*(3), 631- 639. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.007>
- Huet, F., Gouin, O., & Misery, L. (2020). [New treatments and therapeutic perspectives in atopic dermatitis]. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, *147*(6- 7), 466- 474. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2020.01.020>
- Huet, F., Severino-Freire, M., Chéret, J., Gouin, O., Praneuf, J., Pierre, O., Misery, L., & Le Gall-Ianotto, C. (2018). Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *Journal of Dermatological Science*, *89*(3), 213- 218. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.015>
- Huet, F., Faffa, M.-S., Poizeau, F., Merhand, S., Misery, L., & Brenaut, E. (2019). Characteristics of Pruritus in Relation to Self-assessed Severity of Atopic Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, *99*(3), 279- 283. <https://doi.org/10.2340/00015555-3053>
- Huet, F., Shourick, J., Séité, S., Taïeb, C., & Misery, L. (2020). Pain in Atopic Dermatitis : An Online Population-based Survey. *Acta Dermato-Venereologica*, *100*(14), adv00198. <https://doi.org/10.2340/00015555-3521>
- Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G., & Schmelz, M. (2006). The neurobiology of itch. *Nature Reviews. Neuroscience*, *7*(7), 535- 547. <https://doi.org/10.1038/nrn1950>
- Jakasa, I., Koster, E. S., Calkoen, F., McLean, W. H. I., Campbell, L. E., Bos, J. D., Verberk, M. M., & Kezic, S. (2011). Skin barrier function in healthy subjects and patients with atopic dermatitis in relation to filaggrin loss-of-function mutations. *The Journal of Investigative Dermatology*, *131*(2), 540- 542. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.307>
- Janssens, M., Van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A. P., & Bouwstra, J. A. (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research*, *53*(12), 2755- 2766. <https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>
- Jeon, C., Yan, D., Nakamura, M., Sekhon, S., Bhutani, T., Berger, T., & Liao, W. (2017). Frequency and Management of Sleep Disturbance in Adults with Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *Dermatology and Therapy*, *7*(3), 349- 364. <https://doi.org/10.1007/s13555-017-0192-3>
- Jiao, D., Wong, C.-K., Qiu, H.-N., Dong, J., Cai, Z., Chu, M., Hon, K.-L., Tsang, M. S.-M., & Lam, C. W.-K. (2016). NOD2 and TLR2 ligands trigger the activation of basophils and

- eosinophils by interacting with dermal fibroblasts in atopic dermatitis-like skin inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(4), 535- 550. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.77>
- Jin, H., He, R., Oyoshi, M., & Geha, R. S. (2009). Animal models of atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(1), 31- 40. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.106>
- Kaaz, K., Szepietowski, J. C., & Matusiak, Ł. (2019). Influence of Itch and Pain on Sleep Quality in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica*, 99(2), 175- 180. <https://doi.org/10.2340/00015555-3065>
- Kabashima, K., Furue, M., Hanifin, J. M., Pulka, G., Wollenberg, A., Galus, R., Etoh, T., Mihara, R., Nakano, M., & Ruzicka, T. (2018). Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis : Randomized, phase II, long-term extension study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(4), 1121-1130.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.03.018>
- Kamsteeg, M., Bergers, M., de Boer, R., Zeeuwen, P. L. J. M., Hato, S. V., Schalkwijk, J., & Tjabringa, G. S. (2011). Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. *The American Journal of Pathology*, 178(5), 2091- 2099. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.037>
- Kawakami, T., & Soma, Y. (2011). Questionnaire survey of the efficacy of emollients for adult patients with atopic dermatitis. *The Journal of Dermatology*, 38(6), 531- 535. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.01052.x>
- Kechichian, E., & Ezzedine, K. (2018). Vitamin D and the Skin: An Update for Dermatologists. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(2), 223- 235. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0323-8>
- Kezic, S., O'Regan, G. M., Lutter, R., Jakasa, I., Koster, E. S., Saunders, S., Caspers, P., Kemperman, P. M. J. H., Puppels, G. J., Sandilands, A., Chen, H., Campbell, L. E., Kroboth, K., Watson, R., Fallon, P. G., McLean, W. H. I., & Irvine, A. D. (2012). Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 1031-1039.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.989>
- Kim, B. E., & Leung, D. Y. (2012). Epidermal barrier in atopic dermatitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 4(1), 12- 16. <https://doi.org/10.4168/air.2012.4.1.12>
- Kim, H. O., Kim, J. H., Chung, B. Y., Choi, M. G., & Park, C. W. (2014). Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology*, 23(4), 278- 281. <https://doi.org/10.1111/exd.12350>
- Kim, J., Kim, B. E., Ahn, K., & Leung, D. Y. M. (2019). Interactions Between Atopic Dermatitis and Staphylococcus aureus Infection : Clinical Implications. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 11(5), 593- 603. <https://doi.org/10.4168/air.2019.11.5.593>
- Kimata, H., & Lindley, I. (1994). Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis. *Archives of Disease in Childhood*, 70(2), 119- 122. <https://doi.org/10.1136/adc.70.2.119>

- Kinoshita, H., Takai, T., Le, T. A., Kamijo, S., Wang, X. L., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Vu, A. T., Ogawa, T., Gunawan, H., Ikeda, S., Okumura, K., & Ogawa, H. (2009). Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *123*(1), 179- 186. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.008>
- Köllisch, G., Kalali, B. N., Voelcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J., Bauer, S., Jakob, T., Mempel, M., & Ollert, M. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, *114*(4), 531- 541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02122.x>
- Kopyciok, M. E. R., Ständer, H. F., Osada, N., Steinke, S., & Ständer, S. (2016). Prevalence and Characteristics of Pruritus: A One-Week Cross-sectional Study in a German Dermatology Practice. *Acta Dermato-Venereologica*, *96*(1), 50- 55. <https://doi.org/10.2340/00015555-2166>
- Krause, K., Metz, M., Makris, M., Zuberbier, T., & Maurer, M. (2012). The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *12*(5), 477- 484. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3283574d0c>
- Küchler, S., Henkes, D., Eckl, K.-M., Ackermann, K., Plendl, J., Korting, H.-C., Hennies, H.-C., & Schäfer-Korting, M. (2011). Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, *39*(5), 471- 480.
- Kuo, I.-H., Carpenter-Mendini, A., Yoshida, T., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Barnes, K. C., Gallo, R. L., Borkowski, A. W., Yamasaki, K., Leung, D. Y., Georas, S. N., De Benedetto, A., & Beck, L. A. (2013). Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: Implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(4), 988- 998. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.437>
- Le Douarin, N. M., & Dupin, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Current Opinion in Genetics & Development*, *13*(5), 529- 536. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.002>
- Le, T. A., Takai, T., Vu, A. T., Kinoshita, H., Chen, X., Ikeda, S., Ogawa, H., & Okumura, K. (2011). Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via toll-like receptor 5. *International Archives of Allergy and Immunology*, *155*(1), 31- 37. <https://doi.org/10.1159/000318679>
- Lebonvallet, N., Boulais, N., Le Gall, C., Chéret, J., Pereira, U., Mignen, O., Bardey, V., Jeanmaire, C., Danoux, L., Pauly, G., & Misery, L. (2012). Characterization of neurons from adult human skin-derived precursors in serum-free medium: A PCR array and immunocytological analysis. *Experimental Dermatology*, *21*(3), 195- 200. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01422.x>
- Lebonvallet, N., Boulais, N., Le Gall, C., Pereira, U., Gauché, D., Gobin, E., Pers, J.-O., Jeanmaire, C., Danoux, L., Pauly, G., & Misery, L. (2012). Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. *Experimental Dermatology*, *21*(2), 156- 158. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01421.x>

- Lebre, M. C., Van der Aar, A. M. G., Van Baarsen, L., Van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg, M. L., & de Jong, E. C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *The Journal of Investigative Dermatology*, *127*(2), 331- 341. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>
- Lee, S. E., Jeong, S. K., & Lee, S. H. (2010). Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Yonsei Medical Journal*, *51*(6), 808- 822. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.6.808>
- Lee, S. E., & Lee, S. H. (2018). Skin Barrier and Calcium. *Annals of Dermatology*, *30*(3), 265- 275. <https://doi.org/10.5021/ad.2018.30.3.265>
- Löwa, A., Jevtić, M., Gorreja, F., & Hedtrich, S. (2018). Alternatives to animal testing in basic and preclinical research of atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, *27*(5), 476- 483. <https://doi.org/10.1111/exd.13498>
- Lowe, A. J., Leung, D. Y. M., Tang, M. L. K., Su, J. C., & Allen, K. J. (2018). The skin as a target for prevention of the atopic march. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, *120*(2), 145- 151. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.11.023>
- Lu, J., Wu, K., Zeng, Q., Xiang, Y., Gao, L., & Huang, J. (2018). Serum interleukin-31 level and pruritus in atopic dermatitis : A Meta-analysis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences*, *43*(2), 124- 130. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.003>
- Mansouri, Y., & Guttman-Yassky, E. (2015). Immune Pathways in Atopic Dermatitis, and Definition of Biomarkers through Broad and Targeted Therapeutics. *Journal of Clinical Medicine*, *4*(5), 858- 873. <https://doi.org/10.3390/jcm4050858>
- Marciniak, J., Reich, A., & Szepietowski, J. C. (2017). Quality of Life of Parents of Children with Atopic Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, *97*(6), 711- 714. <https://doi.org/10.2340/00015555-2633>
- Marionnet, C., Pierrard, C., Vioux-Chagnoleau, C., Sok, J., Asselineau, D., & Bernerd, F. (2006). Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*(5), 971- 979. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700230>
- Marsella, R., & De Benedetto, A. (2017). Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. *Veterinary Sciences*, *4*(3). <https://doi.org/10.3390/vetsci4030037>
- Marsella, R., & Girolomoni, G. (2009). Canine models of atopic dermatitis : A useful tool with untapped potential. *The Journal of Investigative Dermatology*, *129*(10), 2351- 2357. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.98>
- Marsella, R., & Olivry, T. (2003). Animal models of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*, *21*(2), 122- 133. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(02\)00369-3](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(02)00369-3)
- Marshall, I., Owen, D., Cripps, T., Davis, J., McNutly, S., & Smart, D. (2003). *Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-*

- sensitive stores*. *British Journal of Pharmacology*; *Br J Pharmacol*.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705003>
- McGlone, F., & Reilly, D. (2010). The cutaneous sensory system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *34*(2), 148- 159. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.08.004>
- Meyer, S., Temme, C., & Wahle, E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes : Pathways and enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(4), 197- 216. <https://doi.org/10.1080/10409230490513991>
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., & McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5497), 1779- 1782. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1779>
- Mildner, M., Jin, J., Eckhart, L., Kezic, S., Gruber, F., Barresi, C., Stremnitzer, C., Buchberger, M., Mlitz, V., Ballaun, C., Sterniczky, B., Födinger, D., & Tschachler, E. (2010). Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *The Journal of Investigative Dermatology*, *130*(9), 2286- 2294. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.115>
- Misery, L. (1997). Skin, immunity and the nervous system. *The British Journal of Dermatology*, *137*(6), 843- 850.
- Misery, L., Seneschal, J., Reguiat, Z., Merhand, S., Héas, S., Huet, F., Taieb, C., & Ezzedine, K. (2019). The impact of atopic dermatitis on sexual health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, *33*(2), 428- 432. <https://doi.org/10.1111/jdv.15223>
- Misery, L. (2011). Atopic dermatitis and the nervous system. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *41*(3), 259- 266. <https://doi.org/10.1007/s12016-010-8225-z>
- Misery, L., Huet, F., Gouin, O., Ständer, S., & Deleuran, M. (2019). Current pharmaceutical developments in atopic dermatitis. *Current Opinion in Pharmacology*, *46*, 7- 13. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.12.003>
- Misery, L., Seneschal, J., Reguiat, Z., Merhand, S., Héas, S., Huet, F., Taïeb, C., & Ezzedine, K. (2018). Patient Burden is Associated with Alterations in Quality of Life in Adult Patients with Atopic Dermatitis : Results from the ECLA Study. *Acta Dermato-Venereologica*, *98*(7), 713- 714. <https://doi.org/10.2340/00015555-2940>
- Misery, L., & Ständer, S. (Éds.). (2016). *Pruritus* (2^e éd.). Springer International Publishing. <https://www.springer.com/us/book/9783319331409>
- Mochizuki, H., Schut, C., Nattkemper, L. A., & Yosipovitch, G. (2017). Brain mechanism of itch in atopic dermatitis and its possible alteration through non-invasive treatments. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, *66*(1), 14- 21. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.08.013>
- Mollanazar, N. K., Smith, P. K., & Yosipovitch, G. (2015). Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis : Getting the Itch Out? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8488-5>

- Muller, Q., Beaudet, M.-J., De Serres-Bérard, T., Bellenfant, S., Flacher, V., & Berthod, F. (2018). Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and Schwann cells differentiated from iPS cells. *Acta Biomaterialia*, 82, 93- 101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.011>
- Murota, H., & Katayama, I. (2017). Exacerbating factors of itch in atopic dermatitis. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 66(1), 8- 13. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.10.005>
- Nakagawa, H., Nemoto, O., Igarashi, A., & Nagata, T. (2018). Efficacy and safety of topical JTE-052, a Janus kinase inhibitor, in Japanese adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis : A phase II, multicentre, randomized, vehicle-controlled clinical study. *The British Journal of Dermatology*, 178(2), 424- 432. <https://doi.org/10.1111/bjd.16014>
- Nattkemper, L. A., Tey, H. L., Valdes-Rodriguez, R., Lee, H., Mollanazar, N. K., Albornoz, C., Sanders, K. M., & Yosipovitch, G. (2018). The genetics of chronic itch : Gene expression in the skin of atopic dermatitis and psoriasis patients with severe itch. *The Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.12.029>
- Niebuhr, M., Langnickel, J., Sigel, S., & Werfel, T. (2010). Dysregulation of CD36 upon TLR-2 stimulation in monocytes from patients with atopic dermatitis and the TLR2 R753Q polymorphism. *Experimental Dermatology*, 19(8), e296-298. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00989.x>
- Nomura, I., Katsunuma, T., Matsumoto, K., Iida, M., Tomita, H., Tomikawa, M., Kawahara, H., Akasawa, A., Pawankar, R., & Saito, H. (2001). Human mast cell progenitors in peripheral blood from atopic subjects with high IgE levels. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 31(9), 1424- 1431. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01181.x>
- Noske, K. (2018). Secreted immunoregulatory proteins in the skin. *Journal of Dermatological Science*, 89(1), 3- 10. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.10.008>
- Nutan, F. N. U., Kanwar, A. J., & Parsad, D. (2012). The effect of topically applied corticosteroids on interleukin 1 β levels in patients with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 26(8), 1020- 1022. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04133.x>
- Olschläger, V., Schrader, A., & Hockertz, S. (2009). Comparison of primary human fibroblasts and keratinocytes with immortalized cell lines regarding their sensitivity to sodium dodecyl sulfate in a neutral red uptake cytotoxicity assay. *Arzneimittel-Forschung*, 59(3), 146- 152. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296378>
- Omori-Miyake, M., Yamashita, M., Tsunemi, Y., Kawashima, M., & Yagi, J. (2014). In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(5), 1342- 1350. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.503>
- Otsuka, A., Tanioka, M., Nakagawa, Y., Honda, T., Ikoma, A., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2011). Effects of cyclosporine on pruritus and serum IL-31 levels in patients with atopic

dermatitis. *European Journal of Dermatology: EJD*, 21(5), 816- 817. <https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1470>

Oyoshi, M. K., Larson, R. P., Ziegler, S. F., & Geha, R. S. (2010). Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(5), 976- 984, 984.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.041>

Pacor, M. L., Di Lorenzo, G., Martinelli, N., Mansueto, P., Rini, G. B., & Corrocher, R. (2004). Comparing tacrolimus ointment and oral cyclosporine in adult patients affected by atopic dermatitis: A randomized study. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(4), 639- 645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1907.x>

Paller, A. S., Tom, W. L., Lebwohl, M. G., Blumenthal, R. L., Boguniewicz, M., Call, R. S., Eichenfield, L. F., Forsha, D. W., Rees, W. C., Simpson, E. L., Spellman, M. C., Stein Gold, L. F., Zaenglein, A. L., Hughes, M. H., Zane, L. T., & Hebert, A. A. (2016). Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 75(3), 494-503.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.05.046>

Palmer, C. N. A., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J. D., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., ... McLean, W. H. I. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, 38(4), 441- 446. <https://doi.org/10.1038/ng1767>

Peppers, J., Paller, A. S., Maeda-Chubachi, T., Wu, S., Robbins, K., Gallagher, K., & Kraus, J. E. (2019). A phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(1), 89-98.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.06.047>

Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S. H., Chan, G., & O'Shea, J. J. (2008). Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunological Reviews*, 223, 132- 142. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00644.x>

Plotczyk, M., & Higgins, C. (2019). *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02147-X>

Potenzieri, C., & Udem, B. J. (2012). Basic mechanisms of itch. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 42(1), 8- 19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03791.x>

Potten, C. S. (1974). The epidermal proliferative unit: The possible role of the central basal cell. *Cell and Tissue Kinetics*, 7(1), 77- 88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1974.tb00401.x>

Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclercq-Smekens, M., Hérin, M., & Coquette, A. (2004). A simple reconstructed human epidermis: Preparation of the culture model and

- utilization in in vitro studies. *Archives of Dermatological Research*, 296(5), 203- 211. <https://doi.org/10.1007/s00403-004-0507-y>
- Proksch, E. (2018). PH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*, 45(9), 1044- 1052. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>
- Renne, J., Schäfer, V., Werfel, T., & Wittmann, M. (2010). Interleukin-1 from epithelial cells fosters T cell-dependent skin inflammation. *The British Journal of Dermatology*, 162(6), 1198- 1205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09662.x>
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), 1707- 1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Reynolds, N. J., Franklin, V., Gray, J. C., Diffey, B. L., & Farr, P. M. (2001). Narrow-band ultraviolet B and broad-band ultraviolet A phototherapy in adult atopic eczema: A randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 357(9273), 2012- 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)05114-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)05114-X)
- Richard, M.-A., Corgibet, F., Beylot-Barry, M., Barbaud, A., Bodemer, C., Chaussade, V., D'Incan, M., Joly, P., Leccia, M. T., Meurant, J. M., Petit, A., Geffroy, B. R., Sei, J. F., Taieb, C., Misery, L., & Ezzedine, K. (2018). Sex- and age-adjusted prevalence estimates of five chronic inflammatory skin diseases in France: Results of the «OBJECTIFS PEAU» study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 32(11), 1967- 1971. <https://doi.org/10.1111/jdv.14959>
- Ringkamp, M., & Meyer, R. (2014). Pruriceptors. In E. Carstens & T. Akiyama (Éds.), *Itch: Mechanisms and Treatment*. CRC Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200917/>
- Ringkamp, M., Schepers, R. J., Shimada, S. G., Johaneck, L. M., Hartke, T. V., Borzan, J., Shim, B., LaMotte, R. H., & Meyer, R. A. (2011). A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(42), 14841- 14849. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3005-11.2011>
- Roduit, C., Frei, R., Depner, M., Karvonen, A. M., Renz, H., Braun-Fahrländer, C., Schmausser-Hechfellner, E., Pekkanen, J., Riedler, J., Dalphin, J.-C., von Mutius, E., Lauener, R. P., the PASTURE study group, Hyvärinen, A., Kirjavainen, P., Remes, S., Roponen, M., Dalphin, M.-L., Kaulek, V., ... Doekes, G. (2017). Phenotypes of Atopic Dermatitis Depending on the Timing of Onset and Progression in Childhood. *JAMA Pediatrics*, 171(7), 655- 662. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0556>
- Roggenkamp, D., Köpnick, S., Stäb, F., Wenck, H., Schmelz, M., & Neufang, G. (2013). Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), 1620- 1628. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.464>
- Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S. W., Bunnett, N. W., & Steinhoff, M. (2006). Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiological Reviews*, 86(4), 1309- 1379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2005>
- Rouaud-Tinguely, P., Boudier, D., Marchand, L., Barruche, V., Bordes, S., Coppin, H., Roth, M. P., & Closs, B. (2015). From the morphological to the transcriptomic characterization of a

- compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, 173(4), 1006- 1014. <https://doi.org/10.1111/bjd.14012>
- Salzes, C., Abadie, S., Seneschal, J., Whitton, M., Meurant, J.-M., Jouary, T., Ballanger, F., Boralevi, F., Taieb, A., Taieb, C., & Ezzedine, K. (2016). The Vitiligo Impact Patient Scale (VIPs) : Development and Validation of a Vitiligo Burden Assessment Tool. *The Journal of Investigative Dermatology*, 136(1), 52- 58. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.398>
- Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H. O., & Torebjörk, H. E. (1997). Specific C-receptors for itch in human skin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(20), 8003- 8008.
- Schofield, R. (1983). The stem cell system. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 37(8), 375- 380.
- Schram, M. E., Roekevisch, E., Leeftang, M. M. G., Bos, J. D., Schmitt, J., & Spuls, P. I. (2011). A randomized trial of methotrexate versus azathioprine for severe atopic eczema. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(2), 353- 359. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.024>
- Schultz Larsen, F. (1993). Atopic dermatitis : A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 28(5 Pt 1), 719- 723. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(93\)70099-f](https://doi.org/10.1016/0190-9622(93)70099-f)
- Schürer, N., Köhne, A., Schliep, V., Barlag, K., & Goerz, G. (1993). Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 2(4), 179- 185. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1993.tb00030.x>
- Shreberk-Hassidim, R., Ramot, Y., & Zlotogorski, A. (2017). Janus kinase inhibitors in dermatology : A systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(4), 745-753.e19. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.12.004>
- Sieber-Blum, M., & Grim, M. (2004). The adult hair follicle : Cradle for pluripotent neural crest stem cells. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 72(2), 162- 172. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20008>
- Simpson, E. L., Lacour, J.-P., Spelman, L., Galimberti, R., Eichenfield, L. F., Bissonnette, R., King, B. A., Thyssen, J. P., Silverberg, J. I., Bieber, T., Kabashima, K., Tsunemi, Y., Costanzo, A., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Janes, J. M., DeLozier, A. M., Gamalo, M., Brinker, D. R., ... Reich, K. (2020). Baricitinib in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis and inadequate response to topical corticosteroids : Results from two randomized monotherapy phase III trials. *The British Journal of Dermatology*, 183(2), 242- 255. <https://doi.org/10.1111/bjd.18898>
- Simpson, EL., Akinlade, B., & Ardeleanu, M. (2017). Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, 376(11), 1090- 1091. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1700366>
- Simpson, E L., Imafuku, S., Poulin, Y., Ungar, B., Zhou, L., Malik, K., Wen, H.-C., Xu, H., Estrada, Y. D., Peng, X., Chen, M., Shah, N., Suarez-Farinas, M., Pavel, A. B., Nograles, K., & Guttman-Yassky, E. (2019). A Phase 2 Randomized Trial of Apremilast in Patients with

Atopic Dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 139(5), 1063- 1072. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.043>

Simpson, EL., Parnes, J. R., She, D., Crouch, S., Rees, W., Mo, M., & Van der Merwe, R. (2019). Tezepelumab, an anti-thymic stromal lymphopoietin monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis : A randomized phase 2a clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(4), 1013- 1021. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.11.059>

Skabytska, Y., Kaesler, S., Volz, T., & Biedermann, T. (2016). The role of innate immune signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis and consequences for treatments. *Seminars in Immunopathology*, 38(1), 29- 43. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0544-y>

Son, E. D., Kim, H.-J., Park, T., Shin, K., Bae, I.-H., Lim, K.-M., Cho, E.-G., & Lee, T. R. (2014). Staphylococcus aureus inhibits terminal differentiation of normal human keratinocytes by stimulating interleukin-6 secretion. *Journal of Dermatological Science*, 74(1), 64- 71. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.12.004>

Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A. I., Pivarsci, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M.-C., Meller, S., Rieker, J., Steinhoff, M., Hoffmann, T. K., Ruzicka, T., Zlotnik, A., & Homey, B. (2006). IL-31 : A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2), 411- 417. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.10.033>

Soter, N. A. (1989). Morphology of atopic eczema. *Allergy*, 44 Suppl 9, 16- 19.

Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt Rd, R., Bazan, F., Kastelein, R. A., & Liu, Y.-J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), 673- 680. <https://doi.org/10.1038/ni805>

Ständer, S., Schürmeyer-Horst, F., Luger, T. A., & Weisshaar, E. (2006). Treatment of pruritic diseases with topical calcineurin inhibitors. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2(2), 213- 218.

Ständer, S., Weisshaar, E., Mettang, T., Szepietowski, J. C., Carstens, E., Ikoma, A., Bergasa, N. V., Gieler, U., Misery, L., Wallengren, J., Darsow, U., Streit, M., Metze, D., Luger, T. A., Greaves, M. W., Schmelz, M., Yosipovitch, G., & Bernhard, J. D. (2007). Clinical classification of itch : A position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Dermato-Venereologica*, 87(4), 291- 294. <https://doi.org/10.2340/00015555-0305>

Su, K.-P., Lai, H.-C., Peng, C.-Y., Su, W.-P., Chang, J. P.-C., & Pariante, C. M. (2019). Interferon-alpha-induced depression : Comparisons between early- and late-onset subgroups and with patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80, 512- 518. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.032>

Suárez-Fariñas, M., Tintle, S. J., Shemer, A., Chiricozzi, A., Nogales, K., Cardinale, I., Duan, S., Bowcock, A. M., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2011). Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune

- abnormalities. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(4), 954-964.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1124>
- Sugiura, H., Omoto, M., Hirota, Y., Danno, K., & Uehara, M. (1997). Density and fine structure of peripheral nerves in various skin lesions of atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*, 289(3), 125- 131.
- Sumikawa, Y., Asada, H., Hoshino, K., Azukizawa, H., Katayama, I., Akira, S., & Itami, S. (2006). Induction of beta-defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. *Microbes and Infection*, 8(6), 1513- 1521. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.008>
- Suri, B. K., Verma, N. K., & Schmidtchen, A. (2018). Toll-like Receptor 3 Agonist, Polyinosinic-polycytidylic Acid, Upregulates Carbonic Anhydrase II in Human Keratinocytes. *Acta Dermato-Venereologica*, 98(8), 762- 765. <https://doi.org/10.2340/00015555-2963>
- Taïeb, A. (1999). Hypothesis: From epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. *Contact Dermatitis*, 41(4), 177- 180. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1999.tb06125.x>
- Takai, T., Chen, X., Xie, Y., Vu, A. T., Le, T. A., Kinoshita, H., Kawasaki, J., Kamijo, S., Hara, M., Ushio, H., Baba, T., Hiramatsu, K., Ikeda, S., Ogawa, H., & Okumura, K. (2014). TSLP expression induced via Toll-like receptor pathways in human keratinocytes. *Methods in Enzymology*, 535, 371- 387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397925-4.00021-3>
- Tan, Y., Ng, W. J., Lee, S. Z. X., Lee, B. T. K., Nattkemper, L. A., Yosipovitch, G., Ng, L. G., & Tey, H. L. (2018). 3-Dimensional Optical Clearing and Imaging of Pruritic Atopic Dermatitis and Psoriasis Skin Reveals Downregulation of Epidermal Innervation. *The Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.006>
- Tatsuno, K., Fujiyama, T., Yamaguchi, H., Waki, M., & Tokura, Y. (2015). TSLP Directly Interacts with Skin-Homing Th2 Cells Highly Expressing its Receptor to Enhance IL-4 Production in Atopic Dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(12), 3017- 3024. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.318>
- Tauber, M., Apoil, P. A., Richet, C., Laurent, J., De Bonnecaze, G., Mouchon, E., Cassagne, M., Marguery, M. C., Hegazy, S., Konstantinou, M. P., Severino, M., Uthurriague, C., Giordano-Labadie, F., Didier, A., & Paul, C. (2019). Effect of dupilumab on atopic manifestations in patients treated for atopic dermatitis in real life practice. *The British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/bjd.17629>
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 3(9), 778- 784. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-778>
- Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D., & Miller, F. D. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(6), 727- 737. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0134>
- Tominaga, M., Ozawa, S., Ogawa, H., & Takamori, K. (2007). A hypothetical mechanism of intraepidermal neurite formation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 46(3), 199- 210. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.02.002>

- Tominaga, M., & Takamori, K. (2014). Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: Therapeutic implications. *The Journal of Dermatology*, 41(3), 205- 212. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12317>
- Urashima, R., & Mihara, M. (1998). Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 432(4), 363- 370.
- Van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S., & Bouwstra, J. A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1841(3), 295- 313. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.11.006>
- Van Smeden, J., & Bouwstra, J. A. (2016). Stratum Corneum Lipids : Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current Problems in Dermatology*, 49, 8- 26. <https://doi.org/10.1159/000441540>
- Vu, Anh T., Chen, X., Xie, Y., Kamijo, S., Ushio, H., Kawasaki, J., Hara, M., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H., & Takai, T. (2011). Extracellular double-stranded RNA induces TSLP via an endosomal acidification- and NF- κ B-dependent pathway in human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(11), 2205- 2212. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.185>
- Vu, Anh T, Baba, T., Chen, X., Le, T. A., Kinoshita, H., Xie, Y., Kamijo, S., Hiramatsu, K., Ikeda, S., Ogawa, H., Okumura, K., & Takai, T. (2010). Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(5), 985- 993, 993.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.002>
- Watson, J. (2017). [Atopic dermatitis physiopathology]. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, 144 Suppl 5, VS8- VS14. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(18\)30086-3](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(18)30086-3)
- Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K., & Irvine, A. D. (2018). Atopic dermatitis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0001-z>
- Weidinger, S., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*, 387(10023), 1109- 1122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X)
- Weidinger, S., Rodríguez, E., Stahl, C., Wagenpfeil, S., Klopp, N., Illig, T., & Novak, N. (2007). Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 724- 726. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700630>
- Wen, H.-J., Chen, P.-C., Chiang, T.-L., Lin, S.-J., Chuang, Y.-L., & Guo, Y.-L. (2009). Predicting risk for early infantile atopic dermatitis by hereditary and environmental factors. *The British Journal of Dermatology*, 161(5), 1166- 1172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09412.x>
- Werner, S., Krieg, T., & Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 998- 1008. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700786>

- Williams, H. C., Burney, P. G., Hay, R. J., Archer, C. B., Shipley, M. J., Hunter, J. J., Bingham, E. A., Finlay, A. Y., Pembroke, A. C., & Graham-Brown, R. A. (1994). The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, *131*(3), 383- 396.
- Wilson, S. R., Gerhold, K. A., Bifolck-Fisher, A., Liu, Q., Patel, K. N., Dong, X., & Bautista, D. M. (2011). TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nature Neuroscience*, *14*(5), 595- 602. <https://doi.org/10.1038/nn.2789>
- Wilson, S. R., Thé, L., Batia, L. M., Beattie, K., Katibah, G. E., McClain, S. P., Pellegrino, M., Estandian, D. M., & Bautista, D. M. (2013). The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*, *155*(2), 285- 295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.057>
- Wollenberg, A., Barbarot, S., Bieber, T., Christen-Zaech, S., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gieler, U., Girolomoni, G., Lau, S., Muraro, A., Czarnecka-Operacz, M., Schäfer, T., Schmid-Grendelmeier, P., Simon, D., Szalai, Z., Szepietowski, J. C., Taïeb, A., Torrelo, A., Werfel, T., ... European Dermatology Forum (EDF), the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), the European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD), European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Associations (EFA), the European Society for Dermatology and Psychiatry (ESDaP), the European Society of Pediatric Dermatology (ESPD), Global Allergy and Asthma European Network (GA2LEN) and the European Union of Medical Specialists (UEMS). (2018). Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children : Part I. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, *32*(5), 657- 682. <https://doi.org/10.1111/jdv.14891>
- Wong, C. E., Paratore, C., Dours-Zimmermann, M. T., Rochat, A., Pietri, T., Suter, U., Zimmermann, D. R., Dufour, S., Thiery, J. P., Meijer, D., Beermann, F., Barrandon, Y., & Sommer, L. (2006). Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *The Journal of Cell Biology*, *175*(6), 1005- 1015. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606062>
- Yamanaka, K.-I., & Mizutani, H. (2011). The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Current Problems in Dermatology*, *41*, 80- 92. <https://doi.org/10.1159/000323299>
- Yosipovitch, G., & Bernhard, J. D. (2013). Clinical practice. Chronic pruritus. *The New England Journal of Medicine*, *368*(17), 1625- 1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1208814>
- Yosipovitch, G., Rosen, J. D., & Hashimoto, T. (2018). Itch : From mechanism to (novel) therapeutic approaches. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(5), 1375- 1390. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.005>
- Zeidler, C., Pereira, M. P., Huet, F., Misery, L., Steinbrink, K., & Ständer, S. (2019). Pruritus in Autoimmune and Inflammatory Dermatoses. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1303. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01303>

Zepter, K., Häffner, A., Soohoo, L. F., De Luca, D., Tang, H. P., Fisher, P., Chavinson, J., & Elmets, C. A. (1997). Induction of biologically active IL-1 beta-converting enzyme and mature IL-1 beta in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *159*(12), 6203- 6208.

Zhou, L., Zhang, X., Paus, R., & Lu, Z. (2018). The renaissance of human skin organ culture : A critical reappraisal. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *104*, 22- 35. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.10.002>

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux, solutions et supports de culture cellulaire utilisés

Milieux, solutions et supports de culture cellulaire	Références	Fournisseur
B-27® Supplement (50X), serum free	17504044	Gibco, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, Fr
Boite de Petri	391-2072, 0507901, 391-2076	VWR International SAS, Fontenay-sous-Bois, Fr
Protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4)	SRP3016	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (hBA-238)	sc-4554	SantaCruz Biotechnology, EU
Cell scraper	83.183	VWR International SAS, Fontenay-sous-Bois, Fr
CHIR99021	SML1046	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Collagenase from Clostridium histolyticum, type IV-S	C1889	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Cryomatrix : Thermo Scientific™ Résine d'enrobage Shandon™	6769006	Fisher Scientific, Illkirch, Fr
Adénosine monophosphate (AMP) cyclique dibutyryl	D0260	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	D5879	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Dispase® II	17105041	Gibco by Lifetechnologies, Villebon-sur-Yvette, Fr
DMEM Ham's F12 medium (DMEM-F12) 1:1 mixture w/15mM Hepes, L-Gln	BE12-719F	Lonza, Bâle, Su
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 4,5g/L Glucose w/ U1	BE12-604F/U1	Lonza, Bâle, Su
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 1x w/o Ca ⁺⁺ w/o Mg ⁺⁺	BE17-512F	Lonza, Bâle, Su
Epidermal growth factor	130-093-825	Miltenyi Biotec Inc, Auburn, EU
Fibroblast growth factor 2	130-093-564	Miltenyi Biotec Inc, Auburn, EU
Fibronectine	356008	Corning, New-York, EU
fœtal bovine serum	CVFSVF00-04	Eurobio, Courtaboeuf, Fr
glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	231-509-8	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Hydrocortisone	H0135	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Insuline de pancréas bovin	I6634	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr

Laminine	L2020	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Leujemia Inhibitory Factor	130-108-156	Miltenyi Biotec Inc, Auburn, EU
Keratinocyte serum-free medium (KSFM) with L-glutamine	17005034	Gibco by Lifetechnologies, Villebon-sur-Yvette, Fr
Keratinocyte-SFM Supplement: Human Recombinant Epidermal Growth Factor (EGF 1-53) & Bovine Pituitary Extract (BPE)	37000015	Gibco by Lifetechnologies, Villebon-sur-Yvette, Fr
Lamelle couvre-objet ronde de 14 mm	9.161066	Grosseron, Couëron, Fr
N2	17502-048	Gibco by Lifetechnologies, Villebon-sur-Yvette, Fr
NeuroBrew-21 without Vitamin A (NB-21-A)	130-097-263	Miltenyi Biotec Inc, Auburn, EU
Nerve growth factor (NGF), NGF- β humain	N1408	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Normocin™ - Antimicrobial Reagent	ant-nr-2	InvivoGen, San Diego, EU
Plaques culture cellulaire, 6-12-24-96 puits, fond plat et flacons de culture cellulaire 25-75-175cm ² , gamme Cell+	-	Sarstedt, Nümbrecht, All
Purmorphamine (PMA)	SML0868	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Poly-L-Lysine solution	P4707	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
poly-L-ornithine	P3655	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Neurobasal	21103-049	Gibco by Lifetechnologies, Villebon-sur-Yvette, Fr
Sérum de veau fetal inactivé par la chaleur	F9665	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Transwell Permeable Supports	3460	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
Trypsine-Versène (EDTA)	BE17-161E	Lonza, Bâle, Su
Trizol	T9424	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Triton X-100	T8532	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr

Annexe 2 : Réactifs utilisés

<u>Réactifs</u>	<u>Référence</u>	<u>Fournisseur</u>
Bovin serum albumin (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Chloroforme	22706,326	VWR International SAS, Fontenay-sous-Bois, Fr
CGRP EIA kit	A05482	Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, FR
Éthanol absolu ≥ 99.8 %, AnalaR NORMAPUR® ACS	20821.321	VWR International SAS, Fontenay-sous-Bois, Fr
Éthylènediaminetétraacétique (EDTA)	EDS	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	10400745	Applied Biosystems, Waltham, EU
iMark™ microplate absorbance reader	1681135	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Fr
Paraformaldéhyde (PFA)	P6148	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Power SYBR® Green PCR Master Mix	4368706	Applied Biosystems, Waltham, EU
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	P36935	Molecular Probes, Eugene, EU
RNeasy Plus mini Kit	74104	Qiagen, Courtaboeuf, Fr
Substance P Parameter Assay Kit	KGE007	R&D systems, Minneapolis, EU
Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) ELISA kit (DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	DY1398	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	M2128	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
ToxiLight™ non-destructive bioassay Kit »	LT07-217	Lonza, Bâle, Su
TriReagent	T9424	Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fr
Vectashield with Dapi	H-1200	Vector Laboratories Inc, Burlingame, RU

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS
SUPPLEMENTAIRES**

CLINICAL REPORT

1/5

Pain in Atopic Dermatitis: An Online Population-based Survey

Flavien HUET^{1,2}, Jason SHOURICK³, Sophie SÉITÉ⁴, Charles TAIEB⁵ and Laurent MISERY^{1,2}¹Department of Dermatology, University Hospital of Brest, ²LIEN, University of Brest, Brest, ³University, Paris-Sud, ⁴La Roche-Posay Dermatological Laboratories, Levallois-Perret, and ⁵EMMA, Fontenay sous Bois, France

Pruritus in atopic dermatitis has been studied extensively; however, evaluation of skin pain has been very limited. The aim of this study was to evaluate the presence, frequency and characteristics of skin pain in patients with atopic dermatitis. A survey was conducted of a representative sample of 5,000 18–80-year-old individuals selected from the French population according to sex, age, geographical area and socioprofessional status. Data on socio-demographic status and the presence of any skin disease were collected. Pain in the past month and health-related quality of life were evaluated. Mean intensity of skin pain during the previous month was assessed with a horizontal visual analogue scale (0–10). Skin pain was reported by more than half of the patients with atopic dermatitis, at a pain intensity of almost 6/10. A neuropathic component was suggested by the Douleur Neuropathique – 4 questions (DN4) questionnaire (a tool for detection of neuropathic pain), as well as the presence of pain inside and outside of skin lesions. Severe alterations to health-related quality of life were assessed with the Dermatology Life Quality Index and Short Form 12 Health Survey (SF-12). Pain is reported frequently by patients with atopic dermatitis. Healthcare professionals should question patients about pain and provide effective treatments. Future clinical trials must take skin pain into account.

Key words: atopic dermatitis; skin; pain; patient-reported outcome; health-related quality of life; itch.

Accepted May 11, 2020; Epub ahead of print May 19, 2020

Acta Derm Venereol 2020; XX: XX–XX.

Corr: Laurent Misery, Department of Dermatology, University Hospital of Brest, 2 avenue Foch, FR-29200 Brest, France. E-mail: laurent.misery@chu-brest.fr

Patients with AD experience pruritus (itch) (1), and this symptom is included in the definition of the disease (2). At the recent meeting of the Harmonising Outcome Measures for Eczema initiative (HOME V) participants agreed that intensity of itch should be measured when assessing long-term control of eczema in addition to the frequency of itch captured by the symptoms domain (3). There is currently an increasing number of promising treatments for patients with AD (4). All these clinical trials investigate soothing itch (1, 4, 5).

Pain is considered a major clinical, social, and economic problem in communities worldwide. Differences in the methodology and conduct of epidemiological studies make it difficult to provide precise estimates of

SIGNIFICANCE

Pruritus in atopic dermatitis has been studied extensively; however, skin pain is very poorly evaluated. The aim of this study was to evaluate the presence, frequency and characteristics of skin pain in patients with atopic dermatitis. A survey was conducted on a representative sample of 5,000 18–80-year-old individuals from the French population. Pain and quality of life were evaluated. Skin pain was reported by more than half of the patients with AD, at a pain intensity of almost 6/10. A neuropathic component was suggested by the DN4 questionnaire, as well as the presence of pain inside and outside of skin lesions. Severe alterations in quality of life were assessed by Dermatology Life Quality Index and Short Form 12 Health Survey (SF-12) measurements. Pain is frequently reported by patients with atopic dermatitis. Healthcare professionals should question patients about pain and provide effective treatments. Future clinical trials must also take skin pain into account.

prevalence and incidence; however, the burden of pain is large. Improved concepts and methods are needed to study pain from a population perspective and to enhance the development of strategies for pain prevention and management (6, 7).

Although the first question on the Dermatology Life Quality Index (DLQI) is “Over the last week, how itchy, sore, painful or stinging has your skin been?” (8), few studies have focused on skin pain in atopic patients, and pain is rarely considered a therapeutic target in clinical trials (4). Despite being commonly reported by patients with AD, pain has been poorly studied. To the best of our knowledge, to date, 2 studies have been performed on this topic (9, 10). Unfortunately, these studies included only a small number of patients, and they were not compared with a healthy population. The aim of the current study was to evaluate the presence, frequency and characteristics of skin pain among patients with AD, through a survey of a large representative sample of the French population.

METHODS

Institutional review board approval was not required, since the study used completely anonymized data and did not involve patient contact.

A self-administered questionnaire was given to a representative sample of the French 18–80-year-old population, a total of 5,000 individuals. The sample was selected according to the usual method to obtain a representative sample according to sex, age,

Second auteur dans un article de revue - Current Opinion in Pharmacology - 2019



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in
Pharmacology

Current pharmaceutical developments in atopic dermatitis

Laurent Misery^{1,2}, Flavien Huet^{1,2}, Olivier Gouin³,
Sonja Ständer⁴ and Mette Deleuran⁵



Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory, pruritic, chronic or chronically relapsing skin disease that typically begins in early childhood and is occurring frequently in families with other atopic diseases (bronchial asthma and/or allergic rhinoconjunctivitis). Thanks to immunological and neurobiological research, the era of new treatments is coming as well as it occurred with psoriasis 15 years ago. Many treatments targeting cytokines (IL-4, IL-13, IL-31, TSLP) or neurotransmitters (substance P, opioids) or their respective receptors as well as phosphodiesterase-4 or the JAK/STAT pathways are under development. Antagonists of cytokines and anti-Jak have promising effects on pruritus while it is more difficult to discriminate the effects of other drugs from the placebo effect on itch, which is known to be high.

Addresses

¹University of Brest, UEN, F-29200 Brest, France

²University Hospital of Brest, Department of Dermatology, Brest, France

³University Paris Descartes, Imagine Institute, INSERM U1163, Paris, France

⁴Center for Chronic Pruritus, Department of Dermatology, University Hospital of Münster, Münster, Germany

⁵Aarhus University Hospital, Department of Dermatology, Aarhus, Denmark

Corresponding author: Misery, Laurent (laurent.misery@chu-brest.fr)

Current Opinion in Pharmacology 2019, 46:7–13

This review comes from a themed issue on Dermatology

Edited by Sonja Ständer and Mette Deleuran

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.12.003>

1471-4882/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory, pruritic, chronic or chronically relapsing skin disease that typically begins in early childhood and is occurring frequently in families with other atopic diseases (bronchial asthma and/or allergic rhinoconjunctivitis) [1]. AD is one of the most common skin diseases which affects up to 20% of children and 1–3% of adults in most countries of the world [2]. AD is often associated with other atopic diseases such as rhinitis, conjunctivitis and/or asthma. Diagnostic criteria of AD are based on clinical findings [3,4], and at the

moment, there is no pathognomonic laboratory biomarker for the diagnosis of AD. Elevation of total or allergen-specific IgE levels in serum or detection of IgE-mediated sensitization in the skin test is not present in all individuals suffering from AD, and the subgroup of patients with a non-IgE-associated AD is called 'intrinsic AD' to distinguish it from 'extrinsic' (IgE-associated) forms of AD [5,6]. This controversy in terminology may have practical implications with regard to specific avoidance strategies in the management of this disease and the choice of treatment. In any case, AD is characterized by erythematous and itchy skin lesions which can involve the entire body and cause a strong impact on the quality of life of patients, with a high burden, especially in severe forms [7,8,9]. Consequently, there is an urge to better understand AD and treat patients because they have numerous unmet needs.

AD pathophysiology

AD is a multifactorial disease with a strong genetic influence (72% concordance in monozygous twins, 23% in heterozygous twins) [10] — but not an inherited disease — and the main pathophysiological mechanisms can be summarized as follows [1]: (1) an immune deviation toward Th2 in the initiation phase with consequent increased IgE production, (2) a deficient skin barrier function due to abnormal lipid metabolism and/or epidermal structural protein formation, (3) an abnormal microbial colonization with pathogenic organisms such as *Staphylococcus aureus* or *Malassezia furfur*, (4) a neurogenic inflammation. The pathophysiology of AD is summarized in Figure 1.

Nowadays, there is a very dynamic research on pathophysiology and treatment of AD, especially regarding itch [11]. Among the proteins involved in the maintenance of the epidermal barrier, filaggrin is the most studied and genetic variations, and loss of function variants within the FLG gene have been evidenced as a major risk factor in AD [12,13]. Proteins are not the only components of the barrier since lipids, mainly ceramides (with ester linked ν -hydroxyl ceramide (EO ceramide), free fatty acids (FFA) and cholesterol, constitute the lipid matrix that is organized in lamellar bodies and located between corneocytes [14]. In AD, this lipid matrix is disorganized, and an alteration of the epidermal barrier is induced. AD patients show a reduction of long chains, an increase of unsaturated FFAs and a decrease of very long chains of ceramides in the skin [15].

Auteur mineur dans un article de revue - Frontiers in Immunology - 2019



Pruritus in Autoimmune and Inflammatory Dermatoses

Claudia Zeidler¹, Manuel Pedro Pereira¹, Flavien Huet^{2,3}, Laurent Misery^{2,3}, Kerstin Steinbrink¹ and Sonja Ständer^{1*}

¹ Department of Dermatology and Center for Chronic Pruritus, University Hospital Münster, Münster, Germany, ² Department of Dermatology, University Hospital of Brest, Brest, France, ³ Univ. Brest, IJEN, Brest, France

Pruritus in autoimmune and inflammatory dermatoses is a common symptom that can be severe and affect the quality of life of patients. In some diseases, pruritus is related to disorders activity and severity or may occur independent of the disease. Despite the high prevalence, the symptom is still underrated and there are only a few trials investigating the efficacy of drugs for disease-specific pruritus. In this review, the characteristics and possible pathomechanisms of pruritus in various dermatoses like autoimmune bullous diseases, connective tissue diseases as well as autoimmune-associated dermatoses (atopic dermatitis, psoriasis vulgaris) is illustrated. Additionally, studies analyzing the antipruritic treatment are discussed. Summarizing, the prevalence of pruritus in these diseases demonstrates the importance for symptom recognition and the need for an efficient antipruritic therapy.

OPEN ACCESS

Edited by:

Ralf J. Ludwig,
Universität zu Lübeck, Germany

Reviewed by:

Christian Vestergaard,
Aarhus University, Denmark
Umri Samavedam,
University of Cincinnati, United States

*Correspondence:

Sonja Ständer
sonja.staender@uni-muenster.de

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 29 March 2019

Accepted: 22 May 2019

Published: 21 June 2019

Citation:

Zeidler C, Pereira MP, Huet F,
Misery L, Steinbrink K and Ständer S
(2019) Pruritus in Autoimmune and
Inflammatory Dermatoses.
Front. Immunol. 10:1303.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01303

Keywords: Itch, pruritus, psoriasis, atopic dermatitis, IL31, substance P, bullous pemphigoid

INTRODUCTION

Autoimmune diseases occur due to a deregulated immune response directed to the body own tissues. Cutaneous manifestations may occur secondarily to systemic autoimmune conditions such as lupus erythematosus (LE) or systemic sclerosis (SSc) or result from primary dermatoses as e.g., in autoimmune bullous diseases (AIBD) or in vitiligo (1). A feature of autoimmune disorders is the occurrence of an exacerbated inflammation owing to an enhanced release of pro-inflammatory mediators. One common symptom is pruritus which is listed by the Global Burden of Disease project as one of the 50 most common interdisciplinary symptoms leading to high burden levels (2). Chronic pruritus (CP) is often accompanied by paresthetic sensations like warmth, burning and stinging (3). Physicians should be alert to this debilitating symptom and offer patients with adequate antipruritic care. In this review we provide an overview of the most relevant autoimmune dermatoses focusing on pruritus, including, pathophysiological mechanisms, clinical features and when available anti-pruritic treatment options (Table 1). Atopic dermatitis (AD) and psoriasis vulgaris are included since autoimmunity phenomena have been observed in these (4–7).

ATOPIC DERMATITIS

AD is a common disease which affects about 20% of children and 5% of adults (8). The pathophysiological mechanisms are an immune deviation toward T helper cells 2 cells secreting predominantly IL4, IL5, and IL13 in in the initiation phase with consequent increased IgE production, a deficient skin barrier function, an abnormal microbial colonization and a neurogenic inflammation (9). Severe pruritus appears in almost all patients (10), correlating with severity of AD (11). Ninety-three percent of patients reported to scratch often or very often, and perceive

SHORT COMMUNICATION



713

Patient Burden is Associated with Alterations in Quality of Life in Adult Patients with Atopic Dermatitis: Results from the ECLA StudyLaurent MISERY^{1,2}, Julien SENESCHAL³, Ziad REGUIAI⁴, Stéphanie MERHAND⁵, Stéphane HÉAS⁶, Flavien HUET^{1,2}, Charles TAIEB⁷ and Khaled EZZEDINE^{8,9}¹Department of Dermatology, University Hospital of Brest, FR-29609 Brest, ²Laboratory Interactions Neurons-Keratinocytes (LINK), University of Western Brittany, Brest, ³Department of Dermatology, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, ⁴Courlancy Polyclinic, Reims, ⁵Association Française de l'Eczéma, Redon, ⁶EA4636, University of Rennes 2, Rennes, ⁷European Market Maintenance Assessment, Vincennes, ⁸EA EpiDermE, University Paris-Est, Paris, ⁹Department of Dermatology, University Hospital Henri Mondor, Créteil, France. E-mail: laurent.misery@chu-brest.fr

Accepted Apr 12, 2018; Epub ahead of print Apr 12, 2018

Atopic dermatitis (AD) profoundly alters quality of life in adults. There are few studies concerning patient burden in AD (1), since burden of disease is a recent concept that includes broader aspects of disease-related disability (2), such as psychological, physical, social, and economic factors (2–4). It is possible that the burden of skin diseases may be as great as that of other chronic diseases (5).

This study (Eczema Cohorte Longitudinale Adultes; ECLA) assessed the burden of AD using the Atopy Burden Score – Adult (ABS-A), a recently developed specific tool, and compared the results with those obtained with 3 different quality of life scales.

PATIENTS AND METHODS

Patients with AD were members of the French Association of Eczema (Association Française de l'Eczéma) or outpatients recruited in 4 dermatology centres in France (Brest–Bordeaux–Créteil–Reims).

The patients answered questions on their socio-demographic data, disease history and management data; location of lesions; impact on sexuality, partners and family, and professional life; and the financial cost of the disease. Disease severity was evaluated using the Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis (PO-SCORAD) index. In addition, patients were asked to complete 3 generic quality of life questionnaires (Short Form-12 (SF-12), Dermatology Quality of Life Index (DLQI) and Euro-QoL-5 Dimensions (EQ-5D)) and an AD-specific burden questionnaire, the ABS-A.

The PO-SCORAD index has a self-assessment score of AD (6). Although the PO-SCORAD is not recommended to assess clinical signs of AD, it is convenient to define the following large classes of severity: mild (PO-SCORAD score <25), moderate (between 25 and 50) and severe (>50).

The SF-12 is a short version of the Short Form-36 (SF-36), a generic measure enabling assessment of health status in the general population (7). Two scores, the Physical Component Summary (PCS-12) and the Mental Component Summary (MCS-12), can be calculated from the 12 questions of the SF-12. There is no overall score. A higher score indicates a better quality of life (8).

The DLQI is a health quality of life scale specific to dermatological disorders (9). A total score (between 0 and 30) is calculated and can be expressed as a percentage. A higher score indicates a worse quality of life.

The EQ-5D has 5 dimensions (Mobility, Self-care, Usual activities, Pain/Discomfort, Anxiety/Depression) (10). At the end of the questionnaire, a visual analogue scale (EuroQoL-visual analogic scale; EQ-VAS) records the respondent's self-rated health on a 20-cm vertical scale (score range 0–100).

The ABS-A is an 18-item questionnaire specifically developed to evaluate the burden of AD in daily life (11). Each of the 18 items is rated with a 7-level scoring system and evaluates specific aspects of the burden of AD during the past 7 days. A higher score indicates a higher burden.

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test, analysis of variance (ANOVA) or non-parametric tests (Wilcoxon or Kruskal–Wallis) for quantitative variables. For qualitative variables, intergroup comparisons were performed with the χ^2 test, or Fisher's test. The level of significance was set at 5%. Data were analysed using SAS® software version 8.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

A total of 1,024 patients (596 women (58.3%) and 427 men; mean ± standard deviation (SD) age: 42.7 ± 15.2 years) answered the questionnaire. Of these patients, 283 (27.6%; 50 ± 13.9 years) had mild AD, 414 (40.4%; 41.1 ± 14.8 years) moderate AD and 327 (31.9%; 38.5 ± 14.6 years) severe AD ($p < 0.001$). There was no significant difference between the 3 latter groups with respect to body mass index (BMI), economic income, academic level and family situation.

The quality of life and burden scores were higher when disease severity measured with the PO-SCORAD was increased ($p < 0.001$) (Table I). There were no significant differences between men and women. Changes in quality of life and burden were higher in patients who also presented with asthma ($p < 0.001$), with the exception of the MCS ($p < 0.05$), and in patients with hay fever ($p < 0.001$), with the exception of the EQ-VAS.

Table I. Assessment of burden and alterations in quality of life in patients with atopic dermatitis (AD) with regard to different test scores ($p < 0.001$)

	Mild AD <i>n</i> = 283 Mean ± SD	Moderate AD <i>n</i> = 414 Mean ± SD	Severe AD <i>n</i> = 327 Mean ± SD	Global <i>n</i> = 1,024 Mean ± SD
DLQI	2.0 ± 3.9	9.5 ± 6.1	16.2 ± 6.0	9.5 ± 7.8
PCS (SF12)	52.3 ± 8.2	50.1 ± 8.7	49.1 ± 8.5	50.4 ± 8.6
MCS (SF12)	45.8 ± 10.1	40.0 ± 9.5	35.9 ± 8.5	40.3 ± 10.1
EQ-5D	0.79 ± 0.24	0.68 ± 0.28	0.60 ± 0.32	0.69 ± 0.29
EQ-VAS	70.2 ± 22.0	63.2 ± 21.7	57.8 ± 21.3	63.4 ± 22.1
ABS-A	6.1 ± 10.5	26.1 ± 16.9	43.4 ± 16.8	26.1 ± 21.0
PO-SCORAD	11.5 ± 7.7	37.7 ± 7.0	62.5 ± 8.6	38.4 ± 21.1

DLQI: Dermatology Quality of Life Index; PCS: Physical Component Summary; MCS: Mental Component Summary; SF: Short Form; EQ-5D: Euro-QoL-5 Dimensions; EQ-VAS: EuroQoL-visual analogic scale; ABS-A: Atopy Burden Score – Adult; PO-SCORAD: Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis.

Auteur mineur dans un article original – Journal of European Academy of Dermatology and Venereology– 2018

DOI: 10.1111/jdv.15223

JEADV

ORIGINAL ARTICLE

The impact of atopic dermatitis on sexual health

L. Misery,^{1,2*} J. Seneschal,³ Z. Regual,⁴ S. Merhand,⁵ S. Héas,⁶ F. Huet,^{1,2} C. Taleb,^{7,8} K. Ezzedine^{9,10}¹Department of Dermatology, University Hospital of Brest, Brest, France²Laboratory Interactions Neurons-Keratinocytes (LINK), University of Western Brittany, Brest, France³Department of Dermatology and Pediatric Dermatology, National Reference Centre for Rare Skin Disorders, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France⁴Courtenay Polyclinic, Reims, France⁵Association Française de l'Eczéma, Redon, France⁶EA4636, University of Rennes 2, Rennes, France⁷European Market Maintenance Assessment, Vincennes, France⁸Department of Dermatology, University Hospital of Necker Enfants Malades, Paris, France⁹EA EpidemE, University Paris-Est, Paris, France¹⁰Department of Dermatology, University Hospital Henri Mondor, Créteil, France

*Correspondence: L. Misery. E-mail: laurent.misery@chu-brest.fr

Abstract

Background Sexual health is frequently affected by chronic diseases but has been poorly investigated in patients with atopic dermatitis (AD).

Objective To evaluate the risk factors for impaired sexual desire and its relationship with the burden and quality of life of patients with AD.

Methods A multicentre prospective transversal study in patients with AD. Socio-demographic and clinical data were obtained from all patients using a specifically developed questionnaire. In addition, patients were asked to answer validated scales, that is ABS-A, DLQI, SF-12 and EQ-5D.

Results A total of 1024 patients participated in the study. Severity of AD, sites involved and treatment type was found to negatively impact the sexual desire of patients and their partners. In addition, the involvement of the genital and visible areas was associated with a higher burden and more significant alterations in quality of life.

Conclusions The results of this study are substantial and clearly demonstrate the deep impact of AD on sexual health, its relationship with disease-related burden and alterations to quality of life. Psychosociological as well as neurosensory phenomena could help to understand these data.

Received: 11 May 2018; Accepted: 26 July 2018

Conflicts of Interest

LM is a consultant for Beiersdorf, Bioderma, Expanscience, Galderma, Johnson&Johnson, Leo Pharma, Novartis, Pierre Fabre, Roche-Posay, Sanofi and Uriage. JS is a consultant for Sanofi. ZR is a consultant for Sanofi. FH is a consultant for Beiersdorf. CT is a consultant for EMMA. KH, SM and SH declare that they have no conflict of interests.

Funding source

SANOFI

The World Health Organization defines sexual health as 'the integration of the somatic, emotional, intellectual and social aspects of sexual being in ways that are positively enriching and that enhance personality, communication and love'.¹ In 2000, the Pan American Health Organization (PAHO) and WHO convened a number of expert panels to review terminology and identify programme options. In the course of these meetings, they confirmed this definition. Sexuality is an integral part of

human life and an important component of health-related quality of life.² Unfortunately, sexual issues are often associated with other physical and mental disorders, such as diabetes, cardiovascular problems, blood pressure abnormalities, depression and anxiety.³

Skin conditions may have a strong impact on sexual health, as they involve personal appearance and thus affect social life and personal relationships.⁴ Regardless of the affected body area, the

LETTER TO THE EDITOR

Real-life study of anti-itching effects of a cream containing menthoxypropanediol, a TRPM8 agonist, in atopic dermatitis patients

Editor,

The cold-sensitive transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channel has an inhibitory effect on pruritus.¹ Menthoxypropanediol is a TRPM8 agonist that is effective in chronic itch.² In a first study,² patients with atopic dermatitis were grouped together with other patients suffering from chronic pruritus. In the present study, we evaluate the anti-itching effects of the cream containing only menthoxypropanediol (not the other TRPM8 agonist 1R,2S,5R)-N-(2-(2-pyridinylo)ethyl)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanecarboxamide (CHC) only in patients with atopic dermatitis in real-life settings.

The inclusion criteria were as follows: 18- to 65-year-old patients with atopic dermatitis (AD) with itching sensation and without eczema flare on the tested area, who gave informed consent about test purpose and signed the consent form. The exclusion criteria included the presence of another skin disorder or the use of other similar products on the test area. Participants were also excluded if they were pregnant, breastfeeding, or known to have any sensitivity to the components included in the product. A skincare formulation containing menthoxypropanediol (Niederhof AG, Hamburg, Germany) was used during 7 days. Itching crisis was defined as a rapid increase in itch intensity. The anti-itching efficacy was evaluated by means of the classical 0–10 visual analogue scale and the DIPS, which were completed before application and then 2 min, 5 min, 15 min, 30 min and 1 h after application.³ The data were analysed with the bilateral Student's *t*-test. The statistical differences were considered significant when $P < 0.05$.

Two males and 20 females were recruited (19–48 year old; mean age: 32 years). Some side-effects were reported: priddling ($n = 9$), sensations of cold ($n = 4$), a burning sensation ($n = 1$), increased pruritus ($n = 2$) and erythema ($n = 4$). As assessed by the DIPS, the evolution of pruritus was favourably modified over time by the application of the product according (Table 1). At 2, 5, 15, 30 and 60 min after application, 53%, 70%, 80%, 95% and 97% of patients, respectively, reported that itch was improved ($P < 0.05$). The itch intensity (measured with the

visual analogue scale) decreased to 3.8 (± 2.7) after 2 min, 3.1 (± 2.8) after 5 min, 2.5 (± 2.5) after 15 min, 1.6 (± 2.0) after 30 min and 0.8 (± 1.5) after 60 min ($P < 0.05$). Figure 1 shows the decrease in itch intensity after product use ($P < 0.05$). The % of itching crisis was as follows: (i) 100% ($n = 22$) experienced one episode; (ii) 95.5% experienced two episodes ($n = 21$), (iii) 90.9% experienced three episodes ($n = 20$), (iv) 54.5% experienced four episodes ($n = 12$), and (v) 13.6% experienced five episodes ($n = 3$) in 7 days.

Hence, menthoxypropanediol cream was effective against itch, with a rapid effect, while more than 90% of patients were satisfied after 15 min or more. We did not compare the cream containing menthoxypropanediol with the vehicle only because we chose to evaluate the effects of the final product on itch over time in real-life conditions as patients prefer to apply anti-itch products when they suffer from itch rather than systematically. A comparative study with hydrocortisone cream⁴ and another study compared the final product with the vehicle,² allowing a significant improvement of itch with a systematic application.

The activation of TRPM8 by cold or chemical agonists such as icilin or menthol is known to inhibit itch through central⁵ and peripheral mechanisms. The activation of TRPM8 on keratinocytes can modify skin barrier properties.⁶ The recent discovery of the expression of TRPM8 on Merkel cells⁷ suggests that these cells could be involved in inhibiting itch. A direct effect on nerve endings is also highly probable.⁸

Niederhof AG provided funding for this clinical study. The funder contributed substantially to the design and the

Table 1 Effects of the cream over time, as measured with the DIPS. The results are given as percentages of itchy episodes. These data were not significantly affected by the number of episodes or number of applications

	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h
Strongly worsened	0	0	0	0	0
Rather worsened	0	1	3	0	0
Moderately worsened	1	0	1	0	0
Slightly worsened	9	0	1	1	0
No change	27	23	5	4	2
Slightly improved	20	19	25	9	4
Moderately improved	11	11	12	20	8
Rather improved	6	15	23	16	12
(Almost) no pruritus anymore	12	24	29	32	32

Communication Orale lors de la Journée des Jeunes Chercheurs à Brest – 22 mai 2019

Les peaux sensibles peuvent-être une neuropathie des petites fibres : résultats d'une étude d'analyse sensorielle quantitative cas-contrôle

Introduction: Le syndrome des peaux sensibles est défini par la survenue de sensations déplaisantes en réponse à des stimuli qui ne devraient pas provoquer de telles sensations. A ce jour, la physiopathologie reste encore mal comprise. L'objectif de l'étude était de déterminer la présence ou l'absence d'atteinte sensitive chez les sujets avec un syndrome des peaux sensibles, principalement d'évaluer le seuil de détection cutanée au chaud (heat-pain threshold (HPT)).

Méthodes: Vingt-et-un sujets avec un syndrome des peaux sensibles et 21 sujets contrôles ont été inclus dans cette étude cas-témoins. Une analyse sensorielle quantitative avec HPT était réalisée chez tous les sujets. La douleur neuropathique était évaluée par deux questionnaires : le questionnaire « Douleur Neuropathique 4 » (DN 4) et le « Neuropathic Pain Symptom Inventory » (NPSI).

Résultats: Quarante-deux sujets ont été inclus. Le seuil de détection de la douleur (HPT) était significativement plus bas chez les cas (14,51+/-2,75) que chez les témoins (17,8+/-2,49) ($p < 0,001$). Le seuil de détection de la douleur intermédiaire (HPT 0.5) était significativement diminué chez les sujets avec un syndrome des peaux sensibles alors que les seuils de détection au froid et à la vibration n'étaient pas différents du groupe contrôle. Le score DN4 était plus élevée chez les cas (4,5 +/- 1,7) que chez les témoins (0,05 +/- 0,2 ($p < 0,001$)). Dans le DN4, les 4 sensations les plus décrites par les cas étaient les picotements (90,5%), les démangeaisons (76,2%), le frottement (66,7%) et les brûlures (66,7%). Le NPSI était également plus élevé dans les cas (34,4+/-15,1) que dans les témoins (0,05+/- 0,2, $p < 0,001$).

Conclusion: La diminution du seuil de détection de la douleur à la chaleur chez les sujets avec un syndrome des peaux sensibles comparée aux contrôles traduit une hyperalgésie liée à une atteinte des fibres-C non myélinisées. Ces résultats ainsi que l'augmentation des scores DN4 et NPSI renforcent l'hypothèse neuronale dans le syndrome des peaux sensibles. Les données de cette première étude d'analyse sensorielle quantitative réalisée sur des patients peaux sensibles sont de nouveaux arguments à prendre en compte pour considérer le syndrome des peaux sensibles comme une neuropathie des petites fibres et modifier notre prise en charge thérapeutique.

Liste des co-auteurs impliqués dans le travail : A. Dion, A.Batardière, A.S.Nedelec, F.Le Caër, P.Bourgeois, E. Brenaut, L. Misery

Financement : *Société Française de Dermatologie*

Promoteur le cas échéant : *CHRU de Brest*

Communication orale aux Journées Dermatologiques de Paris 2018 – 11 au 15 décembre 2018

Etude *in vitro* de l'effet du menthoxypropanédiol sur le prurit au cours de la dermatite atopique : rôle du récepteur TRPM-8

Introduction: La dermatite atopique (DA) est une dermatose chronique qui nécessite de nouveaux traitements. Le récepteur PAR-2 (« Protease-activated receptor »), exprimé par les kératinocytes, est la principale voie d'induction du prurit de la DA. La kallikréine-5 (KLK-5), une protéase libérée par les kératinocytes et impliquée dans la physiopathologie de la DA, est un agoniste peptidique naturel de ce récepteur. Le menthol et ses dérivés non allertranscriptomiques sont connus pour inhiber le prurit en activant des récepteurs spécifiques, et en particulier le TRPM8 (« Transient Receptor Potential subfamily M member-8 »). L'objectif de cette étude était d'étudier *in vitro* les effets d'agonistes de TRPM-8, le menthol et l'un de ses dérivés, le menthoxypropanédiol (MPD) sur les voies de signalisation du prurit.

Méthodes: Les effets du MPD et du menthol sur les voies du prurit ont été testés sur un modèle tri-dimensionnel d'explants cutanés humains réinnervés par des neurones sensoriels de rat (ganglions rachidiens dorsaux, GRD), dans lesquels la voie PAR-2 était activée par de la KLK-5. L'expression de plusieurs protéines a été étudiée par immuno-histophotométrie quantitative sur l'épiderme et par Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (EIA) sur les surnageants. L'expression de l'ARNm de plusieurs marqueurs a également été analysée par RT-qPCR dans les GRD.

Résultats: Premièrement, nous avons confirmé la réinnervation dermique et épidermique (marquage au PGP9.5) des explants cutanés à J8 de culture.

La KLK-5 augmentait l'expression de l'ARNm du PAR-2 et sa protéine de 85% et 28%, respectivement, ainsi que l'expression protéique de la TSLP (+5%) et de l'ARNm de son récepteur (+38%).

Le MPD diminuait l'expression protéiques de PAR-2 de 14%, du TRPM-8 de 19% et du TRPA-1 de 21%, mais augmentait celle du TRPV-1 de 23% dans l'épiderme. Son action était plus puissante que le menthol. L'ajout de MPD après activation par KLK-5 entraînait une modulation du relargage de CGRP.

Discussion : Notre étude montre que notre modèle utilisant de la KLK-5, une protéase présente dans la peau, pour activer la voie PAR-2 et induire un phénotype de DA est approprié avec l'augmentation de l'expression protéique de PAR-2 et TSLP ainsi que l'augmentation de l'expression des ARNm de son récepteur spécifique, le TSLPR. Les agonistes de TRPM8 comme le menthol et le MPD, agissent sur la voie du prurit en réduisant l'activation de PAR-2. Le MPD semble être plus puissant que le menthol et agit par différent mécanisme. Il augmente l'expression de TRPV-1 et la sécrétion de CGRP alors qu'il diminue l'expression de TRPM-8 et TRPA-1.

Conclusion Sur la base de ces résultats, il apparaît que le menthol et le MPD peuvent inverser l'activation de PAR-2 *ex vivo*, suggérant que le MPD pourrait être un agent thérapeutique intéressant dans le traitement du prurit aigu chez les patients atteints de DA.

Auteurs: Flavien Huet; Adeline Bataille; Jérémy Chéret, Gitta Neufang ; Susanne De Kleijn; Denis Roggenkamp ; Nicolas Lebonvallet, Laurent Misery, Christelle Le Gall-Ianotto.

Affiliation: Laboratoire Interactions Epithéliums-Neurones (LIEN, EA4685), Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

Beiersdorf AG, Hambourg

Pas de conflit d'intérêt

Communication écrite à l'ESDR du 18 au 21 septembre 2019 à Bordeaux

Sensitive skin can be small fiber neuropathy : results from a case-control quantitative sensory testing study

Introduction: Sensitive skin syndrome (SSS) is defined as the occurrence of unpleasant sensations (itch, pain, burnings, prickling...) in response to stimuli that should not normally cause such sensations. Previous studies show that SSS could be a small-fiber neuropathy but quantitative sensory testing (QST) is lacking.

Objective: Using QST, the aim of the study was to determine the presence or absence of tactile sensitivity disorder, mainly heat-pain threshold (HPT 0.5), in subjects with SSS.

Neuropathic pain was assessed by two questionnaires: the DN4 and the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI).

Materials and Methods: This monocentric case-control study included 21 subjects with SSS and 21 controls. The subjects underwent quantitative sensory testing. Neuropathic pain was assessed by two questionnaires: the DN4 and the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI).

Results: Forty-two subjects were included in the study. The HPT 0.5 was significantly lower in the cases (14.5+/-2.8) than in the controls (17.8+/-2.5) ($p < 0.001$). Intermediate pain (HPT 5.0) was also significantly decreased in SSS. The DN4 and NPSI scores were significantly higher in the cases compared to the controls.

Conclusion: The decrease in HPT in subjects with SSS compared to controls suggests the presence of hyperalgesia, probably due to the damage of C-fibers. These findings, as well as the increased DN4 and NPSI scores, strengthen the neuronal hypothesis of SSS and are new arguments for consideration of SSS as small fiber neuropathy.

Funding source: Supported by the French Society of Dermatology

Conflicts of interest:

FH: Beiersdorf

EB: Bioderma, Nestlé

LM: Beiersdorf, Bioderma, Clarins, Expanscience, Johnson & Johnson, Nestlé, Pierre Fabre, Roche-Posay, Solabia, Uriage

AB, ASN, PB and FLC are employees of Complife

Communication écrite au World Congress of Itch à Sydney – 2019






PRURITUS, PAIN AND OTHER UNPLEASANT SENSATIONS WITH THE MOST FREQUENT SKIN DISEASES: DATA FROM THE FRENCH STUDY "OBJECTIFS PEAU"

Flavien Huet^{1,2,3}, Charles Taleb¹, Florence Corgibet^{1,4}, Emille Brenaut^{1,2,3,5}, Marie-Aleth Richard^{1,5,6}, Laurent Misery^{1,2,3,5}

¹ Société Française de Dermatologie (SFD), Paris, France; ² Service de dermatologie, CHU de Brest, Brest, France; ³ Univ Brest, F-29200 LIEN, Brest, France; ⁴ Fédération Française de Formation Continue et d'Évaluation en Dermatologie-Vénérologie (FFFCED), Paris, France; ⁵ Collège des Enseignants en Dermatologie de France (CEODF), Paris, France; ⁶ Service de dermatologie, CHU Timone, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.

Introduction

The prevalence of pruritus, pain and other sensory symptoms in skin diseases is poorly known

Objective

To assess the frequency of these symptoms with dermatoses using data from the *Objectifs Peau* survey.

Methods

A sample of 20,012 individuals was created using the usual quota method to be representative of people in the French population. People answered a web questionnaire addressing various items, including skin sensory signs and psychological impact.

Results

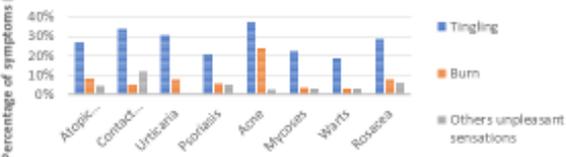
Among the interviewed people, 6501 (32.48%, 95% CI [31.84; 33.13]) reported pruritus whereas 2139 (10.68%, 95% CI [10.26; 11.11]) reported skin pain at least once a day. Pruritus and skin pain were reported simultaneously in 1303 (6.5%, 95% CI [6.17; 6.85]) people.

FREQUENCY OF PRURITUS AND PAIN IN THE MOST FREQUENT SKIN DISEASES



Disease	Pruritus (%)	Pain (%)
Atopic dermatitis	72.45	11.22
Contact eczema	67.86	10.71
Urticaria	65.38	7.69
Psoriasis	51.34	13.65
Acne	48.55	27.59
Mycoses	46.24	10.4
Warts	44.35	16.13
Rosacea	36.51	7.94

FREQUENCY OF SYMPTOMS OTHER THAN PRURITUS AND PAIN THE MOST FREQUENT SKIN DISEASES



Disease	Tingling (%)	Burn (%)	Others (%)
Atopic...	~25	~10	~5
Contact...	~30	~10	~5
Urticaria	~30	~10	~5
Psoriasis	~25	~10	~5
Acne	~35	~25	~10
Mycoses	~25	~10	~5
Warts	~25	~10	~5
Rosacea	~30	~10	~5

Surprisingly, acne was frequently associated with pruritus: almost half of patients. It is even more surprising to find pruritus associated with rosacea or especially warts. Acne and warts were the two most frequently painful skin diseases.

ANXIETY AND DEPRESSION	POPULATION WITH DERMATOSE	POPULATION WITH DERMATOSE EXPOSED	%	POPULATION WITHOUT DERMATOSE	POPULATION WITHOUT DERMATOSE EXPOSED	%
Overall population	6116	1013	16.56%	17434	1035	5.94%
Population with pruritus only	2615	349	13.35%	2583	252	9.76%
Population with skin pain only	256	61	23.83%	580	115	19.83%
Population with pruritus and skin pain	880	417	47.39%	423	99	23.40%
Population without pruritus and skin pain	2365	186	7.86%	10310	569	5.52%

Discussion

The impact of the association of pruritus and skin pain was not studied until now. In our study, the association between pruritus and pain increased dramatically anxiety and depression. Indeed, a patient with a dermatosis claiming pruritus has 1.4 times a risk of depression or anxiety compared to a subject without any dermatosis claiming pruritus. The relative risk reaches 3 for a patient with a dermatosis claiming both pruritus and skin pain compared to a subject without any dermatosis claiming pruritus and skin pain

Conclusion

Pruritus and pain or other sensory symptoms were found to be common not only in classic pruritic skin diseases but also in acne, rosacea or warts. The association of pruritus and pain increased dramatically psychological suffering. These symptoms must be systematically sought, especially since new therapeutic possibilities are emerging for the symptomatic treatment of pruritus.

Funding source: Supported by the French Society of Dermatology

Communication écrite au World Congress of Dermatology à Milan – 2019



SENSITIVE SKIN CAN BE SMALL FIBER NEUROPATHY: RESULTS FROM A CASE-CONTROL QUANTITATIVE SENSORY TESTING STUDY

F. Huet*, **, A. Dion***, A. Batardière****, A.S. Nedelec****, F. Le Caër****, P. Bourgeois****, E. Brenaut*, **, L. Misery*, **

*Department of Dermatology, University Hospital, F-29200 Brest, France; **Univ. Brest LIEN, F-29200 Brest, France; ***INSERM CIC 1412, University Hospital of Brest, Brest, France; ****Complife, Brest, France

Introduction

Sensitive skin syndrome (SSS) is defined as the occurrence of unpleasant sensations (itch, pain, burnings, pricking,...) in response to stimuli that should not normally cause such sensations. Previous studies show that SSS could be a small-fiber neuropathy but quantitative sensory testing (QST) is lacking.

Objective

Using QST, the aim of the study was to determine the presence or absence of tactile sensitivity disorder, mainly heat-pain threshold (HPT 0.5), in subjects with SSS. Neuropathic pain was assessed by two questionnaires: the DN4 and the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI).

Materials and Methods

This monocentric case-control study included 21 subjects with SSS and 21 controls. The subjects underwent quantitative sensory testing. Neuropathic pain was assessed by two questionnaires: the DN4 and the NPSI.

Results

Forty-two subjects were included in the study

Characteristics	Cases (n = 21)	Controls (n = 21)	P-value
Age (years)			1.0 ^a
Mean ± SD	39.9 ± 10.9	39.9 ± 10.7	
Range	20–57	22–57	
Sex female, n (%)	21 (100)	21 (100)	
Dermatological disease, n (%)			0.48 ^b
Yes	2 (10)	0	
No	19 (90)	21 (100)	
Weight (kg)			0.16 ^a
Mean ± SD	68.6 ± 15.1	62.5 ± 12.7	
Range	51–98	40–89	
Height (cm)			0.55 ^a
Mean ± SD	166 ± 5.6	165 ± 6.3	
Range	154–176	154–172	
Body mass index (kg m ⁻²)			0.28 ^a
Mean ± SD	24.8 ± 5.2	23.0 ± 4.9	
Range	18.1–34.4	16.9–32.7	
Dominant hand, n (%)			0.72 ^b
Left	5 (24)	3 (14)	
Right	16 (76)	18 (86)	

^aStudent's t-test for matched data. ^bMcNemar's test.

The HPT 0.5 was significantly lower in the cases (14.5±/2.8) than in the controls (17.8±/2.5) (p<0.001)

Table 2 Heat pain (HP) 0.5 thresholds

Variable	Cases (n = 21)	Controls (n = 21)	P-value
HP 0.5 threshold			< 0.001 ^b
Mean ± SD	14.5 ± 2.8	17.8 ± 2.5	
Range	9.5–19.0	11.3–20.6	
HP 0.5 percentile ^a			0.0021 ^b
Mean ± SD	3.6 ± 5.9	18.7 ± 17.8	
Range	0.01–20	0.01–56	

^aNormative data from references 17 and 38. ^bStudent's t-test for matched data.

Intermediate pain (HPT 5.0) was also significantly decreased in SSS.

The DN4 was higher in the cases (4.5 ±/ 1.7) than in the controls (0.05±/ 0.2 (p <0.001)). In the DN4, the 4 sensations most described by the cases were pins and needles (90.5%), itching (76.2%), brushing (66.7%) and burning (66.7%).

The NPSI was also higher in the cases (34.4±/15.1) than the controls (0.05±/ 0.2, p<0.001).

Conclusion

The decrease in HPT in subjects with SSS compared to controls suggests the presence of hyperalgesia, probably due to the damage of C-fibers. These findings, as well as the increased DN4 and NPSI scores, strengthen the neuronal hypothesis of SSS and are new arguments for consideration of SSS as small fiber neuropathy.

Funding source: Supported by the French Society of Dermatology

Conflicts of interest: FH: Beiersdorf; EB: Bioderma, Nestlé; LM: Beiersdorf, Bioderma, Clarins, Expancience, Johnson & Johnson, Nestlé, Pierre Fabre, Roche-Posay, Solabia, Uriage; AB, ASN, PB and FLC are employees of Complife

Communication écrite lors de l'Ecole Doctorale à Angers – 2019



Characteristics of Pruritus in Relation to Self-assessed Severity of Atopic Dermatitis

F. Huet^{1,2}, MS Faffa¹, F. Poizeau^{3,4}, S. Merhand⁵, L. Misery^{1,2} and E. Brenaut^{1,2}

¹ Department of Dermatology, University Hospital; ² Laboratory on Interactions Neurons-Keratinocytes (LINK), University of Western Brittany, Brest; ³ Rennes University, UPRES EA 7449 REPERES Pharmacoepidemiology and Health Services Research; ⁴ Department of Dermatology, University Hospital, Rennes; ⁵ French Association of Eczema, Redon, France

Introduction

Pruritus is defined as an unpleasant sensation that provokes the desire to scratch. Pruritus is a primary symptom of atopic dermatitis (AD) and constitutes one of the major diagnostic criteria. The condition has a high burden, with serious psychosocial impact and impaired quality of life.

Objective : To explore characteristics of pruritus in AD in relation to the severity of AD

Materials and Methods

A web questionnaire on pruritus in AD, which included the Patient-Oriented SCORing Atopic Dermatitis index and the 5-D itch scale, was available on the website of the French Association of Eczema between January 2015 and March 2016.

Results

Table I. Demographic data

	Total = 170
Age	
years, mean \pm SD	30.9 \pm 10.8
Median (range)	28 (14–71)
Sex, No (%)	
- Female	147 (87%)
PO-SCORAD	
Mean \pm SD	50.8 \pm 17.9
Median (range)	51.3 (2.4–)
AD Severe >50, n (%)	93.6
Pruritus intensity	91 (53.5)
Sleep loss	5.8/10
	4.7/10
5-D itch scale	
Mean \pm SD	13.2 \pm 3.4

Figure I. Effects of pruritus on sleep in patient with AD

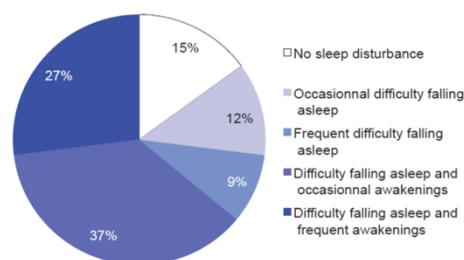
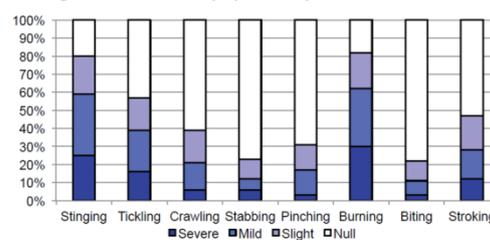


Figure II. Associated symptoms in patients with AD



Discussion

Pruritus in AD is chronic, daily and intense. This study is the first to perform a **qualitative analysis of pruritus according to the severity of AD** using PO-SCORAD. The 5D Itch-Scale, validated in 2010, is a reproducible multidimensional evaluation tool for evaluating pruritus. The strength of our study is that it used a validated tool, allowing subsequent comparisons.

The participants frequently described **sensory symptoms** such as burning (61.8%) and stinging (58.8%) suggesting a **neuropathic component**.

The main limitation of this study was that patients could not be examined by a physician to confirm the diagnosis and severity

Conclusion

Pruritus was worse in severe AD compared with moderate AD, exhibiting a higher impact on sleep and more associated symptoms. The majority of participants reported sleep disturbance as a result of pruritus. The characteristics of pruritus varied depending on the severity of AD.

Communication orale au Congrès Annuel de Recherche Dermatologique – Novembre 2020

CO5 - Modèle 3D réinnervé de dermatite atopique like

F. Huet*, A. Bataille, N. Lebonvallet, L. Misery, C. Le Gall-Ianotto

Introduction : La dermatite atopique (DA) est une dermatose inflammatoire chronique dont le prurit est le symptôme majeur. Les terminaisons nerveuses cutanées médient le prurit ainsi que l'inflammation neurogène cutanée (INC). Actuellement, aucun modèle ne prend en compte cette INC. Un modèle 3D *in vitro* de DA réinnervé permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de la DA et de son prurit et tester les thérapeutiques à venir.

Matériel et méthodes : Des explants de peau humaine ont été réinnervés avec des cellules issues de ganglions rachidiens dorsaux de rat (GRDs), puis traités ou non avec un cocktail pro-inflammatoire (CI) comprenant interleukines 4 et 13, acide polyinosinique-polycytidylique et TNF- α . L'INC (mesurée par la libération de neuropeptides) et les protéines de la différenciation épidermiques (filaggrine, loritrine, cytokératine 10) étaient analysées à la fois par immuno-histochimie, biologie moléculaire et ELISA sur le surnageant.

Résultats : La réinnervation était effective à J5 (n=5, p<0.001) mais aucune modification du nombre de fibres nerveuses n'était observée après l'ajout du CI. L'ajout du CI sur les explants induisait des caractéristiques de DA. En l'absence d'innervation, l'expression protéique de la filaggrine et la loritrine était diminuée, alors que celle de la kératine 10 étaient augmentée lors de l'ajout du CI (p<0.05). Sur le plan de l'inflammation, l'expression protéique de la TSLP n'était pas augmentée, mais l'ajout de CI entraînait une libération de substance P. La réinnervation des explants (sans inflammation) n'entraînait pas de modification de l'expression de la filaggrine ou de la cytokératine 10. L'expression de loritrine était augmentée dans le modèle réinnervé. L'inflammation et l'altération la barrière épidermique sous CI, semblait diminuer en présence de GRDs. La libération de SP n'était pas augmentée lorsque les explants cutanés étaient réinnervés. En revanche, aucune activation des neurones (libération de neuropeptide) n'était observée.

Discussion : Dans notre modèle mimant une peau atteinte de DA réinnervé, la réinnervation était effective mais n'entraîne pas d'INC. Dans la DA, l'innervation engendre l'inflammation neurogène qui entraîne un cercle vicieux inflammatoire avec une altération des protéines de la différenciation et une augmentation de l'inflammation cutanée. Cependant, celui-ci ne semble pas être activé dans notre modèle. Le CI entraîne une stimulation des kératinocytes avec la libération de substance P qui après réinnervation n'était plus présente. L'innervation semble avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'inflammation dans notre modèle. Cette absence d'INC est due à une absence de stimulation des fibres nerveuses (de rats) par la TSLP-humaine dû à une absence d'homologie de séquence entre récepteur humain et de rat. Pour s'affranchir du biais hétérologue du modèle, un modèle 100% humain avec des neurones-sensoriels dérivés de cellules-souches est en cours d'optimisation afin de permettre l'activation de la boucle d'inflammation neurogène présent dans la DA.

Communication écrite aux Journées Dermatologiques de Paris - 2020



Société Française de Dermatologie
et de Pathologie Sexuellement Transmissible



Journées dermatologiques de Paris

1-5 DÉCEMBRE
VERSION 100% VIRTUELLE



Modèle 3D réinnervé de dermatite atopique like

F. Huet, A. Bataille, N. Lebonvallet, L. Misery, C. Le Gall-Ianotto
Univ Brest, Lien, F-29200 Brest, France - Brest (France)

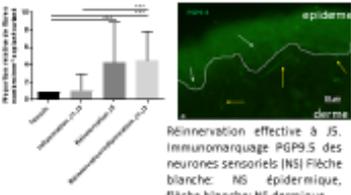
Introduction

La **dermatite atopique** (DA) est une dermatose inflammatoire chronique dont le **prurit** est le symptôme majeur. Les **terminaisons nerveuses cutanées** médient le prurit ainsi que l'**inflammation neurogène cutanée** (INC). Actuellement, aucun modèle ne prend en compte cette INC. Un **modèle 3D in vitro de DA réinnervé** permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de la DA et de son prurit et tester les thérapeutiques à venir.

Matériels et méthodes

Des explants de peau humaine étaient réinnervés avec des cellules issues de ganglions rachidiens dorsaux de rat (GRDs), puis traités ou non avec un cocktail pro-inflammatoire [CI] comprenant interleukines 4 et 13, acide polyinosinique-polycytidylique et TNF- α . L'INC [mesurée par la libération de neuropeptides] et les protéines de la différenciation épidermiques (flaggrine, loriorine, cytokératine 10) étaient analysées à la fois par immuno-histochimie, biologie moléculaire et ELISA sur le surnageant.

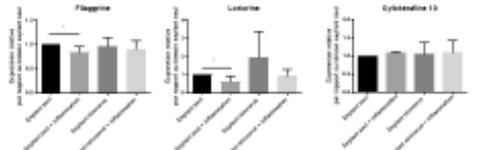
Figure 1 : Validation de la réinnervation du modèle 3D DA-like



Réinnervation effective à J5. Immunomarquage PGP9.5 des neurones sensoriels (NS) Flèche blanche: NS épidermique, flèche noire: NS dermique

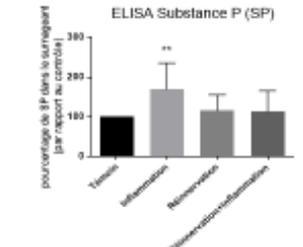
Résultats

Figure 2 : la réinnervation protège la barrière épidermique de l'inflammation



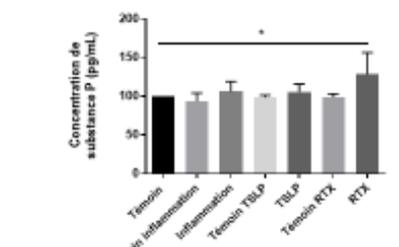
Immunomarquage des protéines de la différenciation épidermique. Diminution de l'expression de la flaggrine et la loriorine après ajout du CI. Restauration de leur expression après réinnervation. n=5, *p<0.05

Figure 3 : la réinnervation inhibe la libération du marqueur d'inflammation SP par les kératinocytes



Libération dans le surnageant de SP avec ou sans ajout du cocktail inflammatoire. Libération significative dans l'explant non réinnervé après inflammation. Inhibition de la libération après réinnervation. n=10, *p<0.01

Figure 4 : les molécules humaines n'activent pas la libération de SP par GRDs



Libération dans le surnageant de SP. Activation par le cocktail inflammatoire ou de la TSLP humaine ou un contrôle positif (RTX). n=3, *p<0.05

Discussion

Dans notre modèle mimant une peau atteinte de DA réinnervé, la **réinnervation était effective mais n'entraînait pas d'INC**. Dans la DA, l'innervation engendre l'inflammation neurogène qui entraîne un cercle vicieux inflammatoire avec une altération des protéines de la différenciation et une augmentation de l'inflammation cutanée. Cependant, celui-ci ne semble pas être activé dans notre modèle.

Le CI entraînait une **stimulation des kératinocytes avec la libération de substance P** qui après réinnervation n'était plus présente. L'innervation avait eu un **rôle protecteur** vis-à-vis de l'inflammation dans notre modèle.

Cette absence d'INC était due à une absence de stimulation des fibres nerveuses (de rats) par la TSLP-humaine dû à une absence d'homologie de séquence entre récepteur humain et de rat. Pour s'affranchir du biais hétérologue du modèle, un **modèle 100% humain** avec des neurones-sensoriels dérivés de cellules-souches est en cours d'optimisation afin de permettre l'activation de la boucle d'inflammation neurogène présent dans la DA.

Conclusion

Modèle d'explant réinnervé de DA-like avec réinnervation effective.
Innervation = **protecteur** vis-à-vis de l'inflammation **≠ amplificateur**
→ Protection de la barrière épidermique (loriorine) / Inhibition de l'inflammation (TSLP/SP)

Titre : Mise en place d'un modèle in vitro 3D de dermatite atopique-like réinnervé

Mots clés : dermatite atopique, inflammation neurogène, modèle, neurone, prurit, SKP

Résumé : La dermatite atopique (DA) est une maladie cutanée inflammatoire fréquente. Le prurit est présent chez presque tous les patients et a un impact négatif sur la qualité de vie des personnes touchées et de leur famille. Bien que plusieurs modèles tridimensionnels in vitro imitant la DA soient publiés, aucun ne prend en compte l'inflammation neurogène et le prurit. L'objectif était de développer un modèle humain d'explant cutané réinnervé dans le contexte inflammatoire Th2 de la DA. Les explants de peau humaine étaient réinnervés par des neurones sensoriels primaires dérivés du ganglion de la racine dorsale (DRG) de rats. Le modèle était traité ou non avec un cocktail inflammatoire (interleukine-4/-13, facteur de nécrose tumorale- α et acide polyinosinique - polycytidylique). Dans un deuxième temps, les neurones sensoriels dérivés des SKPs étaient analysés afin d'évaluer leurs capacités à remplacer les neurones issus des DRG. Les explants étaient réinnervés après 5 jours de co-culture.

L'inflammation reproduisait les caractéristiques de la DA au niveau de l'explant cutané. Mais après réinnervation, les marqueurs d'inflammation n'étaient pas augmentés. En ce qui concerne la barrière épidermique, l'expression de la filaggrine n'était pas diminuée dans le contexte inflammatoire après la réinnervation. Les fibres nerveuses protégeaient les kératinocytes et empêchaient l'inflammation et les anomalies de la barrière épidermique. L'absence d'inflammation neurogène secondaire à l'ajout du cocktail inflammatoire semble être due à la nature hétérologue du modèle. Pour surmonter ce biais, nous avons caractérisé les neurones sensoriels dérivés des SKP. Ces SKP présentent les différents marqueurs de la voie de signalisation du prurit de la DA et sont capables de sécréter des neuropeptides. La prochaine étape consiste à confirmer leur capacité à réinventer un explant de peau puis d'ajouter le cocktail inflammatoire et évaluer la présence ou non d'une inflammation neurogène.

Title : Set-up of model in vitro of human atopic dermatitis-like reinnervated

Keywords : Atopic dermatitis, model, neurogenic inflammation, neuron, pruritus, SKP

Abstract : Atopic dermatitis (AD) is a frequent inflammatory skin disease. Pruritus is present in almost all patients and has a negative impact on the quality of life of affected individuals and their families. Although several three-dimensional in vitro models mimicking AD have been published, no one considered neurogenic inflammation and pruritus pathways. Objective was to develop a re-innervated human skin explant in Th2 inflammatory context of AD to improve our knowledge on impact of reinnervation in this context.

Human skin explants were reinnervated by primary sensory neurons derived of dorsal root ganglion (DRG) of rats. Thus, model was treated or not with an inflammatory cocktail (interleukin-4, interleukin-13, tumour necrosis factor- α and polyinosinic-polycytidylic acid). In the second step, sensory neurons derived to SKPs were analyzed to evaluate their capacities to replace DRG.

Human skin explant is reinnervated after 5 days of culture with DRG. Inflammation leads to create hallmarks of AD in skin explant. But after reinnervation, markers of inflammation were not increased. Regarding epidermal barrier, filaggrin expression was not decreased in inflammatory context after re-innervation. Nerve fibers protect keratinocyte and prevent inflammation and disruption of epidermis barrier. The absence of neurogenic inflammation secondary to the addition of the inflammatory cocktail seems to be due to the heterologous nature of the model. To overcome this bias, we have characterized the sensory neurons derived from SKPs. These SKPs present the different markers of the AD pruritus signalling pathway and are capable of secreting neuropeptides. The next step will be to confirm their ability to reinnervate a skin explant.