



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes moléculaires de l'épidermolyse bulleuse simple à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence

Sabrina Martineau

► **To cite this version:**

Sabrina Martineau. Etude des mécanismes moléculaires de l'épidermolyse bulleuse simple à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASQ020 . tel-04631353

**HAL Id: tel-04631353**

**<https://theses.hal.science/tel-04631353v1>**

Submitted on 2 Jul 2024

**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.

# Etude des mécanismes moléculaires de l'Epidermolyse Bulleuse Simple à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence

*Study of the molecular mechanisms of Epidermolysis Bullosa Simplex using  
human pluripotent stem cells*

## Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : Innovation Thérapeutique du Fondamental à l'Appliqué  
Spécialité de doctorat : Physiologie et Physiopathologie  
Graduate School : Life, Science and Health  
Référent : Université d'Evry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des  
maladies monogéniques (I-Stem, Université Paris-Saclay, Inserm), sous la co-direction  
du Professeur **Christine BALDESCHI** et du Docteur **Nathalie HOLIC**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 18 juin 2024, par

**Sabrina MARTINEAU**

## Composition du Jury

Membres du Jury avec voie délibérative

<b>Elisabeth PETIT-TEIXEIRA</b> Professeure, GenHotel, Evry	Présidente
<b>Walid RACHIDI</b> Professeur des Universités, CEA Grenoble UA13, Inserm/CEA/UGA	Rapporteur et Examineur
<b>Dominique SIGAUDDO-ROUSSEL</b> Directrice de recherche, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie thérapeutique	Rapporteuse et Examinatrice
<b>Smail HADJ-RABIA</b> Professeur, Service de dermatologie – Hôpital Necker – Enfants Malades	Examineur
<b>Franck YATES</b> Maître de conférence, CEA, Ecole Sup-Biotech	Examineur



**Titre :** Etude des mécanismes moléculaires de l'Epidermolyse Bulleuse Simple à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence

**Mots clés :** Epidermolyse Bulleuse Simple, Cellules souches humaines induites à la pluripotence, Mécanismes moléculaires, Correction génique (CRISPR/Cas9), Composante inflammatoire

**Résumé :** L'Epidermolyse bulleuse simple (EBS) est une maladie cutanée principalement causée par des mutations dominantes dans les gènes codant les kératines 5 (*KRT5*) ou 14 (*KRT14*). Elle se caractérise notamment par la présence de cloques causées par un décollement de l'épiderme et une inflammation cutanée. D'un point de vue génétique, les mutations vont altérer l'assemblage du réseau de filaments intermédiaires de kératines dans les kératinocytes basaux de l'épiderme et entraîner une cytolysse cellulaire d'où la formation de cloques intra épidermiques. Il n'existe actuellement aucune approche thérapeutique efficace. La compréhension de la maladie et le développement de thérapies, ont été entravés par le manque de modèles cellulaires humains et murins relevant.

Ainsi, l'objectif général de ma thèse a consisté à exploiter les propriétés des cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSc) pour modéliser l'EBS. Dans ce but, nous avons généré des kératinocytes à partir d'hiPSc provenant de patients EBS porteurs de mutations dans le gène *KRT5* (K-EBS), et de patients sains (K-WT). La comparaison des K-EBS et K-WT nous a permis de montrer que les K-EBS récapitulent les principaux phénotypes associés à l'EBS à savoir une diminution de la prolifération cellulaire, une augmentation de la migration cellulaire, une altération des voies de signalisation (ERK et JNK), ainsi que des agrégats de filaments intermédiaires de kératines dans le cytoplasme, tel qu'observé dans les kératinocytes primaires de l'EBS. Ces résultats démontrent que notre modèle cellulaire dérivé d'hiPSc est relevant pour l'étude de l'EBS.

Afin d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires, une analyse transcriptomique comparant les K-EBS aux K-WT, a mis en évidence 138 gènes dérégulés, révélant un enrichissement dans les processus liés à la matrice extracellulaire, au packaging de l'ADN et à la réponse inflammatoire.

La composante inflammatoire dans l'EBS n'ayant été que peu décrite, la suite de mes travaux a consisté à étudier le phénotype cytokinique pro-inflammatoire.

Ainsi, nous avons pu démontrer, une augmentation de l'expression de l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 (CXCL8), CXCL5, CXCL10, CXCL11, CCL5 dans les Ker-EBS, au niveau ARN en condition basale ou stimulée à l'IFN $\gamma$  pour mimer un contexte pro-inflammatoire. Seules les chemokines CXCL10 et CXCL11 sont secrétées à de fortes concentrations dans le surnageant de culture des K-EBS stimulés ou non, démontrant l'implication de ces cytokines dans l'EBS.

En parallèle, afin de s'affranchir des biais notamment dus au fond génétique, au sexe, à l'âge des patients et à l'épigénétique, nous avons généré une lignée de K-EBS isogénique (K-EBS corrigée) par la technique CRISPR-Cas9. Nous avons ainsi pu démontrer que la lignée de K-EBS corrigée montrait une restauration du niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires citées précédemment, à un niveau proche des K-WT, confirmant un lien direct entre les mutations du gène *KRT5* et la signature pro-inflammatoire.

Pour conclure, notre nouveau modèle cellulaire nous a permis de reproduire les phénotypes pathologiques connus dans la littérature et de mettre en évidence une dérégulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'EBS, notamment CXCL10 et CXCL11. Enfin, l'ensemble de ces résultats fait de ce modèle un outil pertinent pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires associés à la pathologie, notamment la composante inflammatoire, ce qui ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques.



**Title :** Study of the molecular mechanisms of Epidermolysis Bullosa Simplex using human pluripotent stem cells

**Keywords :** Epidermolysis Bullosa Simplex, Human induced pluripotent stem cells, Molecular mechanisms, Gene correction (CRISPR/Cas9), inflammatory component

**Abstract :**

Epidermolysis bullosa simplex (EBS) is a skin disorder caused mainly by dominant mutations in genes coding for keratin 5 (*KRT5*) or 14 (*KRT14*) genes. It is characterized by the presence of blisters caused by epidermal detachment, and by other complications such as cutaneous inflammation. From a genetic point of view, the mutations will alter the assembly of the keratin intermediate filament network in basal keratinocytes of the epidermis, leading to cell cytolysis and the formation of intra-epidermal blisters. Currently no effective therapeutic approach it is available. Understanding of the disease and the development of therapies have been hampered by the lack and limitations of relevant human cell and mouse models.

So, the general aim of my thesis was to exploit the properties of human induced pluripotent stem cells (hiPSc) to modelling EBS. For this purpose, we generate hiPSc-derived keratinocytes from EBS patients carrying *KRT5* mutations (K-EBS), and from healthy patients (K-WT). Comparison of K-EBS and K-WT enabled to show that Ker-EBS recapitulates the main phenotypes associated with EBS, namely decreased cell proliferation, increased cell migration, altered signalling pathways (ERK and JNK), as well as aggregates of intermediate keratin filaments in the cytoplasm, as observed in primary EBS keratinocytes. These results demonstrate that our hiPSc-derived cell model is relevant for study EBS.

In order to identify new molecular mechanisms, a transcriptomic analysis comparing K-EBS with K-WT revealed 138 deregulated genes, revealing an enrichment in processes linked to the extracellular matrix, DNA packaging and the inflammatory response. As the inflammatory component in EBS has been poorly described, my next step was to study the pro-inflammatory cytokine phenotype.

Thus, we were able to demonstrate increased expression of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 (CXCL8), CXCL5, CXCL10, CXCL11, CCL5 in K-EBS, at RNA level under basal or IFN $\gamma$ -stimulated conditions to mimic a pro-inflammatory context. Only the chemokines CXCL10 and CXCL11 are secreted at high concentrations in the culture supernatants of stimulated and unstimulated K-EBS, demonstrating the involvement of these cytokines in EBS.

In parallel, in order to avoid biases due to genetic background, gender, patient age and epigenetics, we generated an isogenic K-EBS line (corrected K-EBS) using the CRISPR-Cas9 technique. We were thus able to demonstrate that the corrected K-EBS line showed a restoration of the expression level of the pro-inflammatory cytokines mentioned above, to a level close to that of K-WT, confirming a direct link between mutations in the *KRT5* gene and the pro-inflammatory signature.

In conclusion, our new cellular model enabled us to reproduce the pathological phenotypes known in the literature, and to demonstrate deregulation of pro-inflammatory cytokine expression in EBS, notably CXCL10 and CXCL11. Taken together, these results make this model a relevant tool to allow a better understanding of the molecular mechanisms associated with the pathology, particularly the inflammatory component, paving the way for new therapeutic approaches



# Remerciements

Suite à ces années de thèse que je définirais comme un long chemin rythmé par des cycles continus de hauts et de bas, et ces longues semaines de rédaction qui ont eu l'apparence d'une séance de gainage « intellectuelle » interminable... est arrivé le moment pour moi de remercier grandement toutes ces personnes qui m'ont soutenue et m'ont permis d'atteindre cette ligne d'arrivée tant attendue.

\*\*\*

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse, le **Pr. Walid Rachidi** et le **Dr. Dominique Sigaud-Roussel** pour leur contribution en tant que rapporteurs, ainsi que le **Pr Elisabeth Petit-Teixeira**, le **Dr Franck Yates** et le **Pr Smail Hadj-Rabia** qui ont également jugé ces travaux en tant qu'examineurs.

Je remercie l'école doctorale « **Innovation Thérapeutique du Fondamental à l'Appliqué** » qui m'a permis de bénéficier d'une bourse doctorale, afin de pouvoir réaliser mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier **Marc Pechanski** et **Cécile Martinat**, pour m'avoir accueillie à I-Stem et m'avoir permis à travers mes stages et mon doctorat, d'évoluer dans un environnement scientifique enrichissant et d'autre part de développer une expertise dans le domaine des cellules souches.

Je remercie également mes directrices de thèse, **Christine Baldeschi** et **Nathalie Holic**, pour m'avoir tout d'abord accueillie dès mon stage de M1 au laboratoire, au sein de cette super équipe Génodermatoses, et enfin, m'avoir donné l'opportunité, suite à mon stage de M2, de poursuivre en thèse. **Christine**, merci de m'avoir accordé votre confiance durant de ce long chemin depuis le master. **Nathalie**, merci pour ta confiance, pour ton soutien durant ces années de thèse, et ton aide si importante lors de la rédaction de ce long et fastidieux manuscrit.

Je remercie l'ensemble de cette super **équipe Génodermatoses**, sans qui ces années et ce projet de thèse n'auraient pas été les mêmes : Manoubia, Jennifer, Annabelle, Sophie et Bénédicte !

**Manoubia**, pour tous les moments partagés ensemble, de mon arrivée où tu as dû former une stagiaire de M1 en culture cellulaire (promis je ne suis pas traumatisée des premiers jours, sans calculatrice... !), au M2 que l'on a fait ensemble (c'était une sacrée aventure !), puis jusqu'à la thèse, au cours de laquelle tu as été si importante pour moi. Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide si précieuse, tes nombreux conseils, nos discussions scientifiques (qui sont devenues très enrichissantes au fur et à mesure de mon évolution...), nos moments papotages sur des choses plus personnelles dont le « Projet Maison » qui aura duré une thèse entière (je crois bien que c'est l'année de toutes les fins de projets ... !). Mais surtout, je te remercie d'avoir toujours cru en moi, de toujours avoir su trouver les mots



justes, de m'avoir épaulée dans les moments plus difficiles, et d'avoir tenté jusqu'au bout de me faire prendre confiance en moi.

**Jennifer**, je tiens à te remercier du fond du cœur d'avoir été tant présente à mes côtés durant ces années de thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance très rapidement, jusqu'à me donner la possibilité de prendre en main la génération d'une lignée CRISPR pour un papier qui j'espère pour toi verra le jour bientôt ! Tu as été durant toutes ces années, une personne sur qui je pouvais compter à n'importe quel moment, et ces quelques lignes ne suffiront jamais à te dire à quel point je suis heureuse d'avoir pu croiser ta route, tant d'un point de vue professionnel que personnel, car tu es devenue maintenant bien plus qu'une simple collègue. Tu as été d'un soutien imparable, ton vécu (en thèse je précise... !) t'as permis de me booster quand j'en avais besoin, et d'avoir su trouver les mots pour me permettre de ne rien lâcher ! Je n'oublierai jamais les moments passés ensemble, et bien évidemment, je garde bien précieusement en souvenir ce congrès à Amsterdam... (inoubliable... !). Enfin, je terminerais par te dire que j'espère, dans un futur proche (ou lointain... sait-on jamais), pouvoir continuer à m'épanouir dans la recherche à tes côtés. En attendant, je te souhaite le meilleur !

**Sophie**, pour ton soutien durant ces longues années, et ces petites attentions tout au long de la thèse (oui je n'oublierai surtout jamais ce super cadeau que tu m'as fait lors de la tombola... Ce tee-shirt de l'équipe de France !) qui m'ont beaucoup touché. Tu es une personne avec un cœur immense, pour ça, merci infiniment. Merci également pour ton aide en culture lorsque j'en avais besoin.

**Annabelle**, pour tous les bons moments passés ensemble, et pour ton soutien lors de moments compliqués de la thèse ! Merci pour ton aide et ta grande implication pour ces « rangements azote » qui ont été parfois bien longs... Enfin, merci pour ta bienveillance, et ton rire qui ont bien égayé toutes mes années de thèse !

**Bénédicte**, et oui même si nos chemins se sont croisés il y a de ça seulement quelques mois, je te remercie de m'avoir encouragée et soutenue durant ces longs mois de rédaction. Ça été un immense plaisir de te rencontrer, et de partager des moments ensemble à discuter de tout et de rien (en culture et durant nos pauses « midi »).

**Julien**, bien évidemment que je n'allais pas t'oublier même si tu es parti pour de nouvelles aventures ! Je garde un merveilleux souvenir des moments partagés ensemble dans l'équipe. Et surtout, je te remercie pour ton aide si importante en début de thèse, nos discussions, et tes précieux conseils.

**Marion**, je te remercie pour les échanges que l'on a pu avoir et les conseils que tu as su me donner pour mener à bien et finir cette thèse.

**Manon**, impossible d'oublier ma toute première stagiaire ! Ce fut un immense plaisir d'avoir pu partager ces quelques mois ensemble lors de ton stage de M2. De la crainte d'encadrer quelqu'un (qui en plus je ne connaissais pas) est rapidement venue une sensation de soulagement tant le feeling est tellement bien passé entre nous ! Tu as été une stagiaire en or, qui est devenue rapidement une amie. Tu es une personne remplie de qualités tant personnelles que professionnelles, et je te remercie d'avoir été là pour moi durant ton stage, pour me soutenir dans cette période qui n'a en plus pas été des plus simples (avec tous ces problèmes de milieux... !). Je te souhaite de belles choses pour la suite !

**Eren**, déjà 5 ans que la vie a mis sur mon chemin une personne en or comme toi ! D'un simple collègue à I-Stem il y a maintenant 5 ans, tu es rapidement devenu bien plus que ça. Mon meilleur ami, mon confident... Notre amitié était tout simplement une évidence. Je te remercie du plus profond de mon cœur pour tout ce que tu as fait pour moi, pour nos moments potins, pour les innombrables conseils que tu as su me donner à chaque fois que je venais te voir en détresse pour « un café », évidemment pour nos pauses café qui étaient pour moi les moments les plus radieux de chacune de mes journées au laboratoire, pour nos fous rires à ne plus en finir... Je garde en souvenir tant de moments passés ensemble, que ça soit au laboratoire, à la soirée Téléthon sur le plateau télé, à nos virées shopping, à nos sorties ensemble, à nos resto (oui qu'est-ce qu'on aime manger...), la liste serait tellement longue que je vais m'arrêter là... En tout cas, ces moments hors du temps sont si précieux ! Saches que tu as été, tu es et tu resteras toujours si important pour moi ! Je ne te remercierai jamais assez d'avoir été présent pour moi depuis mes débuts dans la recherche, pour toutes les attentions envers moi, de m'avoir soutenue, mais surtout d'être la personne que tu es ! Je terminerais par notre phrase à nous... « Je t'aime beaucoup & tout entre nous »

La Team des L5, **Laurine, Tatiana, Céline, Thifaine et Camille**, je vous écris ces quelques mots pour vous remercier pour tous ces moments passés ensemble ! Vos fous rires, vos délires où parfois je n'avais pas les « réfs » (je crois que je me suis fait vieille au cours de ces années de thèse... !) m'ont bien fait rire et ont grandement égayé ces longues années ! Vos petites attentions, notamment le jour de mes 30 ans (pour m'aider à passer le cap !) m'ont beaucoup touchée. Vous êtes des filles et une Team en or ! **Tatiana**, je te remercie d'avoir été d'une grande aide pour moi durant les années de Master et de m'avoir soutenue dans cette aventure qu'a été cette thèse. **Laurine**, d'une stagiaire de M2 arrivée dans l'équipe, tu es rapidement devenu une amie. Je te remercie pour tous les moments que l'on a partagés ensemble, j'en garde un merveilleux souvenir ! Enfin, je vous souhaite à toutes plein de belles choses tant personnellement que professionnellement, et j'espère que cette fin de thèse n'est qu'un « au revoir » et que nous resterons bien évidemment en contact !

**Axel**, et oui qui l'aurait cru, est enfin arrivé ce moment de l'écriture des remerciements ! Et impossible que tu passes à la trappe. Copain de galère de thèse ! Ces années de thèse à tes côtés, à se serrer les coudes mutuellement ont été bien chouettes ! Je te remercie d'avoir cru en moi jusqu'au bout, de toujours avoir été de bon conseil, et d'avoir été d'un grand soutien, même après ton départ Dr. SCIAUVAUD ! Je te souhaite le meilleur dans ta vie perso et professionnelle, tu le mérites tant. En attendant, j'espère te revoir très vite pour boire un verre entre « Docteur » (je l'espère) !

**Michel**, je garde un merveilleux souvenir de nos discussions en BM, lorsque je campais à ma paillasse « Gel Red » ! Je tiens à te remercier pour tes nombreux conseils (Mr. CRISPR !) et de toujours avoir eu des mots gentils envers moi, d'avoir cru en mes capacités bien que je n'y croyais pas moi-même, depuis mon arrivée au laboratoire en stage de M1, jusqu'à cette fin de thèse. Est bientôt venu pour toi le temps de quitter la paillasse et de profiter pleinement de ta retraite tellement méritée ! Je te souhaite plein de belles choses.

**Pascal**, mon binôme de Bonbons, merci pour ton humour et ta bonne humeur ! Merci d'avoir gentiment ré approvisionné les stocks de bonbons à mon bureau tout au long de ma thèse, pour me permettre de toujours avoir un carburant « sucre » à disposition pour tenir jusqu'au bout ! Plus sérieusement, soyons pro... Je te remercie évidemment pour m'avoir aidée pour les « transfections au Neon » lorsque j'en avais besoin !

**Azania**, je n'allais quand même pas t'oublier et ne pas t'écrire un petit mot ! Je tiens à te remercier pour tes petits mots d'encouragement chaque fois que nos chemins se croisaient. Mais surtout, à mon tour de te donner la force, la motivation et le courage de terminer cette thèse... Le chemin est long mais l'arrivée n'en sera que plus belle, et je serai à tes côtés pour te soutenir jusqu'à ce jour ! Tiens bon !

**Céline**, tout fraîchement jeune maman ! Je te remercie pour tous ces moments passés ensemble, pour tous tes conseils lorsque j'en avais besoin, pour ton soutien tout au long de ma thèse. Je te souhaite tout plein de bonheur en famille, avec ta petite puce. Et à très vite au laboratoire ou ailleurs !

Enfin, je remercie l'**ensemble des personnes d'I-Stem**. Je tiens à remercier les nombreuses plateformes (HCS, HTS, NGS, Bioproduction et Biologie Cellulaire). **Margot**, je te remercie pour le temps que tu m'as consacré lorsque j'ai eu besoin d'avantage d'explication sur le séquençage. **Céline L**, je te remercie pour ton aide et ta patience lorsque mes analyses de Scratch wound m'en faisaient un peu baver... **Jérôme**, je tiens à te remercier pour le temps que tu as pris pour m'aider au confocal lorsque j'en avais besoin, mais également pour l'analyse que tu avais très gentiment accepté de me faire lors d'une manip de « puce à protéines ! ». **Karine et Lina**, je vous remercie pour votre implication et votre aide tout au long de ma thèse pour les contrôles qualités SNP de mes nombreuses lignées et clones CRISPR ! **Léa**, je te remercie de m'avoir formée et aidée en cytométrie durant ma thèse. Je te souhaite plein de bonheur pour les nouvelles aventures qui t'attendent.

**Lola**, ma meilleure amie que la vie a mise sur mon chemin lors de notre année de L1 en biologie ! Depuis notre rencontre en 2013, où l'on a partagé une année ensemble à la fac, une amitié et un lien indestructible se sont construits entre nous. Je suis convaincue que la vie ne nous a pas mis par hasard sur le même chemin, ta maman et mon Pépé y ont je pense grandement contribué... Et je te fais la promesse d'être près de toi pour toujours ! Je te remercie du plus profond de mon cœur d'avoir été et de toujours être à mes côtés à chaque moment de ma vie, d'avoir été d'un soutien si important durant cette thèse et de m'avoir fait un si beau cadeau, celui de devenir « Tata Sabri » de ma petite princesse Janah. Encore merci pour tout.

**Ma famille**, mon pilier sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Je vous dois tout, vous êtes ce qu'il y a de plus important à mes yeux et dans mon cœur. Mes débuts à la fac n'étaient pas gagnés, avec cette année de STAPS, puis ma ré orientation en biologie avec ces longues années de licence, remplies d'échecs et de doute et la peur de vous décevoir... et pourtant, vous m'avez toujours épaulée dans chacun de mes choix, soutenue et pour ça je ne vous remercierai jamais assez. Après une licence, puis un Master, m'ait venue la folle idée de commencer une thèse, et cette persévérance je vous la dois ! J'ai une chance inouïe et je suis si fière d'avoir des parents et une sœur comme vous si vous saviez. **Papa et maman**, je vous remercie du plus profond de mon cœur pour tout ce que vous avez fait et ce que vous faites pour moi à chaque instant de ma vie, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir tant soutenue dans les moments difficiles de cette thèse. Si j'en suis ressortie grandie et que je suis épanouie aujourd'hui, c'est tout simplement grâce à vous. Vous êtes des parents exceptionnels que tout le monde rêverait d'avoir, et je mesure la chance immense que j'ai de vous avoir près de moi à chaque instant. Je vous aime du plus profond de mon cœur.

**Soeurette**, mon mini moi, mon tout, ma confidente, je te remercie d'être la petite sœur si extraordinaire que tu es. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait et ce que tu fais pour moi, pour tous les moments que tu passes à me rassurer et à me soutenir. Tu es mon petit rayon

de soleil, j'ai tout simplement tellement de chance de t'avoir. Et surtout je suis heureuse de te voir épanouie, dans la vie et dans ce nouveau travail « Madame la professeur » ! Je t'aime tellement fort, du plus profond de mon cœur.

**Cyrille**, merci d'avoir également été là depuis les débuts, jusqu'à ces années de thèse.

**Mon relou**, l'homme qui partage m'a vie depuis plus de 6 ans. Ces remerciements et ces quelques lignes ne suffiraient pas pour te dire tout ce que je voudrais mais je te remercie du plus profond de mon cœur d'être là, de me soutenir, depuis la fin de ma 2<sup>ème</sup> année de licence... Tu m'as soutenue, épaulée, et surtout tenu bon à mes côtés durant ces longues années de thèse qui ont été de sacrées montagnes russes. Merci pour tout l'amour que tu m'apportes au quotidien, pour ta patience, ta gentillesse, tes attentions, ton écoute, et bien plus encore. Merci d'être qui tu es et de faire partie de ma vie. Après cette thèse, une page se tourne et de nouvelles aventures nous attendent... J'ai si hâte. Je t'aime du plus profond de mon cœur.

**Sara**, ma super belle-fille, et oui je n'allais quand même pas oublier de t'écrire un petit mot ! Je te remercie d'avoir été là aussi à me supporter et à me soutenir durant toutes ces années. Merci d'être qui tu es, et je te souhaite encore un peu de courage pour finir en beauté ces années lycées et décrocher ton bac !

**Ma Mémé**, ma grand-mère, je te remercie pour tout ce que tu m'apportes, pour ta tendresse, tes mots doux, ton soutien, et la fierté que je vois dans tes yeux lorsque je te parle de la biologie, de mes recherches et de la thèse... Merci pour tout, merci pour les valeurs si importantes que tu m'as transmises à moi, Sam et mes cousines, avec Pépé, pour faire de nous ce que l'on est aujourd'hui. Ma Mémé, je t'aime si fort.

**Mon Pépé**, mon exemple, ma force et ma motivation au quotidien. Il y a déjà bientôt 11 ans, seulement quelques jours après t'avoir annoncé que j'avais été acceptée en licence de biologie, ce foutu cancer t'as arraché à nous. Depuis ce jour, la douleur ne s'apaise pas mais je me suis fait la promesse de ne rien lâcher, et d'un jour je te le promets, de contribuer aux recherches sur le cancer. Même si tu n'es plus là pour le lire ou l'entendre, je te remercie du plus profond de mon cœur pour tout ce que tu as fait pour moi pendant des années, pour toutes les valeurs que tu m'as transmises, avec Mémé. Ton courage, ta persévérance, ta force, seront tout au long de ma vie ma motivation pour ne jamais rien lâcher, je te le promets. Il n'y a pas un jour sans que je pense à toi. Je t'aime du plus profond de mon cœur.

Enfin, je te dédie ce manuscrit mon Pépé. Même si tu n'es plus là pour le voir, j'espère te rendre fière.

« Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis »



# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>7</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>13</b>
<b>Index des figures</b> .....	<b>17</b>
<b>Index des tableaux</b> .....	<b>19</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 : La peau</b> .....	<b>25</b>
I. Généralités .....	25
A. Fonctions de la peau.....	25
B. Structure de la peau .....	26
C. Composition cellulaire, organisation structurale et fonctionnelle de l'épiderme .....	27
a) La couche basale ( <i>Stratum basale</i> ).....	29
b) La couche épineuse ( <i>Stratum spinosum</i> ).....	29
c) La couche granuleuse ( <i>stratum granulosum</i> ).....	30
d) La couche cornée ( <i>Stratum corneum</i> ) .....	30
D. La jonction dermo-épidermique.....	31
a) La membrane plasmique et plaques hémidesmosomales .....	32
b) La lamina lucida .....	33
c) La lamina densa .....	33
d) La zone fibrillaire .....	33
II. Kératines dans les kératinocytes épidermiques.....	33
A. Expression des gènes de kératines.....	33
B. Structure des kératines de type I et II .....	35
C. Filaments intermédiaires de kératines.....	37
a) Assemblage des filaments intermédiaires de kératines.....	37
b) Fonctions des filaments intermédiaires de kératines .....	38
<b>Chapitre 2 : Epidermolyse Bulleuse Simple</b> .....	<b>39</b>
I. Généralités .....	39
A. Manifestations génétiques et cliniques de l'EB .....	39
a) Epidermolyse Bulleuse Dystrophique (EBD).....	41
b) Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle (EBJ) .....	42
c) Syndrome de Kindler .....	42
d) Epidermolyse Bulleuse Simple (EBS) .....	43
II. Epidermolyse Bulleuse Simple.....	43

A.	Description clinique des formes les plus courantes d'EBS .....	43
a)	Epidermolyse Bulleuse simple – Localisée .....	44
b)	Epidermolyse Bulleuse simple – Généralisée intermédiaire .....	45
c)	Epidermolyse Bulleuse simple – Généralisée sévère .....	45
d)	Epidermolyse Bulleuse Simple – Avec pigmentation marbrée .....	46
B.	Diagnostic et modes de transmission.....	46
III.	Mutations causant l'EBS.....	46
A.	Mutations <i>KRT5</i> et <i>KRT14</i> .....	47
B.	Corrélation génotype-phénotype.....	48
IV.	Modèles d'études de l'EBS .....	51
V.	Mécanismes moléculaires et cellulaires associés à l'EBS .....	53
A.	Conséquences cellulaires et moléculaires liées aux mutations <i>KRT5</i> et <i>KRT14</i> .....	56
a)	Agrégats de kératines.....	56
b)	Altération de l'expression des protéines de jonction (au niveau de la JDE) .....	59
c)	Composante inflammatoire.....	59
d)	Altération des voies de signalisation .....	62
VI.	Stratégies thérapeutiques .....	62
A.	Approches symptomatiques.....	64
a)	Pansements .....	64
b)	Thérapie cellulaire .....	65
B.	Etudes visant à corriger les phénotypes cellulaires et moléculaires de l'EBS.....	65
1.	Thérapies ciblant l'ADN .....	66
2.	Thérapies ciblant l'ARN .....	67
3.	Thérapies basées sur l'utilisation de petites molécules pharmacologiques .....	68
a)	Protéines chaperonnes.....	69
b)	Inhibiteurs de voies de signalisation .....	69
c)	Thérapie ciblant les marqueurs inflammatoires .....	71
d)	Autres composés .....	72
	<b>Chapitre 3 : Cellules souches.....</b>	<b>75</b>
I.	Cellules souches .....	75
II.	Cellules souches pluripotentes humaines.....	77
A.	Les cellules souches embryonnaires .....	77
a)	Historique .....	77
b)	Origine des cellules souches embryonnaires humaines.....	78
c)	Lois de bioéthique et réglementation relatives à l'utilisation des hESC .....	79
B.	Les cellules souches induites à la pluripotence.....	80

a)	Génération d'iPSc .....	80
b)	Choix des facteurs de transcription pour la reprogrammation.....	82
c)	Délivrance des facteurs de transcription.....	83
d)	Choix de la cellule pour la reprogrammation.....	85
e)	Lois de bioéthique et réglementation relatives à l'utilisation de hiPSc .....	85
III.	Propriétés des cellules souches pluripotentes humaines .....	86
A.	Maintien de la pluripotence .....	86
a)	Facteurs clés .....	86
b)	Réseaux de signalisation régulant la pluripotence.....	87
c)	Conditions de culture des CSP humaines .....	89
d)	Caractéristiques moléculaires et contrôles qualités .....	90
B.	Potentiel de différenciation des iPSc.....	91
a)	Généralités .....	91
b)	Différenciation des CSP en cellules de la peau.....	93
c)	Contrôles qualités des kératinocytes dérivés de CSP.....	95
C.	Les CSP et leurs applications .....	96
a)	Modélisation pathologique .....	97
b)	Développement de médicaments .....	98
c)	Thérapie cellulaire .....	99
IV.	CSP et technologies d'édition du génome.....	100
A.	ZFN et TALEN .....	101
B.	Origine du système CRISPR-Cas.....	102
C.	Système CRISPR/Cas9 et édition du génome .....	104
a)	Constituants et mécanisme d'action du système d'édition CRISPR/Cas9.....	104
b)	Deux mécanismes de réparation de l'ADN double brin .....	106
c)	Limitations du système CRISPR/Cas9 .....	107
D.	Base Editing et Prime Editing.....	108
	<b>Problématique et démarches expérimentales .....</b>	<b>113</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>114</b>
	Partie 1 : .....	115
	Article de Recherche .....	115
	« Les kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines, un modèle utile pour identifier et explorer les phénotypes pathologiques de l'Epidermolyse bulleuse simple » .....	115
	Partie 2 : .....	143
	« Génération d'une lignée isogénique de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS, par la technologie CRISPR/Cas9 ».....	143



Partie 3 : .....	163
« Etude du phénotype cytokinique pro-inflammatoire dans l'EBS » .....	163
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>181</b>
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>191</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>205</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>207</b>

# Index des figures

Figure 1 : Structure de la peau .....	27
Figure 2 : Histologie et structure de l'épiderme .....	28
Figure 3 : La jonction dermo-épidermique .....	32
Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation structurale du domaine polypeptidique de kératine .....	35
Figure 5 : Mécanisme d'assemblage de filaments intermédiaires de kératines .....	37
Figure 6 : Représentation schématique de la structure et des zones touchées dans l'Epidermolyse bulleuse (EB) .....	40
Figure 7 : Représentation schématique du réseau de filaments intermédiaires de kératines (K5/K14) .....	48
Figure 8 : Diagramme schématique montrant la distribution des variations d'acides aminés identifiées, causées par des mutations au sein de gènes KRT5 et KRT14 et leur emplacement au sein du polypeptide respectif K5 et K14. ....	49
Figure 9 : Conséquences morphologiques des mutations KRT5 ou KRT14 .....	50
Figure 10 : Agrégats de kératines, dans une biopsie de patient EBS-DM .....	56
Figure 11 : Modèles de souris transgéniques et mise en évidence d'agrégats de kératines.....	57
Figure 12 : Formation d'agrégats dans les kératinocytes immortalisés EBS, après stress thermique, osmotique ou mécanique.....	58
Figure 13 : Marqueurs pro-inflammatoires détectés dans des souris K5 -/- .....	60
Figure 14 : Marqueurs pro-inflammatoires détectés dans des kératinocytes EBS immortalisés et fluides de bulles de patients EBS .....	61
Figure 15 : Hiérarchie des types de cellules souches et leur potentiel de différenciation .....	76
Figure 16 : Premiers stades du développement embryonnaire humain .....	78
Figure 17 : Représentation schématique de l'obtention des hiPSC .....	81
Figure 18 : Méthodes de vectorisation pour la reprogrammation de cellules somatiques .....	83
Figure 19 : Réseau de régulation génique de la pluripotence.....	86
Figure 20 : Voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement des CSP.....	88
Figure 21 : Différenciation guidée des CSP .....	92
Figure 22 : Différentes applications des cellules souches pluripotentes.....	96
Figure 23 : Principales classes de nucléases programmables .....	101

<b>Figure 24 : Schéma de la réponse immunitaire adaptative bactérienne médiée par le système CRISPR/Cas</b> .....	103
<b>Figure 25 : Schéma du mécanisme moléculaire du système CRISPR/Cas9</b> .....	105
<b>Figure 26 : Technologie du Base Editing (Exemple : Adénine Désaminase)</b> .....	108
<b>Figure 27 : Représentation schématique de la technologie Prime Editing</b> .....	110
<b>Figure 28 : Elaboration de lignées isogéniques, grâce à l'utilisation de technologies d'édition du génome</b> .....	112

# Index des tableaux

<b>Tableau 1 : Protéines kératiniques de type I et II</b> .....	34
<b>Tableau 2 : Classification des formes d'Epidermolyse Bulleuse</b> .....	41
<b>Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des 4 sous-types d'EBS les plus courants</b> .....	44
<b>Tableau 4 : Classification des différents formes d'EBS, et les gènes impliqués</b> .....	47
<b>Tableau 5 : Vue d'ensemble des différents modèles d'études de l'EBS (murins et humains) et les phénotypes mis en évidence</b> .....	54
<b>Tableau 6 : Vue d'ensemble des études in vitro et in vivo sur des modèles murins ou humains</b> .....	63
<b>Tableau 7 : Listes de différents protocoles utilisant des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ou des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSc) pour la différenciation en kératinocytes (2D ou 3D)</b> .....	94
<b>Tableau 8 : Lignées d'hiPSc pertinentes pour l'étude de troubles cutanés</b> .....	98



# Abréviations

**ABE** : Adenine base editor / Adénine désaminase  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNg** : Acide désoxyribonucléique génomique  
**Akt** : Protéine kinase B  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNg** : ARN guide  
**ARNm** : Acide ribonucléique messenger  
**BMP4** : Protéine morphogénétique osseuse 4 / Bone morphogenetic protein 4  
**BTX** : Toxine botulique  
**Cas9** : CRISPR-associated protein 9  
**Cas9-ABE** : Cas9 fusionnée à l'ABE  
**C-Myc** : Myelocytomatosis oncogene  
**CRISPR/Cas9** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR-associated protéine 9  
**CSP** : Cellules Souches Pluripotentes  
**dCas9** : dead Cas9  
**DDEB** : Dominante Dystrophic Epidermolysis Bullosa  
**DEG** : Differentially expressed genes / Gènes différenciellement exprimés  
**DPI** : Diagnostic préimplantatoire  
**DSB** : Double-strand break / Cassure double brin  
**EB** : Epidermolyse Bulleuse  
**EBD** : Epidermolyse Bulleuse Dystrophique  
**EBJ** : Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle  
**EBS** : Epidermolyse Bulleuse Simple  
**EBS-gen** : EBS généralisée  
**EBS-gen sev** : EBS généralisée sévère  
**EBS-loc** : EBS localisée  
**EGFR** : Epidermal growth factor receptor  
**ERK** : Extracellular signal-regulated kinases  
**ESC** : Embryonic stem cell  
**eSpCas9** : Enhanced specificity SpCas9  
**FDA** : Food and Drug Administration  
**FGF2** : Fibroblast growth factor 2  
**FGFR** : Fibroblast growth factor receptors  
**FT** : Facteur de transcription  
**GO** : Gene Ontology  
**hCSP** : Cellules souches pluripotentes humaines  
**HD** : Hémidesmosomes  
**HDR** : Homology-direct repair  
**HEK** : Human Epidermal Keratinocytes  
**hESC** : human embryonic stem cell  
**hiPsc** : human induced pluripotent stem cell / cellules souches humaines induites à la pluripotence  
**HTS** : High Throughput Screening  
**IFN $\gamma$**  : Interferon gamma  
**Indels** : Insertions-Délétions  
**iPSc** : Induced pluripotent stem cell  
**ITGA4** : Integrin Subunit Alpha 4  
**ITGA6** : Integrin Subunit Alpha 6

**JAK/STAT** : Janus kinase/signal transducer and activator of transcription  
**JDE** : Jonction dermo-épidermique  
**JNK** : c-jun N-terminal kinase  
**K4** : Kératine 4  
**K5** : Kératine 5  
**K14** : Kératine 14  
**KEB** : Kindler epidermolysis bullosa  
**K-EBS** : Kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS  
**KIF** : Filaments intermédiaires de kératines  
**KRT4** : Gène codant la kératine 4  
**KRT14** : Gène codant la kératine 14  
**KRT5** : Gène codant la kératine 5  
**K-WT** : Kératinocytes dérivés d'hiPSc WT  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases  
**MCI** : Masse cellulaire interne  
**mFISH** : Hybridation fluorescente in situ  
**mTOR** : Mammalian target of rapamycin  
**nCas9** : nickase Cas9  
**NHEJ** : Non-homologous end joining  
**NLS** : Nuclear localization sequence  
**NT** : Non traité  
**OCT4** : Octamer-binding transcription factor 4  
**OFT** : Off-Target / Effet hors cible  
**PAM** : Protospacer Adjacent Motif  
**PCA** : Principal component analysis  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**pegRNA** : prime editing guide RNA  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase  
**PKA** : protein kinase A  
**PKC** : protein kinase C  
**RA** : Acide rétinoïque  
**RDEB** : Recessive dystrophic epidermolysis bullosa  
**RNA-Seq** : Séquençage de l'ARN  
**RNP** : Ribonucléoprotéine  
**RT-qPCR** : Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction  
**siRNA** : Small interfering RNA  
**SMaRT** : Trans-épissage d'ARN médié par spliceosome  
**SNP** : Single nucleotide polymorphisms  
**SpCas9-HF1** : Specificity Cas9 High fidelity  
**SSEA3** : Stage Specific Embryonic Antigen 3  
**SSEA4** : Stage Specific Embryonic Antigen 4  
**ssODN** : oligodéoxynucléotide simple simple / matrice de réparation  
**TALEN** : Transcription Activator-Like Effector Nucleases  
**TGFβ** : Transforming Growth Factor beta  
**TMAO** : Triméthylamine-N-oxyde  
**TNFα** : Tumor necrosis factor alpha  
**TRA1-60** : Tumor-related antigen 60  
**TRA1-81** : Tumor-related antigen 81

**TracrRNA** : Trans-activating CRISPR RNA

**WT** : Wild-Type / Sauvage

**ZFN** : Zinc Finger Nucléases

**4-PBA** : 4-Phenylbutyric acid





# Chapitre 1 : La peau

## I. Généralités

### A. Fonctions de la peau

La peau, appelée aussi tégument (du latin tegumentum, couverture), est l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain, avec une surface estimée entre 1,5 et 2 m<sup>2</sup> et un poids d'environ 10-15% du poids total d'un individu. Bien que d'apparence inerte, ce revêtement à l'interface entre notre environnement et nos organes internes, est en renouvellement permanent pour nous protéger contre les agressions extérieures, physiques, chimiques et infectieuses. En effet, par sa solidité, son élasticité et sa cohésion, la peau est le siège de nombreuses fonctions :

- Elle sert de barrière physique contre les agressions mécaniques pouvant se produire, mais également de barrière chimique et immunologique permettant la protection contre les produits chimiques toxiques, les rayons ultraviolets, les infections et invasions de micro-organismes pathogènes.
- Elle joue un rôle dans la régulation thermique et hydrique (Chaplin et al. 2013). Grâce à une fonction vasomotrice et de sudation, elle permet une régulation de la température corporelle et permet d'éviter une déshydratation excessive du corps, en limitant les échanges gazeux avec l'extérieur.
- Dotée de fibres nerveuses associées à des mécanorécepteurs (mouvement des poils) et nocicepteurs, la peau assure également une fonction sensorielle, en transmettant des informations au système nerveux central.
- D'autre part, la peau joue un rôle dans la fonction métabolique et de stockage. Grâce à l'action des UV, elle permet la conversion du cholestérol, précurseur de la vitamine D (provitamine D3) qui sera ensuite métabolisé par le foie pour obtenir la forme active de la vitamine D (calcitriol) qui intervient notamment dans l'homéostasie calcique, la prolifération et la différenciation cellulaire et l'inflammation.

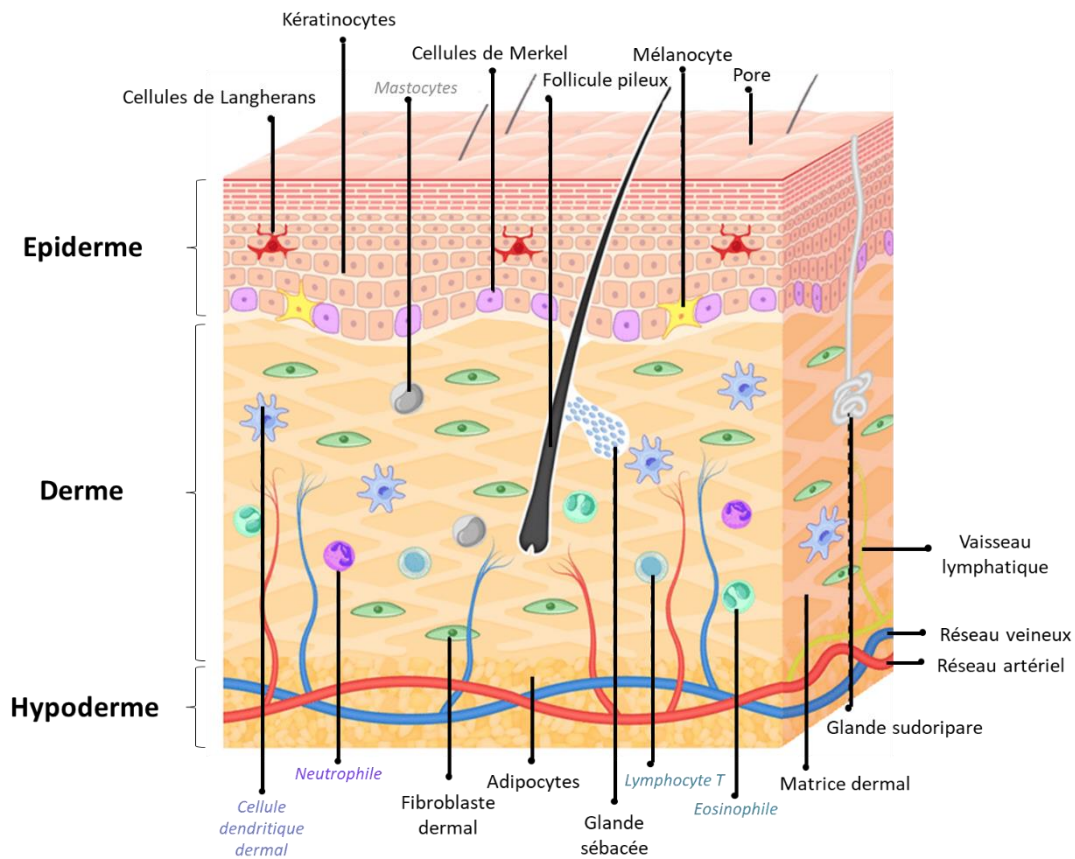
## B. Structure de la peau

D'un point de vue structural, la peau est composée de trois compartiments à la fois distincts par leur composition et fonction (figure 1), mais étroitement liés entre eux, qui sont de la profondeur à la superficie :

- **L'hypoderme**, couche la plus interne, est un tissu sous-cutané conjonctif lâche et spongieux constitué principalement de cellules graisseuses (adipocytes), et traversé par des nerfs et vaisseaux sanguins. Il représente la réserve énergétique du corps (par le stockage des graisses) ainsi que l'isolant thermique et physique. Il sert également d'interface entre les organes, les os, les muscles et les autres couches cutanées.
- **Le derme**, est un tissu conjonctif reliant l'hypoderme à l'épiderme. Ce tissu est un réseau complexe constitué principalement de fibroblastes dermiques qui sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire dense, telles que le collagène (de type I et III), l'élastine, les glycoprotéines (fibronectines, ténaescines) et protéoglycanes, (acide hyaluronique, versin, décorine), qui permettent d'assurer une fonction de soutien, de conférer souplesse et résistance à la peau mais également de contribuer à l'hydratation et à la viscosité des tissus (Sorrell, Baber, and Caplan 2004).

De plus, contenant également un important réseau vasculaire et lymphatique et une riche innervation, le derme assure la nutrition de l'épiderme par diffusion. Au-delà de ce rôle nutritif, le derme est composé de glandes sudoripares, de glandes sébacées, ainsi que des follicules pileux, et un vaste réseau de cellules circulantes qui assurent la surveillance immunitaire et jouent un rôle dans la cicatrisation cutanée (Weng et al. 2020).

- **L'épiderme**, épithélium squameux, pluristratifié, kératinisé, innervé et non vascularisé, est constitué en majorité de kératinocytes (80 à 90% de la population cellulaire). La fonction principale de l'épiderme est d'assurer l'intégrité du tissu, en jouant un rôle de barrière entre l'organisme et l'environnement extérieur.



**Figure 1 : Structure de la peau**

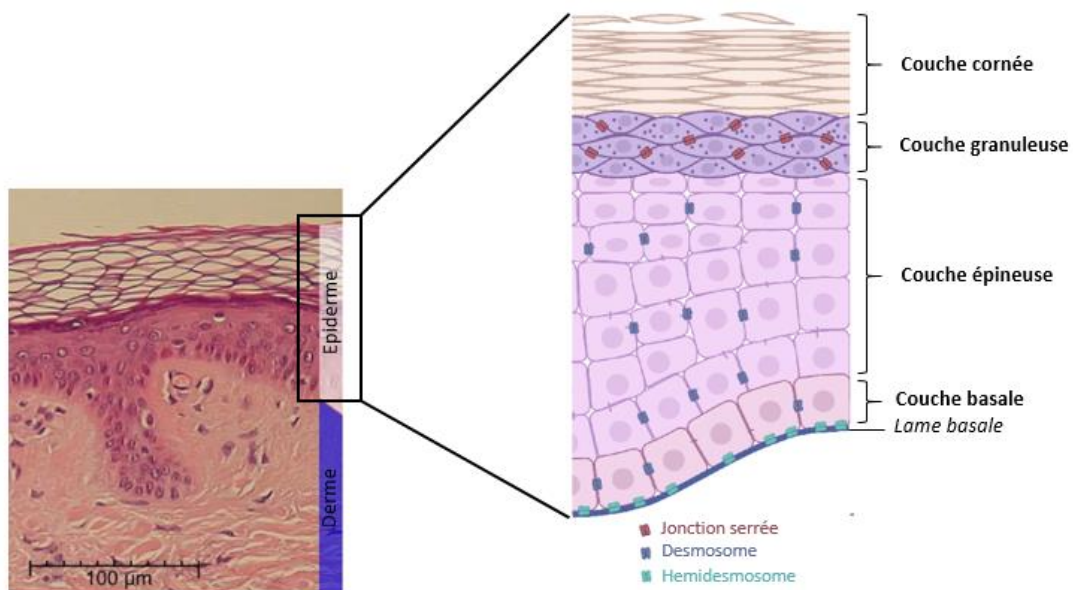
La peau est composée de trois couches superposées, ayant chacune des fonctions et une structure qui leurs sont propres. De la superficie à la profondeur : l'épiderme, constitué de cellules épithéliales disposées en couches superposées ; le derme, contenant du tissu conjonctif dense et irrégulier ; l'hypoderme, composé principalement de tissus adipeux.

*Adapté de (Soheilifar et al. 2022)*

### C. Composition cellulaire, organisation structurale et fonctionnelle de l'épiderme

Issu du feuillet ectodermique, l'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau dont l'épaisseur varie en fonction de sa localisation anatomique (de 50µm pour le visage à 500µm pour le bout des doigts) (Prost-Squarcioni 2006).

Sa structure pluristratifiée est liée à la différenciation cellulaire progressive des kératinocytes de la couche **basale**, à la couche **granuleuse**, puis à la couche **épineuse** et à la couche **cornée**, en trois à quatre semaines, pour être éliminée par le processus de desquamation (Blanpain and Fuchs 2009) (figure 2).



**Figure 2 : Histologie et structure de l'épiderme**

L'épiderme est un épithélium stratifié composé de quatre couches différentes. La stratification est liée au niveau de différenciation des kératinocytes : la couche basale contient les kératinocytes prolifératifs responsables du renouvellement permanent du tissu ; lorsque ces kératinocytes cessent de proliférer, ils s'engagent dans un processus de différenciation, et migrent vers les couches supérieures de l'épiderme où ils forment respectivement les couches : épineuse, granuleuse et cornée.

Adapté de (Leikeim 2022)

Enfin, chaque couche est définie par des caractéristiques morphologiques et biochimiques qui indiquent son état de différenciation cellulaire et permettent d'assurer de multiples fonctions à travers les types cellulaires qui les composent (Bikle, Xie, and Tu 2012) (Baroni et al. 2012).

a) La couche basale (*Stratum basale*)

La couche basale, également connue sous le nom de couche *germinativu*, est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est constituée d'une couche unique de kératinocytes basaux, nucléés et polarisés de formes cylindriques ou cubiques, importante dans la régénération du tissu épidermique. Ces cellules prolifératives se divisent de façon asymétrique, donnant naissance à une cellule souche permettant le maintien de kératinocytes indifférenciés dans la couche basale, et à une seconde cellule qui se différencie en kératinocytes de la couche épineuse, et qui va ainsi pousser progressivement les cellules de la couche basale vers la surface de l'épiderme (Rousselle, Braye, and Dayan 2019). A ce stade de différenciation, les kératinocytes basaux de l'épiderme expriment la kératine 5 et la kératine 14, formant un réseau de filaments intermédiaires, élément essentiel du cytosquelette. En effet, ces kératines jouent un rôle majeur dans l'intégrité structurale de l'épiderme, d'une part en se liant aux hémidesmosomes pour assurer un ancrage solide des kératinocytes à la membrane basale, et d'autre part en reliant solidement les kératinocytes latéraux et supérieurs adjacents via les desmosomes.

En plus des kératinocytes, on retrouve également au sein de cette couche basale, deux autres types cellulaires principaux : 1) les mélanocytes (représentant 5 à 10%) ont pour rôle de pigmenter la peau et de protéger l'organisme des rayons UV. Les pigments de mélanine produit par les mélanocytes, sont transférés aux kératinocytes adjacents, permettent ainsi de protéger l'ADN de ces cellules aux expositions ionisantes (rayonnements UVA et B) ; et 2) Les cellules de Merkel, qui possèdent des dendrites leur permettant de communiquer avec les cellules de Langerhans et les cellules basales. En réponse à une stimulation, elles transmettent des signaux aux fibres nerveuses grâce à la formation de synapses chimiques et à la libération de neurotransmetteurs, participant ainsi au sens du toucher.

b) La couche épineuse (*Stratum spinosum*)

La couche épineuse est constituée de cinq à dix strates de kératinocytes qui ne se divisent plus mais subissent des changements morphologiques et biochimiques.

De forme polygonale dans les premières couches, ces kératinocytes acquièrent une morphologie de plus en plus aplatie au fur et à mesure de leur différenciation lorsqu'ils migrent vers la surface. Au cours de ce processus de différenciation, l'expression des kératines 1 et 10 dans le cytoplasme des kératinocytes vient en remplacement de celles des kératines 5 et 14 (Fuchs and Green 1980) (Haines and Lane 2012). Ces kératines sont essentielles à la formation de desmosomes, formant de nombreux ponts intercellulaires afin de relier fortement les cellules entre elles. Lorsque la membrane plasmique des kératinocytes rétrécit légèrement, les jonctions proéminentes entre les cellules apparaissent comme des « épines », d'où le nom de couche épineuse.

Au sein de cette couche sont également retrouvées les cellules de Langherans, cellules dendritiques immatures, caractérisées *in situ* par la présence d'extensions cytoplasmiques fines et longues qui s'étendent entre les kératinocytes. Ces cellules présentatrices d'antigènes permettent de déclencher une réponse immunitaire en captant et en présentant les antigènes cutanés aux lymphocytes T (Kissenpfennig et al. 2005 ; Romani et al. 1989).

c) La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

La couche granuleuse est la dernière couche nucléée de l'épiderme. Elle se compose d'une à cinq strates de kératinocytes aplaties, parallèlement disposées sur la couche épineuse. Ces kératinocytes sont caractérisés par la présence dans leur cytoplasme, de nombreux grains cytoplasmiques nommés : granules de kératohyaline. Celles-ci sont majoritairement composées de pro-filaggrine (précurseur de la filaggrine), mais contiennent également des protéines telles que la loricine, et l'involucrine.

La maturation de la pro-filaggrine en filaggrine (**filament aggregation protein**) par protéolyse intervient lors de la transition de la cellule granuleuse vers la couche cornée, et constitue ainsi un marqueur des kératinocytes parvenus au stade terminal de leur différenciation. D'autre part, la filaggrine induit l'agrégation de kératines provoquant l'affaiblissement du cytosquelette progressif de la cellule, pour laisser place au processus de cornification et donner naissance à la couche suivante, la couche cornée (Lynley and Dale 1983) (Eckhart et al. 2013).

De plus, les kératinocytes présents au niveau de cette couche granuleuse présentent de nombreux corps lamellaires lipidiques. A la surface entre la couche granuleuse et la couche cornée, ceux-ci fusionnent avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu lipidique dans les espaces intercornéocytaires, par exocytose (Kruegel and Miosge 2010). Ce processus permet la formation d'un ciment intercornéocyttaire compact qui joue un rôle clé dans la fonction « barrière perméable » de la peau.

d) La couche cornée (*Stratum corneum*)

La couche cornée, ultime stade de la différenciation du kératinocyte, se compose de cinq à dix assises plates, de cellules énucléées mortes mais biologiquement actives, appelées cornéocytes. C'est au cours d'un processus de protéolyse qu'a lieu la destruction du noyau.

A ce stade, les transglutaminases vont lier de manière covalente les kératines, l'involucrine, la filaggrine, et la loricine, afin de former la matrice fibreuse des cornéocytes. Le ciment intercornéocyttaire et les peptides antimicrobiens comme les défensines, permettent la protection contre les pertes d'eau massives (déshydratation) et contre l'invasion par des éléments nocifs de l'environnement.

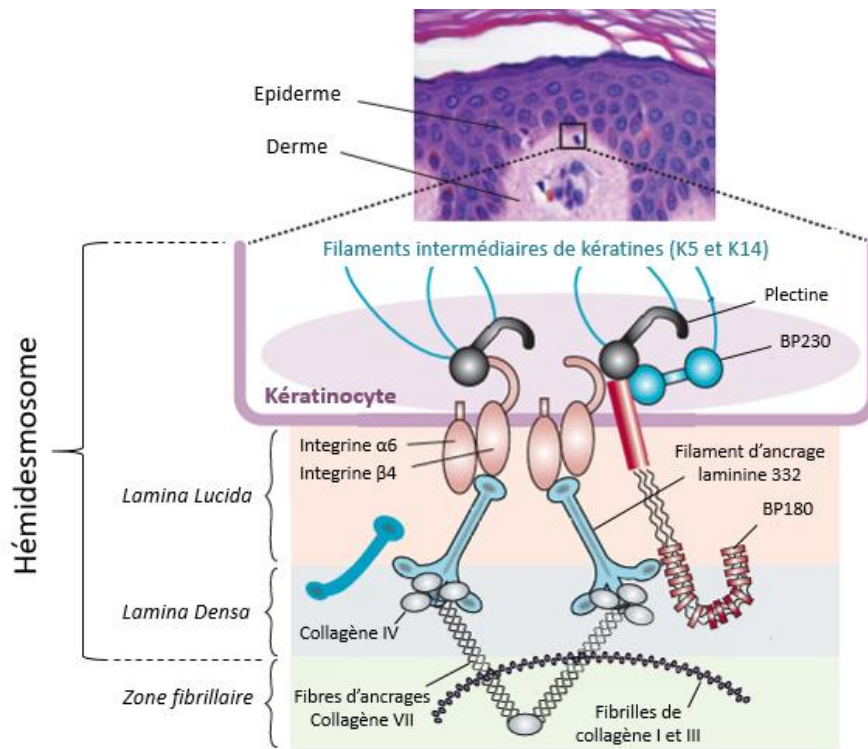
Enfin, la dernière étape correspond à l'élimination continue des cornéocytes de la surface de la peau, par desquamation. Ce phénomène résulte de la dégradation des jonctions qui relient entre eux les cornéocytes par des cornéodesmosomes. Cette perte progressive des cornéocytes par desquamation est compensée par la prolifération des cellules de la couche basale, permettant à l'épiderme de se renouveler entièrement tous les 21 à 28 jours (en fonction de l'âge). Cela permet ainsi de maintenir l'intégrité de la couche cornée et d'assurer la fonction de barrière protectrice et semi-perméable de la peau.

#### D. La jonction dermo-épidermique

La cohésion entre le derme et l'épiderme est assurée par des interactions protéiques entre les kératinocytes épidermiques basaux et les fibroblastes dermiques qui s'opèrent au niveau d'une zone d'échange acellulaire, appelée jonction dermo-épidermique (JDE) également nommée membrane basale épidermique. Des échanges d'oxygène et de nutriments se produisent également au niveau de cette JDE (Smola et al. 1998) (Marionnet et al. 2006) (Aleemardani et al. 2021).

L'observation en microscopie électronique à transmission permet de distinguer 4 sous-régions majeures de la JED : (a) la membrane plasmique des kératinocytes basaux et les plaques hémidesmosomales, (b) la lamina lucida, (c) la lamina densa et (d) la sub lamina densa (ou zone fibrillaire) (Briggaman and Wheeler 1975) (Watson and Griffiths 2019) (figure 3). A noter que l'intégrité tissulaire des épithéliums stratifiés et complexes est médiée par les hémidesmosomes (HD), les filaments d'ancrage, les filaments intermédiaires et les fibrilles d'ancrage. En effet au niveau de la JDE, les HDs, complexes multiprotéiques spécialisés, vont assurer la liaison des kératinocytes basaux à la lame basale sous-jacente.





**Figure 3 : La jonction dermo-épidermique**

Cette représentation schématique fait apparaître les différentes régions et composants de la jonction dermo-épidermique : les hémidesmosomes, la lamina lucida, la lamina danse, la zone fibrillaire. Au niveau de l'hémidesmosome, le réseau de filaments intermédiaires de kératines (K5 et K14) des kératinocytes basaux, se lie, via les protéines BP230 et la plectine, aux intégrines  $\alpha6\beta4$ . La partie extracellulaire de celles-ci interagit avec la laminine 332 et le collagène IV, qui eux, interagissent consécutivement avec les fibres d'ancrage de collagène VII, et le collagène I et III. Cette JDE et ces différentes interactions, permettent une cohésion stable entre le derme et l'épiderme.

*Adapté de (Schmidt and Zillikens 2013)*

a) La membrane plasmique et plaques hémidesmosomales

Cette première région est constituée de la membrane plasmique des kératinocytes basaux de l'épiderme, dont leur cytosquelette composé de filaments intermédiaires de kératines (KIF) 5 et 14 est relié à deux protéines de la JDE, la plectine et BP230 (cette dernière portant également de nom de BPAG1). Ces deux protéines se lient ensuite à deux protéines transmembranaires, l'intégrine  $\alpha6\beta4$  et BP180 (connue également sous le nom de BPAG2 ou Collagène XVII), contribuant ainsi l'ancrage des kératinocytes à la lamina lucida (McMillan, Akiyama, and Shimizu 2003).

#### b) La lamina lucida

Cette région de 20 à 40nm d'épaisseur doit son nom à sa particularité d'être claire aux électrons lors d'une observation par microscopie électronique. Celle-ci est traversée par des filaments d'ancrage, comme la laminine 332 (également appelée laminine 5), qui se lie à la portion extracellulaire de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ . D'autre part, la laminine 332 qui se trouve à l'interface entre la *lamina lucida* inférieure et la partie supérieure de la *lamina densa*, joue un rôle central dans la formation des HDs.

#### c) La lamina densa

Appelée ainsi en raison de son aspect dense aux électrons, cette région a une épaisseur pouvant varier de 30 à 60nm en fonction de l'âge. Majoritairement constituée de collagène IV, celle-ci contient également du nidogène ou protéoglycanes, en particulier, le perlecan, permettant de lier les filaments d'ancrage aux fibres d'ancrage issues de la zone fibrillaire du derme superficiel ou papillaire.

#### d) La zone fibrillaire

Cette zone du derme papillaire est composée de fibres d'ancrage, de collagène VII, d'une épaisseur de 20 à 60nm. Ces fibres font le lien entre la lamina densa et les plaques d'ancrage dans le derme papillaire, où elles interagissent avec les fibrilles de collagène I et III.

## II. Kératines dans les kératinocytes épidermiques

Au-delà des interactions permettant un ancrage solide entre le derme et l'épiderme comme détaillé ci-dessus, les kératinocytes épidermiques, principaux types de cellules de l'épiderme cutané, jouent un rôle essentiel dans la protection de notre corps contre diverses agressions extérieures en formant une barrière physique et immunologique. Ce rôle protecteur est assuré par les kératines, qui représentent la protéine structurelle principale dans le cytoplasme des kératinocytes épidermiques, dans lequel elles forment un réseau de filaments intermédiaires (Seyun Kim and Coulombe 2007).

### A. Expression des gènes de kératines

Chez l'humain, les protéines de kératines sont codées par une grande famille de 54 gènes conservés au cours de l'évolution et régulées par paires. Parmi ces gènes, 28 codent pour les kératines de type I (K9-K28 ; dites acides) et 26 codent pour les kératines de type II (K1-K8 ; K71-K86 ; dites basiques ou neutres), respectivement situés sur les chromosomes 17q21.2 et 12q13.13 (Wang, Ziemann, and Coulombe 2016). La seule exception étant le locus K18, situé à côté de son gène partenaire K8 sur le cluster de type II (Haines and Lane 2012) (Schweizer et al. 2006) (Ho et al. 2022).

Enfin, ces gènes qui codent des protéines kératiniques (Tableau 1) peuvent être divisés en trois groupes fonctionnels :

- Les kératines dites « simples », exprimées dans les épithéliums embryonnaires, monocouches, notamment les cellules sécrétoires du foie et de l'intestin.
- Les kératines « barrières », exprimées dans les épithéliums pavimenteux stratifiés multicouches tels que l'épiderme cutané avec l'expression des kératines 5 et 14 dans les kératinocytes basaux et des kératines K1 et K10 dans les kératinocytes de la couche épineuse.
- Les kératines « structurelles » plus dures qui forment les cheveux et les ongles.

**Tableau 1 : Protéines kératiniques de type I et II**

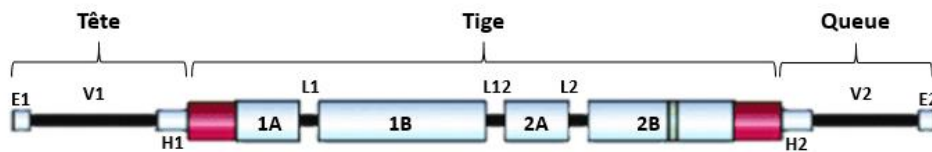
	Kératines	Tissu épithélial	Partenaire de polymérisation <i>in vitro</i>
<b>Type I</b>			
<b>Simple</b>	K18	Épithéliums simples (exemple: foie, pancréas, colon, poumons)	K8, K7
	K20	Épithéliums simples, notamment gastro-intestinaux	K8, (K7)
<b>Barrière</b>	K9	Épithéliums cornifiés stratifiés ; paume	(K1)
	K10	Épithéliums cornifiés stratifiés, suprabasaux	K1
	K12	Épithéliums stratifiés ; cornée	K3
	K13	Épithéliums stratifiés, non cornifiés ; suprabasal	K4
	K14	Épithéliums stratifiés et complexes ; basaux	K5
	K15	Épithéliums stratifiés	(K5)
	K16	Épithéliums stratifiés ; induits en cas de stress, renouvellement rapide ; suprabasal	K6a
	K17	Épithéliums stratifiés ; induits en cas de stress, renouvellement rapide	K6b
	K19	Épithéliums simples et stratifiés	K8
	K23, K24	Épithéliums	
<b>Structurelles</b>	K25, K26, K27, K28	Épithéliums stratifiés : gaine du follicule pileux	
	K31, K32, K33a, K33b, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40	Épithéliums stratifiés : poils, structures dures	

	Kératines	Tissu épithélial	Partenaire de polymérisation <i>in vitro</i>
<b>Type II</b>			
<b>Simple</b>	K7, K8	Épithéliums simples	K18
<b>Barrière</b>	K1	Épithéliums stratifiés, cornifiés, suprabasaux	K8, (K7)
	K2	Épithéliums cornifiés stratifiés, suprabasaux tardif	(K10)
	K3	Épithéliums stratifiés ; cornée	K12
	K4	Épithéliums stratifiés, non cornifiés ; suprabasal	K13
	K5	Épithéliums stratifiés et complexes ; basaux	K14, (K15)
	K6a	Épithéliums stratifiés ; induits en cas de stress, renouvellement rapide ; suprabasal	K16
	K6b	Épithéliums stratifiés ; induits en cas de stress, renouvellement rapide ; suprabasal	K17
	K6c	Épithéliums	
	K76	Épithéliums stratifiés cornifiés, buccaux, suprabasaux	K10
	K78, K79, K80	Épithéliums	
<b>Structurelles</b>	K75	Épithéliums stratifiés : gaine du follicule pileux	
	K71, K72, K73, K74	Épithéliums stratifiés : poils, structures dures	
	K81, K82, K83, K84, K85, K86	Épithéliums stratifiés : cheveux, structures dures	

## B. Structure des kératines de type I et II

En terme de structure primaire, chacune des kératines est caractérisée par une chaîne d'acides aminés, qui peut varier en nombre, en séquences d'acides aminés, ainsi qu'en polarité, charge et taille (Brown 1950; Makar, Havryliak, and Sedilo 2007). Cela permet de déterminer la structure moléculaire et les propriétés des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des kératines. Par exemple, la lysine en position 23 et le glutamate en position 106 sont nécessaires au bon assemblage des filaments intermédiaires de kératines K5/K14 *in vitro* et *in vivo* (Wu et al. 2000).

L'organisation structurale secondaire est, elle, commune pour chaque kératine de type I et II ; elle se compose de trois parties : Domaine de tête (du côté N-Terminale de la molécule) – Domaine de bâtonnet central (Tige) – Domaine de queue (du côté C-Terminale de la molécule) (Steinert et al. 1984) (figure 4). Chacun de ces trois domaines est également divisé en sous domaines. Ces domaines et sous-domaines d'une molécule de kératine vont interagir avec ceux des molécules kératiniques adjacentes pour former les hétérodimères, tétramères et enfin les filaments intermédiaires de kératines.



**Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation structurale du domaine polypeptidique de kératine**

Chaque molécule de kératine est constituée d'un domaine central en bâtonnet  $\alpha$ -hélicoïdal composé de quatre segments hélicoïdaux, 1A, 1B, 2A et 2B, interrompus par trois domaines de liaison flexibles non hélicoïdaux L1, L12 et L2. Le domaine de bâtonnet commence et se termine par des motifs de séquence hautement conservés, et est flanqué respectivement de domaines de tête et de queue.

*Adapté de (Banerjee et al. 2014)*

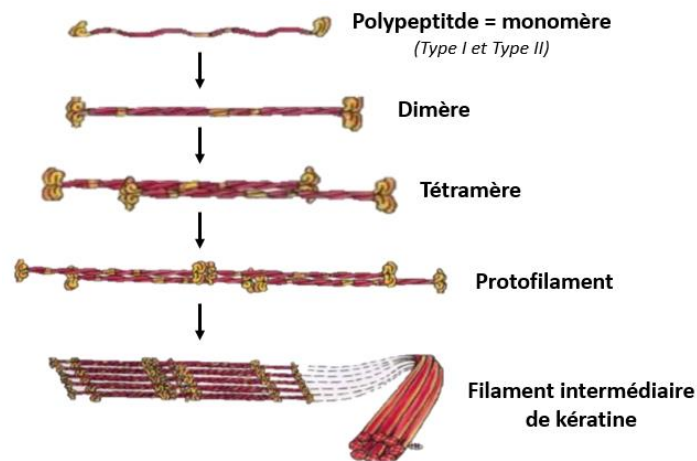
- Le **domaine de tête** a une structure globulaire non hélicoïdale avec des tours  $\beta$ . Il a été décrit que le sous domaine H1 est relativement constant dans les kératines basiques de type II mais variable dans les kératines acides de type I (Hatzfeld and Burba 1994) et qu'au sein de la kératine 1, celui-ci contient de nombreuses thréonines et prolines pouvant jouer un rôle important dans l'alignement parallèle correct des chaînes polypeptidiques de kératine I et II. Le sous-domaine V1 est davantage variable et contient de nombreux résidus glycines (Steinert, Steven, and Roop 1985). Dans les cellules basales des épithéliums stratifiés, celui-ci est relié via un résidu lysine aux protéines desmosomales, tandis que dans les cellules suprabasales, il est attaché aux protéines des cornéocytes (Candi et al. 1998).
- Le **domaine de queue**, globulaire et non hélicoïdale est subdivisé en trois sous-domaine, H2, V2 et E2 dans les kératines de type II et seulement des sous-domaines V2 et E2 dans les kératines de type I. Il a été décrit que le domaine de queue des kératines 5 et 14 était nécessaire à la stabilisation des filaments kératiniques *in vitro* (Wilson, Coulombe, and Fuchs 1992). De plus, le sous domaine V2 a été décrit, pour la kératine 1, comme facilitant l'alignement parallèle des filaments kératiniques (Sprecher et al. 2001).
- Le **domaine central en bâtonnet** des kératines  $\alpha$  comprend 310 acides aminés et se compose de quatre sous-domaines hélicoïdaux en hélice  $\alpha$  1A, 1B, 2A et 2B, qui sont séparés les uns des autres par des tournures  $\beta$  non hélicoïdales appelées régions de « liaison » (L1, L12 et L2). Ces sous-domaines hélicoïdaux sont composés de répétitions de sept acides aminés (motifs heptades) qui sont des éléments essentiels préalables à la formation de l'hétérodimère (Eckert 1988). Les 13 premiers résidus d'acides aminés à l'extrémité N-Ter du domaine en bâtonnet forment ce que l'on appelle le site déclencheur (motif d'initiation de l'hélice), qui initie la formation de l'hélice  $\alpha$  du domaine en bâtonnet (Coulombe, Pierre A and Omary 2002). Les propriétés physiques du domaine en bâtonnet et de ses sous-domaines définissent de manière générale les propriétés mécaniques et d'assemblage des filaments intermédiaires de kératines.

Bien que le domaine en bâtonnet hélicoïdal soit suffisant pour la formation des hétérodimères ou tétramères, l'assemblage des filaments kératiniques nécessite les domaines de tête et de queue non hélicoïdaux (Wilson, Coulombe, and Fuchs 1992). Les domaines de tête et de queue établissent l'orientation parallèle et décalée des domaines de bâtonnet, dans un hétérodimère et tétramère. De plus le domaine de queue ancre les filaments intermédiaires de kératines aux desmosomes via des protéines de liaison (Candi et al. 1998). Le domaine central en bâtonnet, est lui, essentiel dans l'assemblage des kératines de type I et II et par conséquent dans la formation des hétérodimères, tétramères et ainsi des filaments intermédiaires de kératines.

## C. Filaments intermédiaires de kératines

### a) Assemblage des filaments intermédiaires de kératines

La formation de filaments intermédiaires de kératines est initiée par la formation d'hétérodimères dans lesquels les chaînes polypeptidiques de type I (acide) et de type II (basique) s'alignent de manière parallèle (figure 5).



**Figure 5 : Mécanisme d'assemblage de filaments intermédiaires de kératines**

La polymérisation de la kératine commence par la formation de structures hétérodimères (dimère) en spirale impliquant des interactions enroulées des domaines de bâtonnet centraux des polypeptides de type I et de type II. Les hétérodimères s'associent ensuite (côte à côte) et s'assemblent de manière décalée et antiparallèle pour former des tétramères stables. Les tétramères s'associent ensuite bout à bout pour former des protofilaments. Enfin, quatre protofibrilles construisent latéralement des filaments intermédiaires de kératines. Chaque filament contient environ huit protofilaments enroulés les uns autour des autres dans une structure en forme de corde, formant le réseau de filament intermédiaire de kératines de 10 à 12 nm de large.

*Adapté de (Chamcheu Jean Christopher, Siddiqui, et al. 2011)*

Cela a lieu par l'association en spirale des domaines en bâtonnet de deux kératines (I/II). A leur tour, les deux dimères interagissent de manière chevauchante et antiparallèle entre les domaines en bâtonnet d'un polypeptide de kératine de type I et II pour former des tétramères. Par exemple au sein des kératinocytes épidermiques, la kératine 5 s'hétérodimérise avec la kératine 14, et la kératine 1 avec la kératine 10.

Les étapes suivantes consistent en une agrégation latérale de huit tétramères selon une orientation inverse et décalée pour former des polymères linéaires appelés « protofilaments ». Ceux-ci s'associent ensuite deux à deux pour former une protofibrille. Enfin, quatre protofibrilles s'enroulent les unes aux autres afin de former des filaments intermédiaires de kératines de 10 à 12nm de large (Herrmann and Aebi 2016).

Le réseau de filaments intermédiaires de kératines ainsi formé, constitue une structure flexible et dynamique qui se réorganise dans certaines conditions physiologiques, comme pendant la mitose (Snider and Omary 2014).

#### b) Fonctions des filaments intermédiaires de kératines

De manière générale, les filaments intermédiaires de kératines, contribuent à des fonctions mécaniques (structurelles) et non mécaniques (régulatrices) au sein de l'épithélium.

Les fonctions non mécaniques des filaments intermédiaires de kératines incluent la régulation de l'architecture tissulaire, la croissance cellulaire (lors de la réparation des plaies cutanées), la migration cellulaire et les cascades de signalisation liées au stress (Snider and Omary 2014) (Doganyigit, Eroglu, and Okan 2023).

Plus précisément, dans l'épiderme basal, de par leurs propriétés intrinsèques, les filaments intermédiaires de kératines composés de la kératine 5 et 14, ont pour principale fonction de protéger les cellules des stress extérieurs en assurant la stabilité et une résistance mécanique grâce aux contacts cellule-cellule (desmosomes) et cellule-matrice (hémidesmosomes) (Simpson, Patel, and Green 2011) (Weber et al. 2021).

De ce fait, la présence de kératines mutées (K5 ou K14), va entraîner une fragilité cutanée accrue des kératinocytes basaux, de l'épiderme en raison de la perturbation du complexe multi protéique kératines-hémidesmosomes. Les mutations associées à ces kératines, codées par les gènes *KRT5* et *KRT14* sont à l'origine d'une maladie génétique rare « L'Epidermolyse Bulleuse Simple ».

# Chapitre 2 : Epidermolyse Bulleuse Simple

## I. Généralités

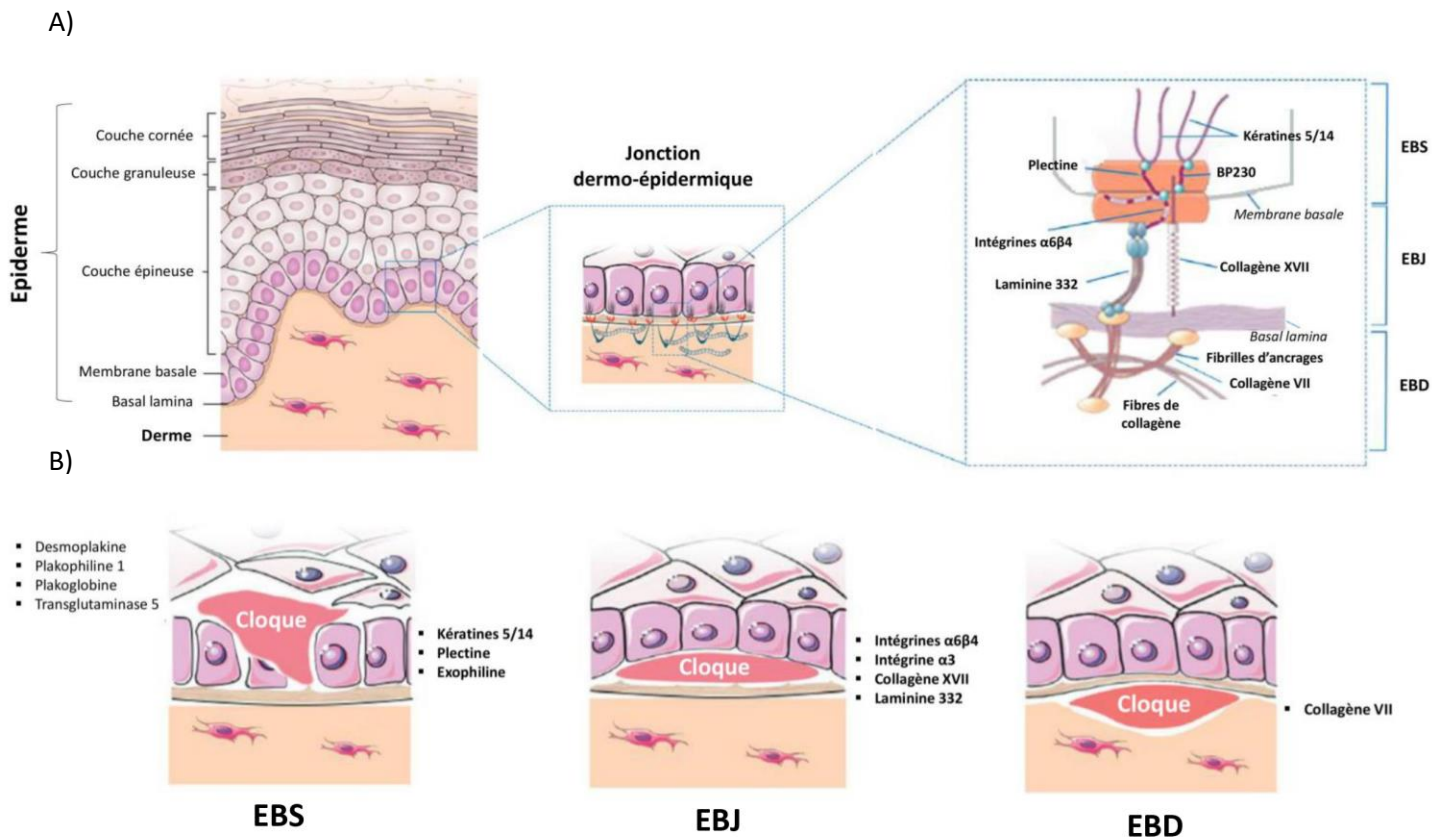
L'Epidermolyse bulleuse (EB) est un groupe de maladies génétiques associées à une fragilité cutanée qui entraîne la formation de bulles, d'érosions et de cicatrices sur la peau et les muqueuses en réponse à un traumatisme mécanique léger ou même spontanément (Cristina Has and Fischer 2019). (Mariath et al. 2020). L'incidence et la prévalence de l'EB aux États-Unis sont respectivement d'environ 1/53 000 et 1/125 000, et des estimations similaires ont été obtenues dans les pays européens (Fine 2016).

### A. Manifestations génétiques et cliniques de l'EB

Cliniquement et génétiquement, l'EB est très hétérogène, comprenant des phénotypes avec des niveaux de gravité contrastés et impliquant plus de 1000 mutations dans au moins 16 gènes différents. Ces mutations provoquent des manifestations cliniques distinctes, allant de légères à sévères, avec une atteinte locale ou généralisée et une morbidité et une mortalité significatives pour certaines formes (C. Has, Bauer, et al. 2020) (C. Has, Bauer, et al. 2020b).

Les gènes associés à l'EB codent des protéines ayant des fonctions structurelles dans l'épiderme, dans la zone de la membrane basale ou dans la partie supérieure du derme, étant importantes pour l'intégrité de la peau et pour l'adhésion entre le derme et l'épiderme (Cristina Has and Bruckner-Tuderman 2014). Ainsi, des changements génétiques qui modifient la dynamique et la fonction de ces protéines, vont entraîner une défaillance des structures qui assurent la stabilité mécanique de l'épiderme (comme le cytosquelette kératinique et les desmosomes) et de la membrane basale (comme les hémidesmosomes, les adhérences focales, des filaments d'ancrage et des fibrilles d'ancrage) (C. Has, Liu, et al. 2020) (figure 6).





**Figure 6 : Représentation schématique de la structure et des zones touchées dans l'Epidermolyse bulleuse (EB)**

(A) Schéma de la peau (partie gauche) et de la jonction épidermique (partie droite)  
 L'épiderme constitué de 4 couches (cornée, granuleuse, épineuse et basale) est relié au derme via différentes interactions protéiques au niveau d'une zone appelée « Jonction dermo-épidermique ».

Selon les protéines altérées, différentes formes d'EB sont décrites : EBS, EBJ, EBD.

(B) Protéines impliquées dans la pathogenèse des types d'EB, et sites de formation de bulles.  
 Les différents types d'EB sont principalement caractérisés par les protéines altérées et la zone d'apparition des bulles.

*Adapté de (De Rosa et al. 2020)*

Compte tenu de l'hétérogénéité des gènes altérés, de la zone de clivage entre le derme et l'épiderme, ainsi que des caractéristiques phénotypiques, l'EB est classée en quatre types principaux : l'**Epidermolyse Bulleuse simple (EBS)**, l'**Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle (EBJ)**, l'**Epidermolyse Bulleuse Dystrophique (EBD)** et l'**Epidermolyse Bulleuse de Kindle** (Tableau 2) (Murat-Sušić et al. 2011; McGrath 2015).

De plus la classification la plus récente, publiée en 2020, indique un total de 33 sous-types distincts d'EB (13 EBS, 9 EBJ et 11 EBD). Cette classification prend en compte la répartition et la gravité des bulles, la présence de caractéristiques cutanées et extra cutanées spécifiques mais également le gène altéré et le schéma de transmission génétique (C. Has, Bauer, et al. 2020; Fine et al. 2014).

**Tableau 2 : Classification des formes d'Epidermolyse Bulleuse**

*D'après (C. Has, Bauer, et al. 2020)*

Classical types of EB				
Level of skin cleavage	EB type	Inheritance	Mutated gene(s)	Targeted protein(s)
Intraepidermal	EB simplex	Autosomal dominant	KRT5, KRT14	Keratin 5, keratin 14
			PLEC	Plectin
		Autosomal recessive	KLHL24	Kelch-like member 24
			KRT5, KRT14	Keratin 5, keratin 14
			DST	Bullous pemphigoid antigen 230 (BP230) (syn. BPAG1e, dystonin)
Junctional	Junctional EB	Autosomal recessive	EXPH5 (syn. SLAC2B)	Exophilin-5 (syn. synaptotagmin-like protein homolog lacking C2 domains b, Slac2-b)
			PLEC	Plectin
			CD151 (syn. TSPAN24)	CD151 antigen (syn. tetraspanin 24)
			LAMA3, LAMB3, LAMC2	Laminin 332
			COL17A1	Type XVII collagen
Dermal	Dystrophic EB	Autosomal dominant	ITGA6, ITGB4	Integrin $\alpha 6\beta 4$
			ITGA3	Integrin $\alpha 3$ subunit
			COL7A1	Type VII collagen
Mixed	Kindler EB	Autosomal recessive	COL7A1	Type VII collagen
			FERMT1 (syn. KIND1)	Fermitin family homolog 1 (syn. kindlin-1)

a) Epidermolyse Bulleuse Dystrophique (EBD)

L'EBD est causée par des mutations du gène *COL7A1*, codant le collagène VII, le composant majeur des fibrilles d'ancrage dermique. L'absence (ou l'altération) de celui-ci se caractérise par un clivage dans le derme supérieur, aboutissant à une rupture des fibrilles d'ancrage, ce qui induit la formation de bulles juste en dessous de la lamina densa de la membrane basale (L. Bruckner-Tuderman, Höpfner, and

Hammami-Hauasli 1999). L'EBD est **divisée en deux types principaux** en fonction du mode de transmission, autosomique dominant (**DDEB**) et autosomique récessif (**RDEB**) (Mariath et al. 2020).

Les résultats cliniques incluent des bulles généralisées à la naissance entraînant des cicatrices étendues, une hypo ou une hyperpigmentation, des bulles cornéennes, un retard de croissance, une anémie multifactorielle, des sténoses œsophagiennes et des déformations des mains et des pieds (Bruckner-Tuderman, Leena 2010). De plus, les plaies chroniques souvent colonisées par un microbiote pathogène, entraînent une inflammation excessive et une altération de la cicatrisation (Nyström, Bruckner-Tuderman, and Kiritsi 2021; Huitema et al. 2021). De ce fait, la qualité de vie des patients atteints de RDEB est considérée comme la plus difficile parmi toutes les formes d'EB et l'espérance de vie des patients est généralement très réduite, car ils développent presque systématiquement des carcinomes épidermoïdes agressifs à mesure que la maladie progresse (Fine et al. 2009; Montaudié et al. 2016; M. Kim et al. 2018).

#### b) Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle (EBJ)

L'EBJ résulte de mutations dans des gènes codant des protéines structurelles impliquées dans l'ancrage des kératinocytes basaux à la membrane basale, telles que le collagène de type XVII (*COL17A1*), la laminine 332 (*LAMA3*, *LAMB3* et *LAMC2*), l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  (*ITGA6* et *ITGB4*) et la sous-unité de l'intégrine  $\alpha 3$  (*IGTA3*). Les conséquences de ces mutations vont se caractériser par une séparation dermo-épidermique et des bulles au niveau de la lame basale de la peau. Tous les sous-types sont hérités de manière autosomique récessive. D'un point de vue clinique l'EBJ, se caractérise par des bulles et des érosions localisées, en particulier sur le visage et le cou, associées aux effets d'une maladie des voies respiratoires supérieures, d'anomalies des ongles, d'érosions, de tissu de granulation et d'hypoplasie de l'émail et une atteinte des muqueuses. En plus d'une fragilité cutanée extrême, l'EBJ se caractérise également par une inflammation chronique (Keith et al. 2020 ; Hammersen et al. 2016). Cependant, la gravité varie considérablement selon les sous-types de l'EBJ : (1) Herlitz (mortel), (2) non Herlitz (non mortel) et (3) EBJ avec atrophie du pylore. Les données épidémiologiques indiquent que l'EBJ est moins fréquente que les types d'EB simple ou dystrophiques (Fine 2016).

#### c) Syndrome de Kindler

L'EB Kindler (KEB, anciennement connu sous le nom de syndrome de Kindler), est une forme syndromique rare de l'EB, qui a été reconnue comme une entité diagnostique distincte (Fine et al. 2014) . Elle est causée par une mutation dans le gène codant la kindlin-1 (*FERMT1*), une protéine permettant la connexion du cytosquelette d'actine des kératinocytes basaux, à la matrice

extracellulaire ; mais joue également un rôle dans l'adhésion cellule-cellule, la différenciation et de la migration cellulaire (Gonzalez 2013).

Le résultat de biopsie cutanée de ces patients a montré une division au sein de la membrane basale à différents niveaux. Cependant, la zone de clivage la plus fréquemment rencontrée est localisée au niveau de la partie la plus basse de la couche basale de l'épiderme ; une duplication de la lame basale peut-être également observée. Le mode de transmission se fait de manière autosomale récessive. Enfin, les manifestations cutanées caractéristiques consistent en une poïkilodermie, une atrophie de la peau, des modifications pigmentaires, une fragilité des muqueuses et des cicatrices diffuses dues à la formation de bulles à divers niveaux de la peau. (Vahidnezhad et al. 2019) (Youssefian et al. 2015). A ce jour, 250 cas ont été rapportés, dont l'espérance de vie est dans la majorité des cas, normale. Cependant, quelques patients présentant un carcinome agressif ont été rapportés (Lai-Cheong et al. 2009).

#### d) Epidermolyse Bulleuse Simple (EBS)

Enfin, l'EBS, forme la plus répandue mais également la plus bénigne, présente un large éventail d'atteintes cutanées parmi les nombreux sous-types.

Mon projet de thèse ayant porté sur cette forme d'Epidermolyse Bulleuse, la suite de ce chapitre portera sur la description détaillée de celle-ci, tant d'un point de vue clinique, que moléculaire.

## II. Epidermolyse Bulleuse Simple

L'Epidermolyse bulleuse simplex (EBS) est une maladie cutanée rare, dont la prévalence se situe entre 1/85 000 et 500 000 dans le monde (<https://www.orpha.net/fr/disease>) (Fine 2016; Brun et al. 2017) (Petrof et al. 2022). Elle se caractérise principalement par une fragilité des tissus, et inflammation cutanée caractérisée par des vésicules présentant un érythème distinct avec des bords migrateurs, même sur une peau n'ayant pas subi de traumatisme. L'ensemble de ces phénotypes cliniques est en grande partie du au décollement entre le derme et l'épiderme, qui est causé par des mutations qui affectent l'assemblage et l'interaction des filaments intermédiaires de kératines.

### A. Description clinique des formes les plus courantes d'EBS

En fonction des gènes impliqués, de la localisation, de la fréquence et de la gravité des bulles, quatre sous-types les plus courants, ont été décrits : (1) EBS « **localisée** » (2) EBS « **généralisée** »

**intermédiaire** » (3) EBS « **généralisée sévère** » (ou « Dowling-Meara ») (Dowling and Meara 1954) et (4) EBS « avec **pigmentation marbrée** » (Tableau 3).

Par ailleurs, le spectre clinique des formes d'EBS est beaucoup large, comprenant d'autres formes moins fréquentes telles que l'EBS avec dystrophie musculaire ou cardiomyopathie.

**Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des 4 sous-types d'EBS les plus courants**

*Adapté de (So and Teng 1993)*

Caractéristiques cliniques	Sous-type d'EBS les plus courants			
	Localisée	Généralisée intermédiaire	Généralisée sévère	Pigmentation marbrée
Âge d'apparition	Enfance, généralement entre 12 et 18 mois	Naissance/enfance	Naissance	Naissance/enfance
Ampoules	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Généralement limitées aux mains et aux pieds ; peut survenir sur des sites de traumatismes répétés</li> <li>• Rares cloques sur la muqueuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Généralisées</li> <li>• Occasionnelles sur les muqueuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Généralisées</li> <li>• Cloques groupées (herpétiformes)</li> <li>• Cloques sur les muqueuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Généralisées</li> <li>• ± cloques groupées (herpétiformes)</li> <li>• ± cloques sur la muqueuse</li> </ul>
Kératodermie	Occasionnellement	Occasionnellement	Commun, progressif et diffus	Commun, focal
Implications des ongles	Occasionnellement	Occasionnellement	Commun	Occasionnellement
Milia	Rare	Occasionnellement	Commun	Inconnu
Hyper/Hypo pigmentation	Non	Parfois	Commun	Toujours

a) Epidermolyse Bulleuse simple – Localisée

L'Epidermolyse Bulleuse simple localisée (EBS-loc), anciennement connue sous le nom de Weber-Cockayne, représente le sous-type d'EBS le moins sévère mais le plus courant ; il survient chez environ 60% des personnes atteintes d'EBS. Les bulles apparaissent dès la petite enfance, mais peuvent également apparaître dès la naissance. En effet les premiers symptômes surviennent généralement dès lors que l'enfant se met à ramper ou marcher, avec l'apparition d'ampoules généralement limitées aux pieds et aux mains. Les symptômes peuvent être saisonniers et s'aggraver avec la chaleur et la transpiration. D'autre part, une hyperkératose focale des paumes et des plantes sur les sites de frottements mécaniques et de traumatismes répétés peut se développer à la fin de l'âge adulte et provoquer des douleurs importantes ainsi qu'une mobilité réduite, sans pour autant impacter l'espérance de vie (Fine et al. 2014).

b) Epidermolyse Bulleuse simple – Généralisée intermédiaire

La forme généralisée intermédiaire (EBS-gen), auparavant appelée Koebner, est la forme intermédiaire survenant chez 15% des personnes atteinte d'EBS. Cette forme d'EBS se distingue de l'EBS-loc par la présence de bulles sur l'ensemble du corps, en plus des mains et pieds, et est en général plus légère que l'EBS sévère. Les ampoules peuvent être présentes dès la naissance et se développer au cours des premiers mois de l'enfant (Fine et al. 2014). Les bulles générées par frottements peuvent être graves et mettre en danger la vie des nouveau-nés, cependant elles s'améliorent généralement à mesure que des individus approchent de la fin de l'enfance et du début de l'âge adulte, n'altérant pas l'espérance de vie.

c) Epidermolyse Bulleuse simple – Généralisée sévère

L'Epidermolyse Bulleuse simple, généralisée sévère (EBS-gen sev), autrefois connue sous le nom d'EBS Dowling-Meara (EBS-DM) est la forme la plus sévère survenant chez environ 25% des personnes atteintes d'EBS. Les bulles apparaissent dès la naissance, affectant grandement la qualité de vie et dont la gravité varie considérablement d'un enfant à l'autre. Celles-ci sont généralisées, localisées, volumineuses, hémorragiques et graves, en particulier durant la période néonatale ; mais peuvent également apparaître sous forme de multiples amas (herpétiformes) chez l'enfant. D'autres symptômes peuvent également être observés, à savoir : une atteinte des muqueuses, érosions buccales, œsophagiennes et atteintes laryngées, une dystrophie des ongles, une kératodermie palmoplantaire progressive ainsi qu'une hyperpigmentation et hypopigmentation (Pierre A. Coulombe and Lee 2012) (Knöbel, O'Toole, and Smith 2015). De plus, un risque accru de carcinomes basocellulaires a été identifié chez quelques personnes atteintes d'EBS sévère, pouvant altérer leur espérance de vie (Fine et al. 2009).

Malgré le degré de variation de la présentation clinique de ces trois principaux sous-types d'EBS, détaillés ci-dessus, ceux-ci sont causés dans 75% des cas par des mutations dans les gènes *KRT5* et *KRT14* codant respectivement pour la kératine 5 et la kératine 14 (Bolling et al. 2011). D'autre part, ces 3 sous-types d'EBS sont transmis de manière autosomique dominante (Bardhan et al. 2020a).

#### d) Epidermolyse Bulleuse Simple – Avec pigmentation marbrée

L'EBS avec pigmentation marbrée, forme rare et survenant chez moins de 1 % des personnes atteintes d'EBS, est caractérisée par une fragilité cutanée et présence de bulles évidentes à la naissance, mais est cliniquement impossible à distinguer des formes généralisées (intermédiaire ou sévère). La caractéristique déterminante se trouve dans le développement de petites macules hyper pigmentées qui progressent avec le temps et fusionnent pour former un motif réticulé. Ces changements ont tendance à se produire sur le tronc (dans les zones de flexions : le cou, l'aîne et les aisselles) et les extrémités (en particulier sur les bras). D'autre part, des hyperkératoses palmaires et plantaires focales peuvent également survenir. L'espérance de vie n'a pas été décrite comme étant altérée chez ces patients (Echeverría-García et al. 2013).

#### B. Diagnostic et modes de transmission

Il est important de noter qu'un diagnostic précis de la maladie est essentiel pour garantir des soins optimaux aux patients et offrir des solutions thérapeutiques les plus efficaces. Le diagnostic clinique repose sur l'évaluation des symptômes par des experts de la santé. Par la suite, des tests en laboratoire tels que l'immunofluorescence et la transmission électronique sont effectués sur des biopsies de patients pour évaluer la gravité de la maladie, ainsi que des tests de génétique moléculaire pour confirmer le diagnostic et détecter des mutations au sein des gènes affectés dans l'EBS (Fine et al. 2014).

### III. Mutations causant l'EBS

Dans l'EBS, les gènes les plus fréquemment impactés sont *KRT5* et *KRT14*, codant respectivement les kératine 5 (K5) et kératine 14 (K14) (Lane et al. 1992) (Pierre A. Coulombe and Lee 2012; Homberg and Magin 2014). Cependant, d'autres gènes peuvent être également impliqués : *PLEC* (plectine), *DST* (BP230 ou antigène pemphigoïde bulleux 230), *EXPH5* (exophiline 5), *KLHL24* (protéine de type kelch 24) et *CD151* (protéine CD151), donnant des sous-types d'EBS différents (So and Teng 1993-2023) (Tableau 4).

**Tableau 4 : Classification des différents formes d'EBS, et les gènes impliqués**

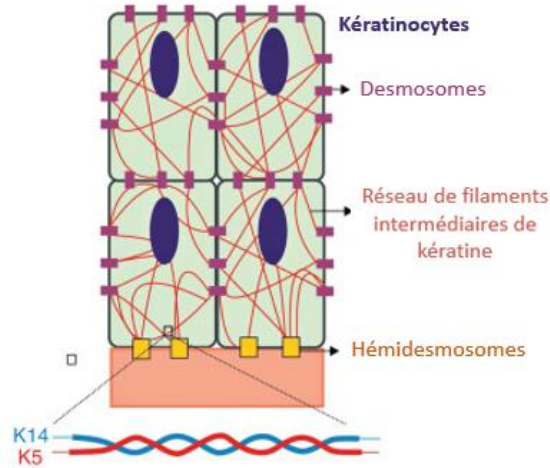
*Adapté de (So and Teng 1993-2023)*

Sous type d'EBS les plus courant		Sous type d'EBS rares	
Nomenclature	Gène affecté	Nomenclature	Gène affecté
<ul style="list-style-type: none"> <li>• EBS localisée</li> <li>• EBS généralisée intermédiaire</li> <li>• EBS généralisée sévère</li> <li>• EBS, avec pigmentation marbrée</li> </ul>	<i>KRT5</i> ou <i>KRT14</i>	• EBS récessive, intermédiaire ou sévère	<i>KRT5</i> ou <i>KRT14</i>
		• EBS, intermédiaire avec mutations au sein de la plectine	<i>PLEC</i>
		• EBS, intermédiaire avec dystrophie musculaire	<i>PLEC</i>
		• EBS, sévère avec atrésie du pylore	<i>PLEC</i>
		• EBS avec érythème migrateur circiné	<i>KRT5</i>
		• EBS, intermédiaire avec cardiomyopathie	<i>KLHL24</i>
		• EBS, localisée ou intermédiaire avec déficit en <i>BP230</i>	<i>BP230</i>
		• EBS, localisée ou intermédiaire avec déficit en exophiline 5	<i>EXPH5</i>
		• EBS, localisée avec néphropathie avec déficit en <i>CD151</i>	<i>CD151</i>

**A. Mutations *KRT5* et *KRT14***

Les sous-types d'EBS les plus fréquents causés par des mutations au sein des gènes *KRT5* et *KRT14*, dans les kératinocytes basaux de l'épiderme, codent respectivement les kératines 5 (K5 ; type II) et 14 (Fuchs and Green 1980; C.-H. Lee and Coulombe 2009). Ces kératines se lient ensemble afin de former les filaments intermédiaires de kératines (KIF) dans le cytosquelette des kératinocytes basaux de l'épiderme. Enfin, dans l'épiderme, de par leurs propriétés intrinsèques, leur principale fonction est de protéger les cellules des stress extérieurs en assurant la stabilité et une résistance mécanique grâce aux contacts cellule-cellule (desmosomes) et cellule-matrice (hémidesmosomes) (Simpson, Patel, and Green 2011) (Weber et al. 2021) (figure 7).





**Figure 7 : Représentation schématique du réseau de filaments intermédiaires de kératines (K5/K14)**

Les filaments intermédiaires de kératines se connectent aux hémidesmosomes pour assurer la fixation à la membrane basale sous-jacente et aux desmosomes pour assurer le contact cellule à cellule dans les kératinocytes.

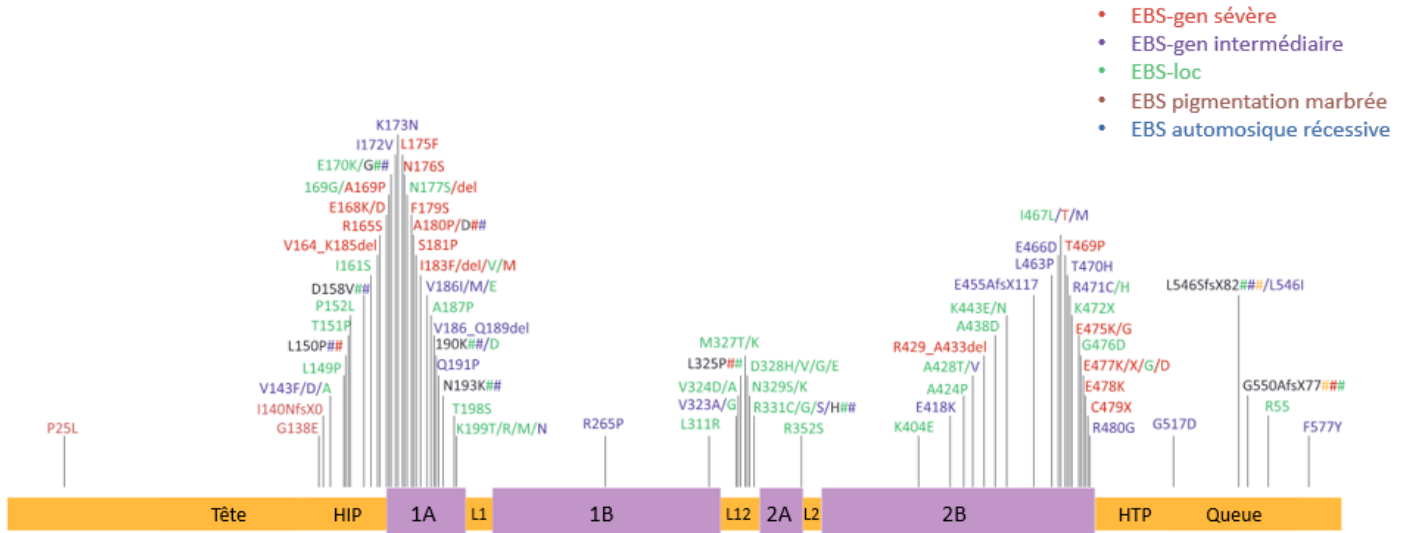
*Adapté de (Mariath et al. 2020)*

### B. Corrélation génotype-phénotype

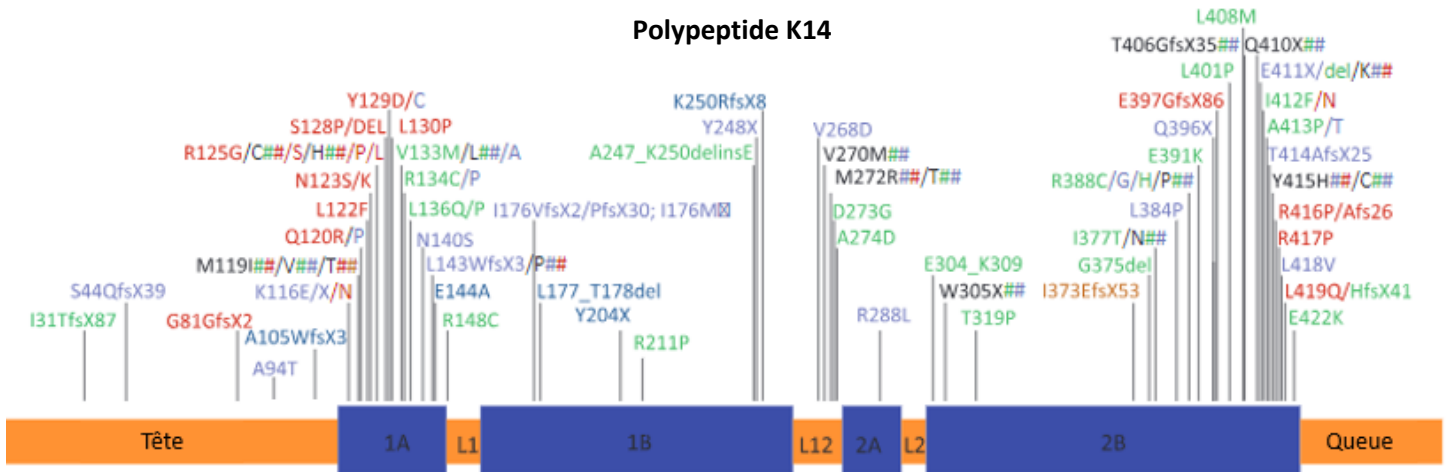
Dans la plupart des cas, la gravité de l'EBS est corrélée à la localisation des modifications génétiques au sein des domaines fonctionnels de *KRT5* et *KRT14* (Müller et al. 2006) (figure 8).

Les mutations entraînant des variantes pathogènes dans les extrémités hautement conservées (hot-spot) dans des domaines en bâtonnet en hélice  $\alpha$ , essentielles à l'assemblage des KIF, sont souvent associées aux cas les plus graves de la maladie (EBS-gen sev) (Meral Julia Arin 2009). Cependant cette corrélation n'est pas vraie dans tous les cas, car certains résidus peuvent être plus ou moins importants pour la protéine, et la nature des acides aminés substitués, comme leur structure et leur polarité qui influencent également le phénotype (M.J. Arin et al. 2010). La forme la plus légère, l'EBS-loc, est généralement associée à des mutations générant des variantes pathogènes dans les régions de liaison (L1 L12, L2) (Irvine and McLean 1999). Enfin, la forme généralisée intermédiaire (EBS-gen) comprend des variantes pathogènes qui ont tendance à être présentes le long des segments des domaines en bâtonnet (1A-1B, 2A-2B) ; à noter que le résidu d'acide aminé au sein de ces domaines le plus souvent altéré (70% des cas EBS-gen sévère) se trouve en position 125 de la kératine 14 (Porter and Birgitte Lane 2003). D'autre part, en plus de la localisation spatiale de la mutation, la nature de l'acide aminé remplacé, affecte également la gravité de la maladie (Murrell et al. 2011 ; Sørensen et al. 1999).

## Polypeptide K5



## Polypeptide K14

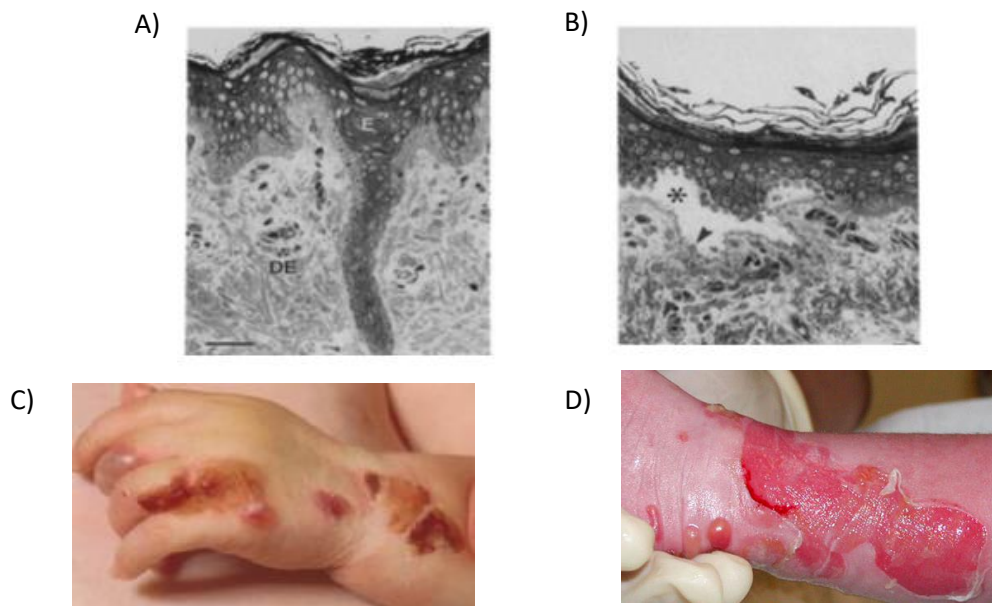


**Figure 8** : Diagramme schématisique montrant la distribution des variations d'acides aminés identifiées, causées par des mutations au sein de gènes *KRT5* et *KRT14* et leur emplacement au sein du polypeptide respectif K5 et K14.

Les kératines ont un domaine central en bâtonnet d'hélice  $\alpha$  contenant quatre segments (1A – B, 2A – B), qui sont interrompus par trois domaines de liaison (L1, L12 et L2). Le domaine des bâtonnets possède des motifs hautement conservés (HIP et HTP) à ses extrémités, souvent associés aux cas les plus graves d'EBS. Les variantes dans les domaines de liaison sont généralement associées à l'EBS localisée, tandis que dans la forme intermédiaire de la maladie, les variantes impliquées ont tendance à être réparties sur les segments du domaine des bâtonnets.

*Adapté de (E. Kim et al. 2017)*

Enfin, de manière générale, les mutations au sein des gènes *KRT5* et *KRT14*, vont entraîner une altération de l'assemblage du réseau de KIF, dans les kératinocytes basaux de l'épiderme (Haines and Lane 2012). Cette perte d'intégrité, va entraîner une fragilité cutanée accrue des kératinocytes basaux, en raison de la perturbation du complexe protéine kératines-hémidesmosomes. De ce fait, un traumatisme physique, même léger, conduit à une perte d'intégrité tissulaire, une cytolysse intraépidermique des cellules basales, et à la formation de bulles remplies de fluides (figure 9) (P A Coulombe et al. 1991) (Moll, Divo, and Langbein 2008; Omary, Coulombe, and McLean 2004).



**Figure 9 : Conséquences morphologiques des mutations *KRT5* ou *KRT14***

- (A) Peau intacte montrant une architecture épidermique normale, avec un derme (DE) et épiderme (E) liés.
- (B) Peau de patient EBS, montrant la formation d'une bulle intrabasale, entraînant la séparation de l'épiderme du derme sous-jacent (astérisque).
- (C) (D) Présence de bulles cutanées, causées par un décollement de l'épiderme.

*Adapté de (Chan et al. 1994)*

#### IV. Modèles d'études de l'EBS

Pour la compréhension des conséquences liées aux mutations au sein des gènes *KRT5* et *KRT14*, l'investigation de la pathologie d'un point de vue cellulaire et moléculaire a été permise grâce à différentes études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux et humains (Tableau 5).

Tout d'abord, en 1991, pour explorer la relation entre les mutations au sein des gènes codant les kératines et les maladies génétiques cutanées en général, un modèle de souris transgéniques exprimant une forme tronquée de la kératine 14 (c $\Delta$ 135K14P) dans la couche basale de l'épithélium pavimenteux stratifié a été généré (Vassar et al. 1991). Au vu des résultats de cette étude, notamment en raison de l'apparition de bulles cutanées mais également de la formation d'agrégats de kératines dans les cellules basales, la physiologie et la biochimie de ces souris transgéniques ont permis de fournir la preuve que les mutations au sein du gène *KRT14* sont la cause sous-jacente de l'EBS.

Suite à cela, un autre modèle de souris transgéniques Knock-out pour la kératine 14 (K14 -/- homozygote) (Lloyd et al. 1995) a été développé, mettant en évidence que le déficit en kératine 14 n'entraîne pas une ablation du cytosquelette basocellulaire en raison d'un rôle compensatoire de la kératine 15 ; cependant ces souris mourraient prématurément. Pour étudier précisément la nécessité de la présence d'un cytosquelette kératinique dans les cellules basales, une autre équipe de recherche a donc développé un modèle de souris transgéniques en inactivant le gène K5 (K5 -/- homozygotes) (Peters et al. 2001) ; ce modèle cellulaire a permis de montrer que la suppression de la kératine 5 rendait l'épiderme basal déficient en filaments intermédiaires de kératines et conduisait à une létalité immédiate après la naissance. Pour permettre d'étudier précisément l'EBS au niveau génétique et phénotypique, un modèle de souris transgéniques inducible (avec une mutation ponctuelle dans le codon 131 du gène *KRT14*) a ensuite été développé en 2001 (Cao et al. 2001), permettant l'induction de phénotypes EBS dans les souris qui restent viables.

De manière générale, bien que ces modèles aient fourni des informations importantes sur la physiopathologie de l'EBS, ils présentent deux limitations majeures : (1) présence de différences significatives dans l'anatomie et la physiologie de chaque couche cutanée chez la souris et l'homme, notamment dans l'architecture épithéliale, les propriétés biomécaniques mais également les mécanismes de cicatrisation (Wong et al. 2011) (2) la majeure partie des souris transgéniques développées meurt peu après la naissance (Leena Bruckner-Tuderman et al. 2010). D'autres modèles animaux tels que les drosophiles, ont également été développés, permettant de reproduire la présence de bulles sur les ailes, et soutiennent l'idée selon laquelle les mutations de l'EBS perturbent la

pathologie cellulaire et tissulaire par le biais de multiples mécanismes, notamment en compromettant l'intégrité du réseau de filaments intermédiaires de kératines (Bohnekamp et al. 2015).

De plus, des animaux présentant naturellement des mutations causant l'EBS ont été décrits. En 2005, des rapports cliniques de veaux et des analyses de microscopie électronique sur des échantillons de peau de ces veaux ont mis en évidence une perte de peau, de muqueuse et une inflammation au niveau des zones de contacts, et un site de clivage au-dessus de la membrane basale (Ford et al. 2005) ; de plus, une analyse génétique a conduit à l'identification de la mutation au sein du gène *KRT5* (hétérozygote, changement de codon E478K) présente chez ces veaux. Enfin, en 2020, une étude a rapporté l'existence de macaques rhésus avec une perte épidermique généralisée affectant 75% du corps, dont le séquençage a permis d'identifier une mutation homozygote (Johnson et al. 2020) ; malgré les avantages potentiels de ce modèle spontané de l'EBS chez une espèce plus étroitement liée à l'homme, la mortalité accrue de ces macaques reste toujours un facteur limitant pour l'étude de la pathologie.

Des biopsies ont permis de réaliser des études directement sur les coupes obtenues mais également de générer des modèles cellulaires primaires, murins et humains. Les premières biopsies ont été effectuées en 1991, sur des patients diagnostiqués comme étant atteint d'EBS-Dowling-Maera et les kératinocytes cutanés ont été mis en culture pour pouvoir examiner par immunofluorescence les réseaux de filaments intermédiaires de kératines dans ces cellules primaires (Pierre A. Coulombe et al. 1991). Deux autres équipes de recherche ont mené des études à partir de biopsies de patients atteints d'EBS, en analysant plus précisément la composante inflammatoire directement à partir des coupes de peau obtenues (Ujii et al. 2017 ; Alexeev et al. 2017). Des études ont également été menées sur des kératinocytes primaires isolés de souris modifiées génétiquement (knock-out pour les kératines de type I ou II, avec la ré expression ou non de kératines 5 et/ou K14) afin d'explorer notamment de manière plus approfondie le rôle des kératines dans l'assemblage des filaments intermédiaires de kératines et le maintien des hémidesmosomes (Homborg et al. 2015 ; Seltsmann et al. 2013).

De manière générale, la culture de kératinocytes primaires nécessite de passer par une étape de biopsie, dont l'obtention reste difficile et limitée, notamment pour des patients présentant des complications de cicatrisation. De plus ces cellules primaires ne sont cultivables que sur une courte durée en raison de leur faible potentiel de prolifération et de leur entrée rapide en sénescence, ce qui peut les rendre inadaptées à des essais fonctionnels plus poussés (Deyrieux and Wilson 2007).

Par conséquent, pour palier à ces limites et disposer de cellules avec une durée de vie illimitée en culture, des lignées de kératinocytes dérivés de patients EBS ont été immortalisés. Le processus

d'immortalisation consiste à utiliser des gènes viraux tels que l'antigène SV40 (virus simien 40), en inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53 et peut induire une activité télomérase dans les cellules infectées. Les premières lignées ont été générées en 1995, à partir de kératinocytes primaires issus de biopsies cutanées de patients EBS porteurs de mutations différentes au sein du gène *KRT5* ou *KRT14* (S. M. Morley et al. 1995). Par la suite, de nombreuses études ont également été menées sur ces lignées de kératinocytes immortalisés (D'Alessandro et al. 2002; Russell et al. 2004; Jean Christopher Chamcheu et al. 2009a; Spörrer et al. 2019; Tan et al. 2021) et ont montré que les phénotypes pathologiques décrits étaient identiques à ceux mis en évidence dans les cultures primaires. Cependant, l'immortalisation des cellules peut altérer les mécanismes physiopathologiques, en raison de l'altération du cycle cellulaire et du processus apoptotique (Lehman et al. 1993; Choi and Lee 2015).

Enfin, au-delà des différentes limitations notables concernant ces différents modèles d'études, ceux-ci ont tout de même permis de fournir des preuves convaincantes d'un lien de causalité entre les mutations au sein des gènes *KRT5* et *KRT14* et divers phénotypes pathologiques de l'EBS (Tableau 5).

## **V. Mécanismes moléculaires et cellulaires associés à l'EBS**

Les phénotypes pathologiques, cellulaires et moléculaires de l'EBS mis en évidence (Tableau 5) reposent sur :

- L'altération du réseau de filaments intermédiaires de kératines et la formation d'agrégats de kératines dans le cytoplasme des kératinocytes basaux
- Une composante inflammatoire
- L'altération de l'expression des protéines de jonctions (au niveau de la JDE)
- L'altération des voies de signalisation associées à la prolifération et migration cellulaire (moins décrites)

**Tableau 5 : Vue d'ensemble des différents modèles d'études de l'EBS (murins et humains) et les phénotypes mis en évidence**

Les altérations cutanées, du réseau de KIF et la formation d'agrégats sont indiquées en rose ; les phénotypes en lien avec la composante inflammatoire sont indiqués en orange ; l'altération de l'expression des protéines de jonction est indiquée en vert ; l'altération des voies de signalisation associées à la prolifération et migration cellulaire est indiquée en bleu.

Référence	Modèle	Mutation(s)	Etat basal / Choc (thermique, osmotique ou mécanique)	Phénotypes mis en évidence
Vassar (1991)	Souris transgénique	cΔ135K14P Mutation négative dominante (forme tronquée de la protéine K14)	Etat basal	- Anomalie de l'architecture épidermique - Cloques - Cytolyse basocellulaire - Altération de la formation des filaments intermédiaires de kératines (KIF) - Formation d'agrégats dans les cellules basales de l'épiderme
Lloyd (1995)	Souris transgénique (129 s/v)	Knock-out K14 (homozygote -/-)	Etat basal	- Cloques généralisées sur la peau - Cytolyse basocellulaire - Formation d'agrégats dans les cellules basales de l'épiderme
Cao (2001)	Souris transgénique inductible C57BL/6	Mutation ponctuelle dans le codon 131 du gène <i>KRT14</i> (Equivalent à la mutation Arg125 chez l'homme) Homozygote -/- ; mtK14neo/CrePR1	Etat Basal	- Cloques sur les pattes et l'abdomen - Amas de kératines et de KIF courts dans les kératinocytes basaux
Peters (2001)	Souris transgénique BaLb/C	K5 -/-	Etat basal	- Epiderme extrêmement fragile - Perte de cytosquelette kératinique - Cytolyse étendue
Roth (2009)	Souris	K5 -/- (modèle de Peters, 2001) K14 -/- (modèle de Lloyd, 1995)	Etat basal	- Augmentation de l'expression de CCL2, CCL20, CCL19, et CXCL16 dans le modèle K5 -/- (Pas de différences observées dans le modèle K14 -/-) - Augmentation du recrutement des cellules de Langherans dans l'épiderme du modèle K5 -/-
Lu (2007)	Souris BALB/C	EBS K5 -/- et K5 +/- (modèles de Peters et al., 2001)	Etat basal	- Augmentation ARNm IL-6 et IL-1β dans les souris K5 -/- - Au niveau protéique, augmentation d'IL-1β dans les souris K5 -/-
Homberg (2015)	Kératinocytes de souris	Dépourvu de Kératine I = KtyI (avec ou sans mutation K14 R131P) Dépourvu de Kératine II = KtyII (avec ou sans mutation K5 E471D)	Etat basal	- Agrégats de kératine dans tout le cytoplasme (pour KtyI -/-) - L'expression de la desmoplakine diminue dans les Ker KtyI -/- (réduction des protéines desmosomales)
Seltmann (2015)	Kératinocytes primaires de souris	Knock-out (sans aucunes kératines) Knock-out (juste avec la réexpression de K5/K14 de manière stable)	Etat basal	- Localisation altérée des hémidesmosomes dans les kératinocytes sans kératines
Bohnekamp (2015)	Drosophiles	Mutations K14 R125C , K14 R125P	Etat basal	- Présence de cloques sur les ailes - Formation d'agrégats étendus dans tout le cytoplasme avec des filaments résiduels occasionnels proches du noyau

Coulombe (1991)	Biopsie de kératinocytes EBS humain	EBS-DM (Mutations K5 ou K14)	Etat basal	- Altération du réseau de KIF
	SSC-13 (epidermal squamous cell carcinoma) transfectées	Mutation Arg-125-Cys (K14)	Etat basal	- Altération du réseau de KIF
Morley (1995)	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB-1 (EBS-DM mutation E475G K5) KEB-2 (EBS-DM mutation E475G K5) KEB-3 (EBS-DM mutation V270M K14) KEB-4 (EBS-DM mutation V270M K14) KEB-7 (EBS-DM R125P K14)	Choc thermique	- Agrégats de kératines - Rupture du réseau de KIF - Fragilité accrue du cytosquelette
Geers (1999)	Kératinocytes humains immortalisés	EBS-DM (Pas d'informations sur les mutations)	Etat basal	- BP180 et BP230 sont colocalisées avec a6b4 dans les amas basaux de types hémidesmosomes en l'absence de plectine
Liovic (2008)	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB-4 (EBS-loc K14 V270M) KEB-7 (EBS-DM K14 R125P)	Choc osmotique	- Augmentation de phospho ERK - Augmentation de phospho p38
Liovic (2009)	Kératinocytes humains immortalisés	KEB-1 (EBS-DM K5 E475G) KEB-7 (EBS-DM K14 R125P) KEB-4 (EBS-loc K14 V270M)	Etat basal	- De nombreuses protéines de jonction sont dérégulées négativement (DSG2, Desmoplakine, Plakoglobin)
D'Alessandro (2002)	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB-1 (EBS-DM mutation E475G K5) KEB-2 (EBS-DM mutation E475G K5) KEB-3 (EBS-DM mutation V270M K14) KEB-4 (EBS-DM mutation V270M K14) KEB-7 (EBS-DM R125P K14)	Choc osmotique	- Formation d'agrégats de kératines en périphérie cellulaire - Fragmentation des filaments intermédiaires de kératines
				- Augmentation de phospho JNK

<i>Russel (2004)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	Mutation K14 EBS-DMR125P	Etirement mécanique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formation d'agrégats de kératine, apparus spontanément en périphérie cellulaire</li> <li>- Desmoplakine très dispersée dans les régions où la fragmentation des KIF est élevée</li> <li>- L'étirement mécanique induit la formation d'anneaux de kératines où sont associés les composants de la jonction hémidesmosomes et desmosomes</li> </ul>
<i>Chamcheu (2009, 2010)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	Mutation EBS-loc K5 V186L	Stress thermique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'agrégats de kératines, principalement en périphérie cellulaire</li> </ul>
<i>Chamcheu (2011)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	Mutation EBS-DME475G K5	Stress thermique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'agrégats de kératine, principalement en périphérie cellulaire</li> <li>- Voies MAPK altérées</li> <li>- Augmentation de phospho p-38</li> <li>- Augmentation du niveau de protéine JNK 1/2</li> <li>- Augmentation de phospho ERK 1/2</li> </ul>
<i>Russel (2010)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB7 (EBS-DM K14 R125P) (Caractérisés par Morley et al. 2003)	Stress mécanique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de p-ERK</li> </ul>
<i>Bériault (2012)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés transfectés	Mutation K14 EBS-DMR125P	Choc osmotique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'agrégats de kératines dans le cytoplasme</li> </ul>
<i>Wagner (2013)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	Mutation EBS-DM K14 R125P	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de p-JNK</li> </ul>
<i>Wally (2013)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB7 (EBS-DM K14 R125P)	Choc thermique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation d'IL-1<math>\beta</math></li> <li>- Augmentation de p-JNK</li> <li>- Augmentation des agrégats de kératines</li> </ul>
<i>Lettner (2013)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB-7 EBS-DM (K14 R125P)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de l'expression de CXCL1, CXCL8/IL-8, CXCL14</li> </ul>
	Liquides de cloques	EBS K14 (pas de détails sur la mutation)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de l'expression de CXCL8/IL-8</li> </ul>
<i>Annicharico (2015)</i>	Sérums de patients	15 patients EBS (7 hommes et 8 femmes, environ 16 ans) (Pas de détails sur les mutations)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation des taux sériques d'IL-1b, IL-6 et d'IFN<math>\gamma</math></li> </ul>
<i>Ujii (2017)</i>	Echantillon sérum de patients et échantillons de peau	9 patients EBS (Pas de détails sur les mutations)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation des taux de HBMG1 et CXCL12 dans le sérum de patients EBS</li> <li>- Diminution de l'expression de CCL21</li> <li>- HBMG1 et CXCL1 sont majoritairement retrouvés dans l'épiderme supérieur (au dessus de la couche basale)</li> </ul>
<i>Alexeev (2017)</i>	Fluides de cloques	10 patients EBS (de 2 ans à 52 ans) (Pas de détails sur les mutations)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taux élevés de CCL27, CCL25, famille gro (CXCL1, CXCL2, CXCL3), CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL4, CCL15, CCL7, CCL5, IL-1<math>\beta</math>, IL-2 et IL-6</li> <li>- Diminution taux de TNF<math>\alpha</math></li> <li>- Les chimiokines dérivées du fluide de cloque EBS, augmente la migration des leucocytes LT CD45+/CXCR2+</li> </ul>
	Biopsie de peau	EBS (pas d'informations sur les mutations)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infiltration de leucocytes dans les zones sans cloques</li> <li>- Infiltration de leucocytes LT CD45+/CXCR2+ dans les zones avec cloques</li> </ul>
<i>Spörrer (2019)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	Mutation K5 E477K Mutation K14 R125C	Stress thermique ou chimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'agrégats de kératines</li> <li>- Augmentation d'IL-1<math>\beta</math> (au niveau protéique)</li> </ul>
<i>Castela (2019)</i>	Patients EBS	EBS-gen sévère Diverses mutations KRT5 et KRT14	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation d'IL-8, CXCL9 et CXCL10</li> <li>- Infiltrat immunitaire de cellules Th17 (augmentation IL17, IL21 et IL22)</li> </ul>
<i>Tan (2021)</i>	Kératinocytes EBS immortalisés	KEB7 (EBS-DM K14 R125P)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation ERK 1/2</li> <li>- Agrégats de kératines</li> </ul>
			+ EGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation encore plus importantes d'agrégats de kératines</li> </ul>
<i>Lee (2022)</i>	Echantillons de peau EBS	EBS K5 et K14 Au niveau de site de vésicules aigüe Au niveau de site sans vésicules (Pas d'informations sur toutes les mutations)	Etat basal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Profil transcriptomique mettant en évidence : IL-8 signaling, IL-10 signaling, I-L6 signaling, TLR signaling, STAT3 signaling, NFkB signaling, TNFR2 signaling</li> <li>Et une augmentation de IL-1<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF<math>\alpha</math>, IFN<math>\gamma</math></li> </ul>

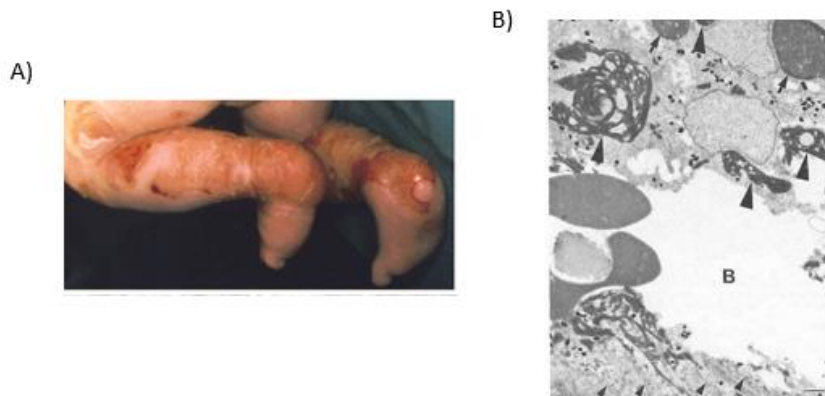


## A. Conséquences cellulaires et moléculaires liées aux mutations *KRT5* et *KRT14*

### a) Agrégats de kératines

Dans la plupart des cas d'EBS, il a été observé de manière caractéristique par microscopie électronique, des agrégats de kératines dans les kératinocytes basaux des patients (Anton-Lamprecht et Schnyder, 1982) (figure 10). De plus, chez les patients EBS, les cellules de la couche basale présentent une fragilité en cas de traumatisme physique léger ou en présence de chaleur.

Ces différentes observations ont ainsi attiré l'attention pour la première fois sur le rôle des kératines dans l'EBS (Anton-Lamprecht and Schnyder 1982; Ishida-Yamamoto et al. 1991; Kitajima, Inoue, and Yaoita 1989) suggérant que la fonction globale des kératines épidermiques était donc d'assurer le renforcement de l'épiderme et le maintien de l'intégrité cellulaire sous stress mécanique et thermique.



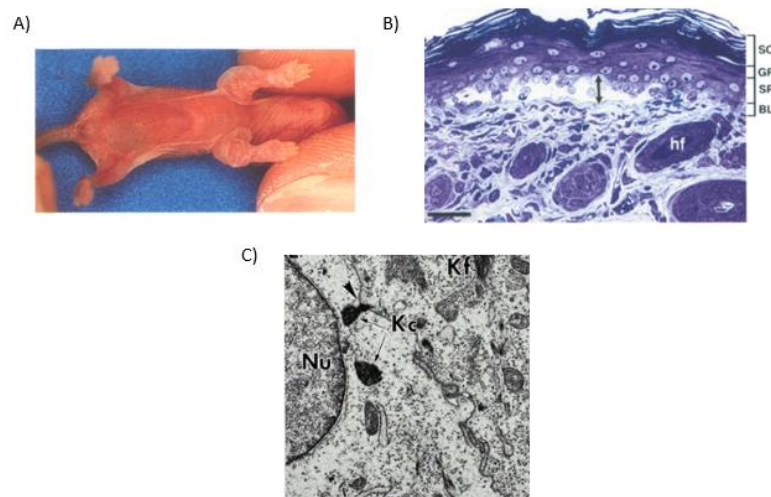
**Figure 10 : Agrégats de kératines, dans une biopsie de patient EBS-DM**

(A) Patient EBS-DM (avec une mutations *K14 R125P*). Présence de nombreuses bulles épidermiques sévères. *Issu de (Morley et al. 2003a)*

(B) Microscopie électronique, sur une biopsie de patients EBS-DM. Des amas de filaments intermédiaires de kératines (KIF) ronds anormaux (flèches) et un rassemblement de formes irrégulières de KIF épais (grandes points de flèche) sont observés. Zone de la membrane basale indiquée par des petites pointes de flèche. B : Cavité de la bulle intra-épidermique. Bar 1µm. *Issu de (Ishida-Yamamoto et al. 1991)*

Par la suite, diverses expériences approfondies, dans des conditions normales (P A Coulombe et al. 1991) ou de stress (D'Alessandro et al. 2002 ; Spörrer et al. 2019) ont pu fournir des preuves convaincantes d'un lien de causalité entre les mutations au sein des gènes *KRT5* ou *KRT14* et le défaut d'assemblage des kératines 5 et 14. En effet, ce défaut engendre une mauvaise conformation des filaments intermédiaires de kératines et donc un mauvais assemblage, entraînant la formation d'agrégats de kératines. L'agrégation de kératines reflète ainsi une inefficacité dans la construction et le maintien d'un réseau cytosqueletique robuste dans les kératinocytes basaux de l'épiderme.

Dès le début des années 1990, la génération de divers modèles de souris transgéniques a permis de mettre en évidence : des anomalies au niveau de l'architecture épidermique, la présence de bulles cutanées, une cytololyse basocellulaire et une altération de la formation des filaments intermédiaires menant à la formation d'agrégats de kératines dans les cellules basales de l'épiderme (figure 11) (Vassar et al. 1991 ; Lloyd et al. 1995 ; Cao et al. 2001 ; Peters et al. 2001).

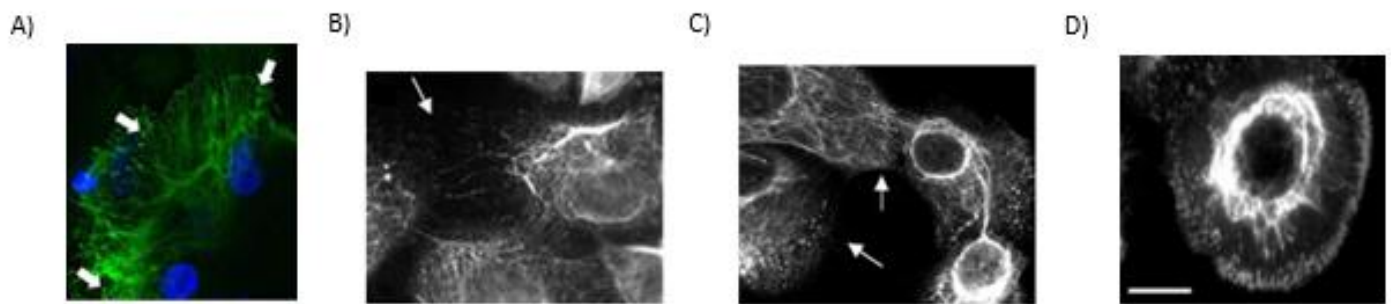


**Figure 11 : Modèles de souris transgéniques et mise en évidence d'agrégats de kératines**

- (A) Souris homozygote (*K14*<sup>-/-</sup>), présentant des bulles à la surface du corps, dues à la cytololyse de la couche basale de l'épiderme. Souris âgée de 2 jours, avec de nombreuses boursoufflures sur les membres antérieurs et les pattes ; se produisant fréquemment en réponse à des traumatismes physiques légers. *Issu de (Lloyd et al. 1995)*
- (B) Coupe (0,75µm) d'une biopsie de peau de souris, prélevée à l'âge de 2 jours. Formation d'une bulle intra basale, entraînant la séparation du derme sous-jacent (flèche double) De bas en haut : B, couche basale ; S, couche épineuse ; G, couche granuleuse ; S, couche cornée ; hf, follicule pileux. Barre : 30 µm. *Issu de (Lloyd et al. 1995)*
- (C) Peau de souris transgéniques (mutation pour la kératine *K14*). Présence d'amas de kératines et des filaments de kératines courts dans les kératinocytes basaux. Kc, amas de kératine ; Kf, filaments de kératine ; Nu, noyau. Barre : 1 µm. *Issu de (Cao et al. 2001)*

Afin d'étudier le rôle, la localisation et la dynamique des agrégats de kératines dans les kératinocytes EBS, des modèles de kératinocytes immortalisés dérivés de patients ont été utilisés (figure 12).

Dans des conditions de stress thermique, osmotique ou mécanique, il a été mis en évidence la présence d'agrégats de kératines en périphérie cellulaire et une fragmentation du réseau de filaments intermédiaires de kératines (S. M. Morley et al. 1995 ; Russell et al. 2004 ; Jean Christopher Chamcheu et al. 2009) (Figure). De plus l'apparition d'agrégats a été décrite comme un évènement réversible, car ceux-ci disparaissent après un temps de récupération (Beriault et al. 2012). En effet, les agrégats de kératines ne sont pas des structures statiques, ce sont des assemblages transitoires et dynamiques. Ces derniers se forment près de la membrane plasmique et se déplacent ensuite vers le centre de la cellule, où ils se désagrègent. Ils sont responsables de la perte du maintien du réseau de filaments intermédiaires de la cellule.



**Figure 12 : Formation d'agrégats dans les kératinocytes immortalisés EBS, après stress thermique, osmotique ou mécanique**

(A) Le stress thermique a induit la formation d'agrégats de kératines dans les Ker-EBS-sevère immortalisés (K5 p.475Gly>Glu). *Issu de (J.C. Chamcheu et al. 2010)*

(B) Et (C) Le stress osmotique a induit des effets différents dans 2 lignées de Ker-EBS. Une fragmentation des filaments de kératines a été observée après 4h de récupération dans la lignée EBS-DM mutation E475G K5 (B) et des agrégats périphériques clairs ont été observés dans la lignée EBS-DM R125P K14 (C) Barre, 10  $\mu\text{m}$ . *Issu de (Morley et al. 2003a)*

(D) L'étirement mécanique a induit une fragmentation des filaments intermédiaires de kératines dans la lignée EBS-DM R125P K14. Après 120 minutes d'étirement, les cellules présentent des réseaux de kératines gravement perturbés, les filaments restants étant concentrés autour du noyau. Barre, 10  $\mu\text{m}$ . *Issu de (Russell et al. 2004)*

#### b) Altération de l'expression des protéines de jonction (au niveau de la JDE)

L'une des fonctions des filaments intermédiaires de kératines (KIF) est de participer à l'adhésion des kératinocytes basaux à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des hémidesmosomes, et au contact cellule-cellule via les desmosomes (Seltmann et al. 2013 ; Tsuruta et al. 2011).

Bien que l'EBS soit associée à la perturbation du réseau de KIF, l'expression de protéines hémidesmosomales/desmosomales peut être altérée, lorsqu'il y a des mutations au sein des gènes *KRT5* et *KRT14* (Spörrer et al. 2019).

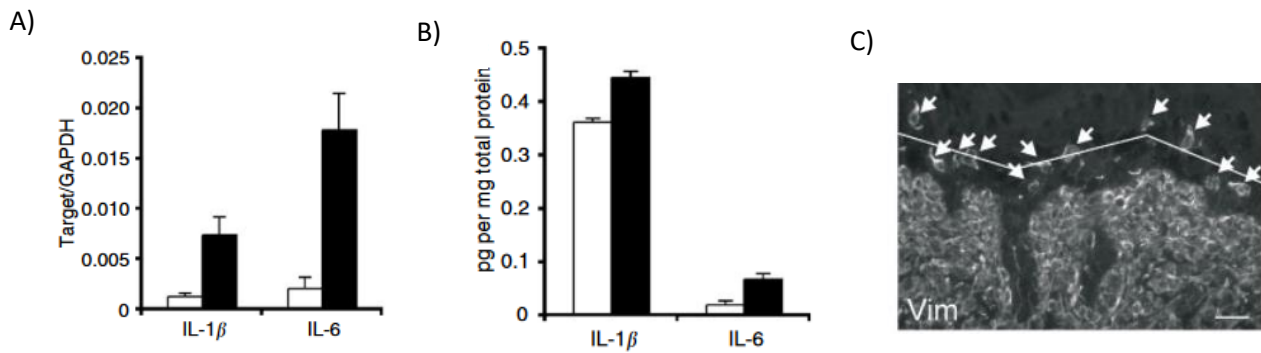
En effet des études effectuées sur des modèles murins (souris) ou sur des modèles de kératinocytes EBS immortalisés, ont pu mettre en évidence que de nombreuses protéines de la JDE étaient altérées ou que leurs expressions étaient régulées négativement, telles que la desmoplakine, la plakoglobine ou BP180 et BP230 (Liovic et al. 2009; Homberg et al. 2015; Russell et al. 2004; Geerts et al. 1999).

Les résultats de ces différentes études s'ajoutent aux preuves croissantes que la présence d'un réseau robuste et organisé de KIF, contribue activement à la stabilité des desmosomes et des hémidesmosomes auxquels ces filaments de kératines 5 et 14 se connectent. Cependant les mécanismes exacts par lesquels les kératines mutées provoquent cela, restent à étudier.

#### c) Composante inflammatoire

L'agrégation de kératines et la fragmentation du réseau de filaments intermédiaires de kératines étant décrite comme la principale cause de la pathogénèse moléculaire de l'EBS (Pierre A. Coulombe and Lee 2012), la manifestation directe d'anomalies cutanées, telles que les bulles et érosions, peut-être due à une inflammation chronique et l'activation du système immunitaire. (Bardhan et al. 2020 ; Nguyen and Soulika 2019; Ujiie et al. 2017), dont le processus de cicatrisation est orchestré par la sécrétion de cytokines, y compris une famille de petites protéines (8 à 15kD) appelées chimiokines.

En effet, dès les années 2000, des études sur des modèles de souris ont permis de mettre en évidence un niveau accru de certaines chimiokines (CCL2, CCL20, CCL19 et CXCL16) connues pour attirer les cellules de Langherans dans la peau, mais également une augmentation des niveaux d'expression de l'IL6 et de l'IL-1 $\beta$  (figure 13) (Lu et al. 2007 ; Roth et al. 2009).



**Figure 13 : Marqueurs pro-inflammatoires détectés dans des souris K5<sup>-/-</sup>**

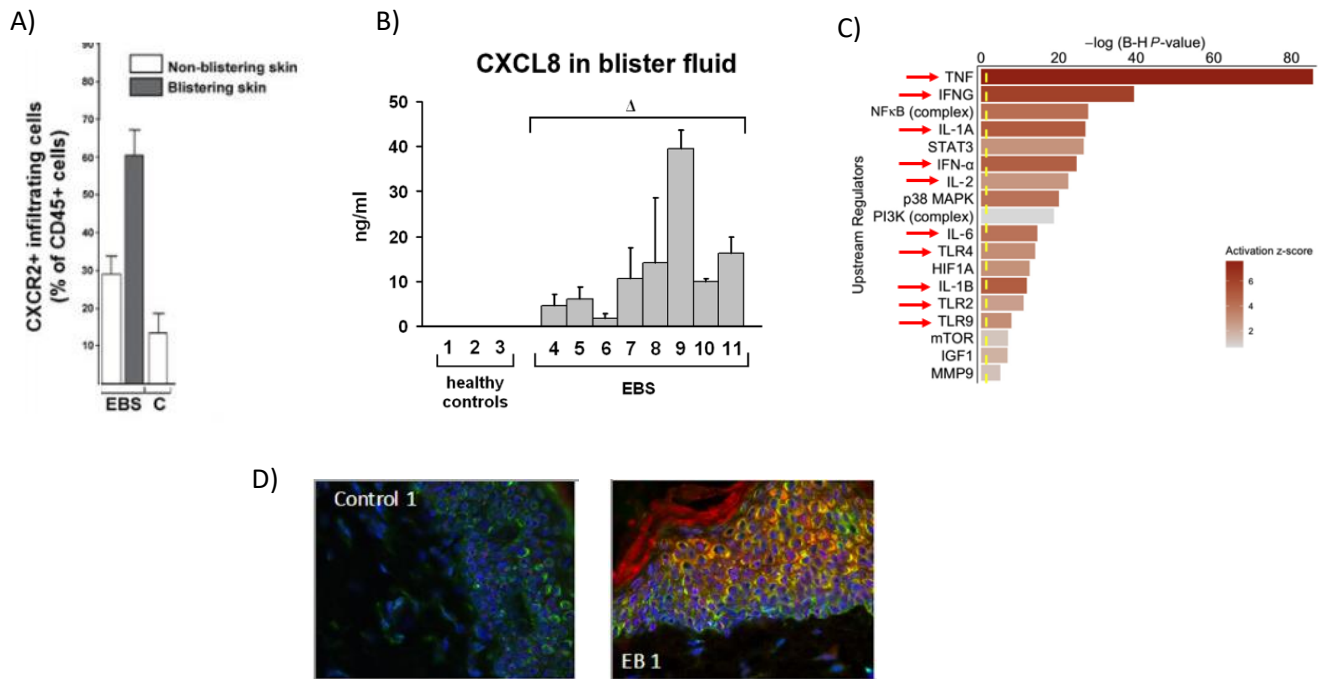
(A) et (B) Augmentation du niveau d'expression d'IL-1β et IL6, au niveau ARN (A) et protéique (B).

Barre blanche : WT ; Barre noire : K5<sup>-/-</sup>. Issu de (Lu et al. 2007)

(C) La coloration à la α-Vimentine a révélé une augmentation du nombre de cellules de Langerhans (qui serait corrélée à une augmentation de l'expression de CCL2, CCL19 et CCL20) dans l'épiderme lésionnel de la peau de souris K5<sup>-/-</sup>. Les cellules de Langerhans sont marquées par des flèches. Barre : 20 μm. Issu de (Roth et al. 2009)

Pour appuyer ces premières observations, il a été montré une augmentation significative du niveau d'expression de diverses cytokines/chimiokines, telles que l'IL-1β, IL6, CXCL8/IL8, CXCL1, CXCL10, CCL2, CCL5 mais également d'IFNγ dans les fluides contenus dans les bulles de patients EBS ; les ampoules précoces contenaient des niveaux plus élevés de certaines de ces chimiokines que les lésions avancées (98h après leur apparition) (figure 14) (Ujii et al. 2017 ; Annicchiarico et al. 2015 ; Alexeev et al. 2017 ; Lettner et al. 2013). De plus, une augmentation de leucocytes (LT CD45+/CXCR2+) au niveau des zones cloquées a été observée à partir de biopsies de ces patients (Alexeev et al. 2017). Une autre étude, utilisant également des fluides de bulles de patients EBS, a permis de mettre en évidence la présence de niveau élevé d'IL8 (un chimioattractant des neutrophiles produit par les kératinocytes et les macrophages), et de marqueurs de la réponse immunitaire Th17 (IL17, IL21, IL22). De plus, les biopsies cutanées (peau boursouflée) provenant de ces mêmes patients ont montré une augmentation significative du nombre de cellules immunopositives CXCL9 et CXCL10 (Castela et al. 2019).

Cela a été appuyé et confirmé par une analyse transcriptomique effectuée à partir d'échantillons de peau de patient EBS, prélevés sur des sites de vésicules aigües ou non (G. H. Lee et al. 2022).



**Figure 14 : Marqueurs pro-inflammatoires détectés dans des kératinocytes EBS immortalisés et fluides de bulles de patients EBS**

- (A) Une augmentation de cellules infiltrantes CD45+/CXCR2+ est observée dans la peau de patient EBS où se situent des bulles. *Issu de (Alexeev et al. 2017)*
- (B) Les concentrations de CXCL8/IL-8 sont fortement augmentées dans les liquides de bulles de patients EBS. *Issu de (Lettner et al. 2013)*
- (C) Une analyse transcriptomique a mis en évidence une augmentation significative de diverses cytokines pro-inflammatoires, dans l'épiderme de patient EBS, où se situent des bulles. *Issu de (G. H. Lee et al. 2022)*
- (D) Augmentation des cellules CXCL9+ (colorées en vertes) et CXCL10+ (colorées en rouge). Les cellules exprimant les deux chimiokines apparaissent en jaune. *Issu de (Castela et al. 2019)*

Dans l'EBS, le déséquilibre de plusieurs cytokines et chimiokines mis en évidence à travers diverses études, suggère donc que l'EBS serait considérée comme des troubles inflammatoires systémiques plutôt qu'une maladie limitée à la peau. Cependant le rôle des celles-ci dans la pathogénèse n'a pas été décrit.

#### d) Altération des voies de signalisation

Des études menées à partir de kératinocytes immortalisés EBS ont fait état d'une migration accrue de ces cellules par rapport aux kératinocytes contrôles, ainsi qu'une diminution de la prolifération (S. m. Morley et al. 2003b ; Jean Christopher Chamcheu et al. 2009). De ce fait, les voies de signalisation sous-jacentes à ces phénotypes cellulaires ont également été étudiées. Les études menées, principalement sur des kératinocytes EBS immortalisés soumis à différents stress (osmotiques, thermiques, mécaniques), ont ainsi permis de mettre en évidence de manière générale, une régulation à la hausse des voies de signalisation médiées par les voies constitutives de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) et plus précisément une augmentation de la phosphorylation de ERK, JNK et p38. (D'Alessandro et al. 2002 ; Liovic et al. 2008 ; Russell, Ross, and Lane 2010 ; Jean Christopher Chamcheu, Navsaria, et al. 2011a ; Wagner et al. 2013 ; Sawant et al. 2018).

Ces observations permettent ainsi de montrer que les kératinocytes de patients EBS présentant des mutations au sein des gènes *KRT5* ou *KRT14*, sont soumis à un stress intrinsèque via les voies JNK1 et JNK2 (JNK1/2, également connues sous les noms de MAPK8 et MAPK9, respectivement), protéines p38, et ERK1 et ERK2 (ERK1/2, également connues sous les noms de MAPK3 et MAPK1, respectivement) (Russell, Ross, and Lane 2010).

Cependant, le lien exact entre l'activation de ces voies, et les défauts de migration et de prolifération cellulaires observés dans l'EBS, n'est à ce jour pas connu.

## **VI. Stratégies thérapeutiques**

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour l'EBS. Les seuls traitements dont les patients peuvent bénéficier sont essentiellement symptomatiques. Cependant, grâce à différentes études menées ces dernières années ayant permis d'identifier et de mieux comprendre les mécanismes pathologiques impliqués, de nouvelles approches thérapeutiques sont explorées telles que : (1) la possibilité de fournir une protéine fonctionnelle en corrigeant le défaut génétique primaire, au niveau de l'ADN ou de l'ARNm (2) l'utilisation de petites molécules pharmacologiques, afin de modifier ou restaurer les phénotypes pathologiques, permettant de traiter les séquelles de la maladie et visant ainsi à améliorer la qualité de vie des patients. Toutes les approches sont listées dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Vue d'ensemble des études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins ou humains**

Références	<i>In vivo</i>	Traitements/Molécules testées	Correction de phénotypes mis en évidence
Weiner (2004)	<i>In vivo</i> (patients EBS)	<b>Tétracycline</b> (Essai clinique randomisé croisé et double aveugle) (Traitement systémique)	- Diminution des lésions cutanées
Lu (2007)	<i>In vivo</i> (souris EBS K5 -/-)	<b>Doxycycline</b> (Traitement systémique des femelles gestantes K5 -/- à partir de E.13,5)	- Augmentation de la survie des souris jusqu'à 8h - Diminution ARNm IL-1 $\beta$
Abitbol (2009)	<i>In vivo</i>	<b>Toxique Botulique</b> (Injection dans le derme profond à moyen, sur face plantaire du pied)	- Diminution des lésions cutanées
Swartling (2010)	<i>In vivo</i> (Patients EBS-DM et EBS-loc)	<b>Toxique Botulique</b> (Injection intradermique, au niveau du pied)	- Diminution légère des cloques - Diminution de la douleur
Shin (2011)	<i>In vivo</i>	<b>Kaloderm</b> (Greffon de kératinocytes allogéniques)	- Diminution des défauts cutanés (de 50%) - Réépithélialisation rapide
Wally (2013)	<i>In vivo</i> (patients EBS)	<b>DIACEREIN</b> (Traitement topique)	- Diminution des cloques
Holahan (2016)	<i>In vivo</i> (Patient EBS 6 ans)	<b>Toxique Botulique</b> (Injection intradermique, au niveau du pied)	- Diminution de la douleur - Diminution des cloques - Moins d'hyperhidrose
Wally (2018)	<i>In vivo</i> (Patients EBS-gen sévère KRT5 ou KRT14)	<b>DIACEREIN</b> (Traitement topique)	- Diminution des cloques
Castela (2019)	<i>In vivo</i> (Patients EBS-gen sévère KRT5 ou KRT14)	<b>Apremilast</b> (Traitement topique)	- Diminution des cloques - Diminution des douleurs abdominales/diarrhées
Lee (2022)	<i>In vivo</i>	<b>Sirolimus</b> (Inhibiteur mTor)	- Diminution des cloques - Amélioration de la marche - Diminution des douleurs (pieds)

Référence	Modèles <i>In vitro</i>	Traitements/Molécules testées	Etat basal / Choc (thermique, osmotique ou mécanique)	Correction de phénotypes mis en évidence
Chamcheu (2009)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés)	<b>TMAO</b>	Stress thermique	- Diminution de l'agglutination des filaments induite par le stress thermique - Diminution des agrégats de kératines
Chamcheu (2011)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés)	<b>TMAO et PBA</b>  <b>MG132</b> (inhibiteur du protéasome) <b>SP600125</b> (inhibiteur c-jun) <b>SB203850</b> (inhibiteur p38) <b>PD98059</b> (inhibiteur p-ERK)	Stress thermique	- Diminution des niveaux de p-JNK, p-ERK, p-p38 - Diminution des agrégats de kératines  - Diminution des agrégats de kératines
Atkinson (2011)	<i>In vitro</i>	<b>siRNA</b> (spécifique de la mutation EBS S191P KRT5)		- Diminution des agrégats de kératines
Wally (2013)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés EBS-DM R125P)	- <b>Anticorps bloquant IL-1<math>\beta</math></b> - <b>Diacerein</b>	Choc thermique	- Diminution de l'expression d'IL-1 $\beta$ - Diminution de p-JNK - Diminution des agrégats de kératines
Aushev (2017)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés)	<b>TALEN</b>	Choc thermique	- Diminution de la formation d'agrégats de kératines - Amélioration de la stabilité du réseau de filaments intermédiaire de kératines
Kocher (2017)	<i>In vitro</i> Kératinocytes EBS (c.1231 G>A KRT14)	<b>CRISPR-Cas9</b>	Choc thermique	- Diminution des agrégats de kératines



Pekin (2019)	<i>In vitro</i>	<b>Trans-épissage</b>		- Diminution des agrégats de kératines - Diminution de la signalisation JNK (médiée par IL-1β)
Spörrer (2019)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés)	<b>PBA</b>	Stress thermique et chimique	- Diminution d'IL-1b - Diminution des agrégats de kératines
Tan (2021)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés)	<b>Afatinib</b>		- Diminution des agrégats de kératines - Diminution de p-ERK1/2 - Augmentation des taux de desmoplakine et E-Cadherin - Augmentation de la connectivité cellules-cellules
		<b>U0126</b> (inhibiteur MEK1 et MEK2) <b>AG1478</b> (inhibiteur EGFR)		- Diminution des agrégats de kératines - Diminution de p-ERK1/2
		<b>GW799251</b> (inhibiteur EGFR/ErbB2) <b>GW7702491</b> (inhibiteur TIE2/VEGFR2) <b>GW4073231</b> (inhibiteur cRaf) <b>GSK1007102B</b> (inhibiteur Akt1)		- Diminution des agrégats de kératines
Rietscher (2022)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes EBS immortalisés)	<b>PKC142</b> (inhibiteur PKA, PKC, Akt)		- Diminution des agrégats de kératines - Diminution de p-ERK1/2
Catteneo (2023)	<i>In vitro</i> (Kératinocytes primaires EBS c.475/495del24 exon 1 <i>KRT14</i> )	<b>CRISPR-Cas9</b> (Edition spécifique de l'allèle mutée)		
			Choc thermique	- Diminution des agrégats de kératines - Disparition de cloques intraépidermiques (observée grâce à la génération d'équivalents cutanés)

## A. Approches symptomatiques

### a) Pansements

Les soins de soutien pour protéger la peau des bulles, reposent sur l'utilisation de pansements appropriés qui n'endommageront pas davantage la peau et favoriseront la cicatrisation des plaies ouvertes, ainsi que la prévention et le traitement des infections secondaires (Proding et al. 2019).

Les pansements utilisés comportent généralement trois couches : 1) un pansement primaire non adhésif (par exemple à base de silicone, comme le Mepitel), parfois imprégné d'une fine couche de vaseline ou d'antibiotiques topiques (par exemple, la pommade à la mupirocine) selon les indications ; 2) une seconde couche de pansement en mousse et/ou rouleaux de gaze (par exemple Kerlix<sup>®</sup>), qui assure la stabilité de la couche primaire et permet l'ajout de rembourrage ; 3) une couche tertiaire, composée de gaze en tube (telle que BandNet<sup>®</sup>), dotée de certaines propriétés élastiques pour assurer l'intégrité du pansement. D'autre part, certains patients peuvent bénéficier également d'un saupoudrage des zones touchées avec de la fécule de maïs ou de Zeasorb<sup>®</sup> pour aider à absorber l'humidité et réduire la friction sur la peau, suivi d'un simple pansement (à une seule couche) (El Hachem et al. 2014; So and Teng 1993-2024). D'autre part, des antibiotiques topiques et/ou systémiques peuvent également être utilisés ainsi que des pansements antimicrobiens imprégnés d'argent, d'iode, de bleu violet de gentiane ou de miel de qualité médicale pour réduire la colonisation bactérienne et favoriser la cicatrisation des plaies. Toutefois, ces pansements sont généralement beaucoup plus coûteux.

Bien qu'il existe une variété de pansements appropriées comme thérapies de soulagement des atteintes cutanées, il peut être difficile d'entretenir les pansements notamment chez les enfants compte tenu des nombreux mouvements. De plus la cicatrisation des plaies chez les patients atteints l'EBS reste un défi.

#### b) Thérapie cellulaire

Une autre approche repose sur la thérapie cellulaire qui consiste en une greffe de cellules afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe.

En 1999, une première approche de thérapie cellulaire a été rapportée chez un nouveau-né atteint d'EBS (Douwling-Maera), à partir d'un substitut cutané bi-couche Apligraf<sup>®</sup> issu de la bio-ingénierie et approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis (Falabella et al. 1999). Celui-ci est formé d'une couche construite à partir de fibroblastes néonataux dérivés de prépuces néonatales dans une matrice de collagène bovin de type I (constituant l'équivalent dermique) et une couche composée de kératinocytes épidermiques néonataux dérivés du prépuce humain (constituant l'équivalent dermique); il permet de fournir des facteurs de croissance provenant à la fois des cellules épidermiques et des fibroblastes afin de stimuler la cicatrisation. Vingt jours après application de ce substitut cutané sur environ 40% de la surface corporelle du nourrisson, il été rapporté une cicatrisation rapide sur tous les sites de greffe malgré le développement de bulles généralisées ailleurs. Ces résultats tout de même prometteurs suggèrent que l'Apligraf pourrait être efficace pour une cicatrisation plus rapide des plaies aiguës d'EBS et empêcher la transformation de ces plaies en plaies chroniques à court terme.

Enfin, en 2011, une équipe a également effectué une approche de thérapie cellulaire à partir d'un produit de thérapie cellulaire allogénique Kaloderm<sup>®</sup> utilisé pour la cicatrisation des plaies (Shin et al. 2011). Ce produit est composé de kératinocytes cultivés, provenant de prépuce d'un nourrisson et contient de nombreux facteurs de croissance et cytokines. Ces substituts cutanés ont été appliqués sur des lésions non épithélialisées d'un nourrisson 12 jours après sa naissance, permettant de réduire de moitié les défauts cutanés et une réépithélialisation presque totale 14 jours après l'application, à l'exception de quelques ampoules récurrentes. Cependant aucun suivi à long terme n'a été signalé.

#### B. Etudes visant à corriger les phénotypes cellulaires et moléculaires de l'EBS

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'EBS, ainsi que les progrès des technologies moléculaires, ouvrent la voie à de nombreuses approches thérapeutiques (Proding et al. 2019 ; Has, Liu, et al. 2020).

En effet, en ciblant la physiopathologie connue de la maladie, des études ont porté sur des techniques d'édition du génome, ciblant l'ADN ou l'ARN, et sur l'utilisation de molécules visant à corriger les phénotypes cellulaires et/ou moléculaires, *in vitro* ou *in vivo*, menant pour certaines études, au lancement d'essais cliniques. Toutes les approches sont listées dans le tableau 6.

### **1. Thérapies ciblant l'ADN**

Différentes stratégies visant à remplacer, inactiver ou réparer le gène affecté ont pu être menées dans des cellules de la peau grâce à des stratégies d'édition du génome.

En 2017, une équipe de recherche a établi une stratégie d'édition de gènes basée sur la technologie CRISPR/Cas9 (CRISPR-associated protein 9), dans une lignée cellulaire de kératinocytes humains EBS porteurs d'une mutation dans l'exon 6 du gène *KRT14* (c.1231 G>A) (Kocher et al. 2017). Grâce à cette approche, l'efficacité de correction génique par recombinaison homologue était de 16%, sans effets hors cible. Les cellules corrigées ont montré une restauration de l'expression de kératine 14 à un niveau normal ; de plus un test par choc thermique a pu confirmer une correction au niveau fonctionnel, avec une absence d'agrégats de kératines, indiquant que la correction a permis une restauration de la stabilité du réseau de filaments intermédiaires de kératines. Cette étude offre ainsi une option de traitement causal pour l'EBS.

Un autre objectif de correction génique repose sur le développement de stratégie impliquant seulement la perturbation de l'allèle mutant tout en conservant l'allèle de type sauvage intact. Pour cela une approche a été menée à partir d'utilisation de nucléases programmables telles que les Nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN, Transcription Activator-Like Effector Nucleases) (Aushev et al. 2017). Dans cette étude, des TALENs ciblant l'exon 1 du gène *KRT5* ont été utilisés pour générer une cassure double brin, induisant des indels (insertions-délétions) au niveau du site de coupure et l'apparition d'un codon stop prématuré. Cela a eu pour conséquence l'inactivation de l'allèle mutant, et de ce fait, la protéine mutée n'est pas traduite. D'un point de vue fonctionnel, l'inactivation de l'allèle mutant *KRT5* a entraîné l'élimination d'anomalies structurales des filaments intermédiaires de kératines et de formations d'agrégats en cas de stress.

Plus récemment, une étude utilisant la technologie CRISPR/Cas9 a également visé à perturber de manière spécifique l'allèle mutant à partir de kératinocytes EBS immortalisés porteurs de la mutation hétérozygote c.449T>C au sein du gène *KRT5*, grâce à la conception d'un ARN guide permettant de guider la protéine Cas9 pour induire un clivage de l'ADN de l'allèle mutant uniquement ; cela entraîne la réparation d'ADN par NHEJ (Non-homologous end joining), induisant l'apparition d'indels et ainsi une non traduction de la protéine mutée (Bchetnia, Dionne Gagné, et al. 2022). Les résultats ont montré une absence totale du transcrit mutant, sûrement due à la dégradation de l'ARN, indiquant

une inactivation spécifique de l'allèle mutant. De plus, la correction génique a permis de restaurer un réseau de filaments kératiniques normal, avec une absence d'agrégats de kératines, ainsi qu'une distribution normale de protéines desmosomales (desmoplakin 1/2 et E-cadherin) sur la membrane plasmique.

Enfin, en 2024, cette même approche a été menée dans kératinocytes immortalisés issus de kératinocytes primaires de patients EBS porteurs d'une mutation dominante hétérozygote (c.475/495del21) dans l'exon 1 du gène *KRT14*. (Cattaneo et al. 2024). La correction génique a permis de perturber l'expression de l'allèle mutant *KRT14* avec une efficacité allant jusqu'à 94%, sans affecter l'allèle de type sauvage. D'un point de vue phénotypique, il a été observé une restauration fonctionnelle du réseau de filaments intermédiaires de kératines. Après récupération à l'issue d'un choc thermique, les agrégats ne persistaient plus dans le cytoplasme des cellules corrigées. De plus, des équivalents de peau humaine ont été générés à partir des kératinocytes immortalisés EBS corrigés, montrant qu'aucune bulle n'était observée dans l'épiderme généré. Ainsi, cette approche ayant permis de corriger l'expression de l'allèle mutant *KRT14*, a ainsi permis de restaurer entièrement un réseau de filaments intermédiaires fonctionnel, composé de kératines 5 et K14.

## **2. Thérapies ciblant l'ARN**

D'autres stratégies sont exploitées pour moduler directement l'ARNm, afin de restaurer l'expression d'une protéine fonctionnelle. Ces approches ciblant l'ARN, peuvent ainsi ouvrir la voie à une série d'applications thérapeutiques, notamment grâce à la modulation de l'ARNm mutant par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) ou de trans-épissage d'ARN médié par spliceosome (SMaRT).

En effet, les siRNA qui sont de petites molécules ARN, qui se lient à l'ARNm mutant conduisant à sa dégradation après transcription, offre une voie thérapeutique potentielle dans l'EBS en inhibant spécifiquement l'ARNm mutant sans affecter l'allèle fonctionnel.

Sachant que les kératines sont exprimées à partir des deux allèles et qu'un seul allèle fonctionnel suffit à maintenir un épiderme structurellement stable (Chan et al. 1994), le développement d'un siRNA a été conçu pour inhiber spécifiquement l'ARNm codant pour la protéine K5 mutée impliquée dans l'EBS, (avec un effet négligeable sur l'expression de la kératine 5 sauvage). Le traitement de cellules épithéliales avec un siRNA ciblant spécifiquement l'ARN muté (p.Ser181Pro) a permis d'améliorer considérablement le cytosquelette et d'inverser de manière significative le phénotype d'agrégation des filaments intermédiaires de kératines (Atkinson et al. 2011).

La faisabilité d'une autre approche basée cette fois sur le trans-épissage d'ARN médié par spliceosome (SMaRT) a été également démontrée dans l'EBS dans deux études. Cette technologie permet de remplacer une séquence d'ARNm mutée par une copie fonctionnelle délivrée par une molécule de réparation d'ARN modifiée. Une première étude menée en 2010, à partir de kératinocytes humains immortalisés provenant de patient EBS (mutation *KRT14*, R125P), a permis de montrer que la stratégie de transépissage entraînait une réduction moyenne de 55% des allèles K14 mutés (Wally et al. 2010). D'un point de vue phénotypique, cela a permis de réduire la migration cellulaire des kératinocytes modifiés par SMaRT. Enfin, une autre étude a également démontré l'efficacité de cette approche pour la correction de mutation *KRT14* au niveau transcriptionnel à partir de kératinocytes humains immortalisés (mutation *KRT14*, c.373 C>T) ; cela a permis de montrer une réduction de l'expression de l'allèle muté, par rapport à l'allèle de type sauvage à l'issue de la correction par SMaRT ; cela a entraîné une diminution des agrégats de kératines, et une régulation négative de la signalisation JNK médiée par l'IL-1 $\beta$  (Peking et al. 2019). De plus cette étude a également apporté davantage de résultats d'un point de vue fonctionnel. La capacité des cellules, ayant été corrigées par SMaRT, à se différencier et à stratifier *in vivo* a été évaluée en transplantant des équivalents cutanés formés par ces cellules, sur le dos de souris nues. Les équivalents cutanés se différenciaient complètement et ressemblaient phénotypiquement à la peau humaine normale, sans aucun signe de formation de bulles. Cette approche a ainsi permis une réversion de phénotypes EBS, *in vitro* et *in vivo*.

A ce jour, les différentes stratégies d'édition du génome ont seulement été utilisées sur des modèles cellulaires dans le cadre de l'EBS, mais les résultats de ces études pourraient ouvrir la voie à des approches de thérapies géniques afin de permettre un traitement causal pour des troubles monogéniques, tel que l'EBS. Cependant, dans le cadre de ces approches, pour une application en clinique, de nombreux études supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier le dosage optimal des outils de thérapies géniques administrés, afin d'obtenir une efficacité maximale de la cible et un impact hors cible minimal ; de plus une vérification minutieuse de l'absence de génotoxicité et d'instabilités génomiques serait indispensable.

### **3. Thérapies basées sur l'utilisation de petites molécules pharmacologiques**

Outre ces stratégies ciblant le matériel génétique, au niveau ADN ou ARN, diverses études ont été menées à partir de l'utilisation de petites molécules pharmacologiques, afin de corriger des phénotypes pathologiques de l'EBS mis en évidence.

#### a) Protéines chaperonnes

L'utilisation d'osmolytes (petites molécules à potentiel chaperon) comme le N-oxyde de triméthylamine dihydraté (TMAO), et le 4-phénylbutyrate (4-PBA) a déjà été établie dans des modèles expérimentaux de troubles d'agrégats de protéines. Dans le cadre de l'EBS, un des phénotypes pathologiques étant basé sur la présence d'agrégats de kératines dans le cytoplasme des kératinocytes basaux de l'épiderme, différentes études ont testé ces molécules afin de vérifier le potentiel de ces protéines chaperonnes à protéger le réseau de kératines, dans les kératinocytes EBS soumis à un stress mécanique, osmotique ou thermique, afin de perturber de manière significative le cytosquelette des cellules EBS.

Tout d'abord en 2009, une équipe a montré que sous l'effet d'un choc thermique des kératinocytes EBS humains immortalisés (mutation *KRT5*, V186L), le nombre d'agrégats de kératines était augmenté dans ces cellules ; puis qu'un prétraitement au TMAO, avant stress thermique, permettait de réduire de manière significative le nombre de cellules contenant des agrégats de kératines (Jean Christopher Chamcheu et al. 2009a). Suite à ce résultat, cette même équipe de recherche a davantage évalué les effets du choc thermique sur le cytosquelette des kératinocytes immortalisés EBS (mutation *KRT5*, E475G) et de déterminer les mécanismes d'action du TMAO et du 4-PBA (Jean Christopher Chamcheu, Navsaria, et al. 2011a). En réponse au stress thermique, une agrégation de kératines a de nouveau été observée, mais cela a également induit une augmentation des protéines Hsp (protéines chaperonnes intrinsèques), ainsi qu'une augmentation de la voie de signalisation MAPK (p38, JNK et ERK1/2). Le pré traitement des cellules par le TMAO, avant le choc thermique, a ensuite permis une diminution de la fraction de cellules contenant des agrégats de kératines et une modulation de l'expression des Hsp et de l'activation des MAPK. Ces deux études suggèrent ainsi que des osmolytes chimiques ont un rôle protecteur et pourraient représenter de nouvelles options prometteuses pour la prévention de phénotypes cutanés dans l'EBS, suite à un traumatisme.

#### b) Inhibiteurs de voies de signalisation

En s'appuyant sur des données antérieures, montrant que les kératinocytes EBS présentent de nombreux agrégats de kératines, et que ceux-ci sont soumis à une activation élevée des kinases ERK 1/2, une étude de criblage a été effectuée à partir d'une bibliothèque de petites molécules d'inhibiteurs de kinase sur des lignées de kératinocytes EBS immortalisés (Tan et al. 2021). Cela a permis d'identifier un groupe de composés, tous impliqués dans les voies de transduction du signal EGFR (Epidermal growth factor receptor). De ce fait, un inhibiteur de l'EGFR approuvé par la FDA, l'Afatinib, a été utilisé. Le traitement des kératinocytes EBS immortalisés par ce composé a permis de réduire les agrégats de kératines, d'améliorer le réseau de filaments kératiniques, en grande partie

grâce à l'inactivation de ERK1/2, et a permis d'augmenter la connectivité cellule-cellule, avec des protéines jonctionnelles accrues (Tan et al. 2021).

Enfin, des preuves récentes suggèrent que les variations de séquences associées à l'EBS, telles que K14 p.R125C, s'accompagnent d'une phosphorylation accrue du résidu thréonine T150 au sein du domaine de tête de la kératine 5 (Sawant et al. 2018; Toivola et al. 2005). Une hypothèse a été émise, selon laquelle des variations de séquences associées à l'EBS favoriseraient la phosphorylation de la kératine et/ou des protéines associées à la kératine et augmenteraient la gravité de la maladie. En outre, il a été postulé que l'agrégation/réorganisation des kératines pourrait être réduite en interférant avec les principales kinases impliquées dans la phosphorylation des kératines et/ou protéines associées. Pour vérifier cela, un inhibiteur multikinase PKC412, connu pour inhiber la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) ou la protéine kinase B (Akt), entre autre, a été testé. Le traitement des kératinocytes EBS immortalisés par ce composé PKC412 a ainsi permis de réduire les agrégats de kératines dans les kératinocytes K14 p.R125C, a amélioré de manière significative l'état des KIF dans les cellules, et a restauré la cohésion intercellulaire (Rietscher et al. 2022). Etant donné que ce composé a montré une bonne tolérance dans plusieurs essais cliniques terminés, notamment dans le cadre de leucémies (Stone et al. 2018), le développement pourrait être envisageable pour l'EBS, par administration orale ou via une formule de gel topique.

En 2022, une étude s'est intéressée à la caractérisation des voies moléculaires impliquées dans l'EBS, grâce à une approche d'analyse transcriptomique à partir de biopsies de patients EBS, au niveau de bulles aiguës ou d'épiderme non cloqué (G. H. Lee et al. 2022). Les résultats de cette analyse transcriptomique ont ensuite été utilisés pour effectuer une approche de repositionnement de médicaments afin d'identifier des cibles thérapeutiques non signalisées auparavant pour l'EBS. Les analyses ont permis de révéler la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protéine kinase B (Akt) / mTOR, comme étant centrale dans l'EBS ; celle-ci est au cœur de multiples réactions pro-inflammatoires dans les kératinocytes et semble jouer un rôle clé dans la réponse inflammatoire aux bulles aiguës dans l'EBS. Parmi les classes de médicaments qui ont émergé de leur analyse, comme traitement potentiel de l'EBS, un inhibiteur de mTOR, a été sélectionné : Sirolimus. A la suite de ces résultats, une étude pilote en double aveugle et croisée a été menée : deux patients EBS, ont reçu un traitement topique de sirolimus 2%, permettant une réduction significative des bulles, de la kératodermie, mais également une amélioration de la marche et une diminution des douleurs aux pieds (G. H. Lee et al. 2022).

### c) Thérapie ciblant les marqueurs inflammatoires

Enfin, toutes les caractéristiques cliniques de la maladie ne sont pas simplement causées par une fragilité cutanée des patients. En effet, la présence de cytokines pro-inflammatoires détectées dans les fluides de bulles de patients (Annicchiarico et al. 2015 ; Alexeev et al. 2017) mais également mis en évidence dans différents modèles d'études d'EBS, suggère l'implication de mécanismes inflammatoires (Roth et al. 2009 ; Wally, Lettner et al. 2013).

Une équipe de recherche, s'est intéressée à l'effet de la doxycycline, qui est un antibiotique tétracycline utilisé pour traiter une grande variété d'infections bactériennes. A l'issue d'un traitement systémique de cette molécule sur des souris K5 -/- mourant dès la naissance, (Lu et al. 2007), la durée de vie de celles-ci a été prolongée de 8h. De plus il a également été montré qu'un traitement à la doxycycline permet d'induire une diminution de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ .

Une étude menée par une autre équipe de recherche a mis en évidence une augmentation de cytokines pro-inflammatoires et d'un infiltrat de cellules Th17 dans les biopsies de patients EBS. Sur la base de ces observations, l'équipe a initié un traitement à l'Aprémilast, qui est une petite molécule qui permet l'inhibition de la phosphodiesterase-4, ce qui augmente les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique, réduisant ainsi la production de cytokines inflammatoires ; cette molécule est approuvée pour le traitement de patients atteints de psoriasis modérée (pathologie cutanée inflammatoire), où elle a permis de réduire de manière significative les médiateurs pro-inflammatoires Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-22) (Sakkas, Mavropoulos, and Bogdanos 2017 ; Papp et al. 2015 ; Strober et al. 2019). A l'issue de l'application topique sur des patients EBS, seuls deux patients sur trois ont montré une amélioration de l'état cutané, avec une diminution des bulles et des douleurs abdominales (Castela et al. 2019).

Des études sur des souris (K5 -/- ; K5 +/-) (Lu et al. 2007) ou sur des kératinocytes EBS immortalisés (mutation *KRT14*) (Wally, Lettner, et al. 2013) ayant montré une augmentation de l'expression de l'IL-1 $\beta$ , des approches visant l'inhiber, à l'aide d'un anticorps neutralisant IL-1 $\beta$  et de la diacéine, ont également été menées. La diacéine est un composant de la racine de rhubarbe, qui bloque la libération de la forme IL-1 $\beta$  active, en inhibant l'enzyme de conversion de l'IL-1 $\beta$  liée à la membrane plasmique. *In vitro*, les deux substances ont été testées sur des kératinocytes immortalisés EBS, lors d'un choc thermique ; le traitement a entraîné une diminution de l'IL-1 $\beta$ , une diminution de la phosphorylation de JNK mais également une diminution d'agrégats de kératines et le rétablissement normal d'un réseau de filaments intermédiaires de kératines (Wally, Lettner, et al. 2013). Les effets positifs de la diacéine sur la régulation négative de la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$ , a servi de base pour une étude clinique pilote utilisant cette petite molécule pour améliorer les manifestations phénotypiques de l'EBS-gen sévère (Wally, Kitmueller, et al. 2013). Les résultats ont mis en évidence



une diminution significative du nombre de bulles chez les patients traités, permettant de mettre en évidence un effet pertinent de la diacéine et de fournir des informations importantes pour l'essai clinique de confirmation (monocentrique et multicentrique internationale) de phase 2/3, randomisé et contrôlé, qui a été initié par la suite. Les résultats ont démontré qu'après une application topique de crème diacéine 1%, les bulles étaient réduites à plus de 70% chez plus de la moitié des patients traités, et aucun effet indésirable n'a été observé (Wally et al. 2018). Des approches thérapeutiques visant à inhiber l'IL-1 $\beta$  pourraient ainsi être bénéfiques pour les patients grâce à la réduction de l'inflammation cellulaire en aval.

#### d) Autres composés

En ciblant la biochimie et la physiopathologie connues de l'EBS, plusieurs études ont également été menées en réutilisant des médicaments existants pour traiter les symptômes de la maladie.

Un petit essai, à partir de tétracycline orale (puissants inhibiteurs de MMP (Sapadin and Fleischmajer 2006) et décrit comme un agent anti-microbien a également révélé une réduction du nombre de bulles avec un traitement prolongé, mais il n'a pas atteint un niveau significativement statistique (Weiner et al. 2004).

Une étude pilote de phase I/II, fermée et randomisée, a été effectuée récemment (2022-2023) pour déterminer l'innocuité et l'efficacité d'un gel Tolasure 5% (Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT05062070), dont le mécanisme d'action décrit consiste en une inhibition de la croissance bactérienne et est destiné à favoriser une cicatrisation accélérée des plaies cutanées. Les résultats de cette étude ne sont pas publiés à ce jour.

De plus, le développement de bulles dans l'EBS entraîné par un traumatisme, peut-être causé par un phénomène d'hyperhidrose. Différentes équipes de recherche se sont penchées sur le rôle thérapeutique de la toxine botulique (BTX) dont le mécanisme d'action implique le blocage des terminaisons nerveuses cholinergiques et l'inhibition de la libération d'acétylcholine ; il bloque également les jonctions cholinergiques autonomes des fibres sympathiques postganglionnaires vers les glandes sudoripares, ce qui en fait une thérapie idéale pour l'hyperhidrose, éviter le stress mécanique et minimiser la chaleur excessive de la peau et la transpiration dans le but d'empêcher la formation de bulles chez les patients EBS. Des injections locales, intraépidermiques, de BTX ont permis de réduire durablement les ampoules et les callosités douloureuses (Holahan et al. 2016 ; Swartling et al. 2010 ; Abitbol and Zhou 2009).

Enfin, bien qu'au cours des 20 dernières années des progrès remarquables aient été réalisés dans la compréhension de bases moléculaires de l'EBS et qu'à terme certaines de ces connaissances puissent aboutir au développement de thérapies bénéfiques, il n'existe actuellement aucun traitement disponible qui semble entraîner une réduction à long terme des bulles cutanées ou une amélioration de la fragilité cutanée mécanique dans l'EBS.

La principale limitation à une meilleure compréhension de la pathologie et au développement de thérapies efficaces repose sur le manque de modèles murins et cellulaires suffisamment pertinents (dont les limitations ont été détaillées dans la partie « Modèles d'études »). Les propriétés des cellules souches peuvent alors pallier à ces limitations en étant utilisées pour modéliser des pathologies.

De ce fait, le développement d'un modèle de kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites pour l'étude de l'EBS, devrait faciliter une exploration plus approfondie des mécanismes moléculaires et des approches thérapeutiques.



# Chapitre 3 : Cellules souches

## I. Cellules souches

Définies au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, c'est en 1961 que les cellules souches ont été découvertes pour la première fois par le biophysicien James Till et son collègue Ernest McCulloch (Till and McCulloch 1961). Leurs travaux sur la sensibilité aux radiations des cellules de moelle osseuse de souris ont permis de démontrer que ces cellules étaient capables de se renouveler. De par leurs propriétés cardinales qui les caractérisent, à savoir l'auto-renouvellement et leur capacité à se différencier vers un type cellulaire spécialisé, les cellules souches, type cellulaire non spécialisé, représentent une ressource biologique attractive pour la communauté scientifique.

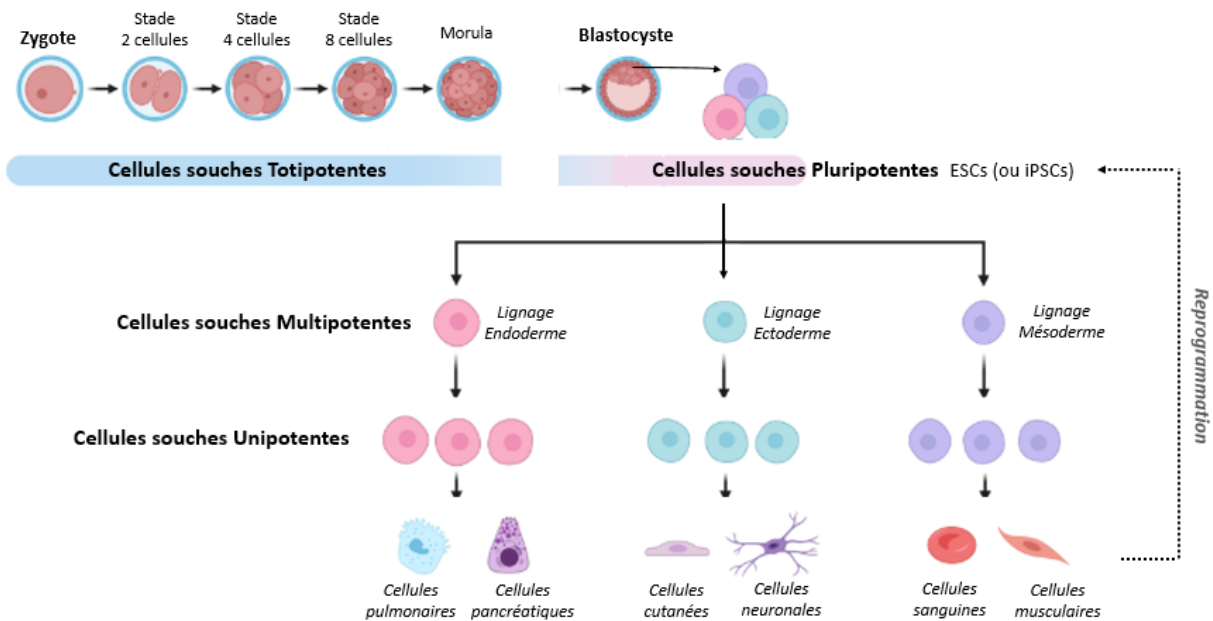
Leur propriété d'auto-renouvellement permet, par division mitotique symétrique, à une cellule mère de générer deux cellules filles identiques quasi indéfiniment ; cela fait de ces cellules une source illimitée de matériel indifférencié. D'autre part, leur pouvoir de plasticité leur permet, au cours d'une division asymétrique de donner une cellule immature et une cellule différenciée ; cette dernière se spécifie ainsi vers un lignage ou un type cellulaire déterminé.

Au cours du développement embryonnaire humain, alors que le potentiel d'auto-renouvellement est maintenu, la capacité de différenciation des cellules souches se restreint, permettant d'en distinguer quatre types : les cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (figure 15) :

- Les cellules souches « **Totipotentes** », sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé ; elles sont présentes du stade zygote (stade une cellule), jusqu'au stade morula (4<sup>ème</sup> jour après la fécondation, stade de 16 à 64 cellules). Ces cellules ont la capacité de produire un embryon dans sa totalité en générant également les annexes extra-embryonnaires (cordon ombilical, et placenta).
- Les cellules souches « **Pluripotentes** », sont présentes dans la masse cellulaire interne du blastocyste (pré embryon). Ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules des trois feuilletts embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.
- Les cellules souches « **Multipotentes** » présentes au stade fœtale et adulte, ont un potentiel de différenciation moins important. Ces cellules sont capables de donner uniquement les cellules spécialisées d'un lignage donné. Leur rôle est essentiel pour maintenir des fonctions corporelles normales et une régénération des tissus ; les cellules souches hématopoïétiques

sont un bon exemple de ces cellules, qui vont produire la plupart des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes).

- Les cellules souches « **Unipotentes** » ont un potentiel de différenciation encore plus limité. Tout en s’auto-renouvelant, celles-ci ne peuvent se différencier qu’en un seul type cellulaire, du lignage dont elles sont issues ; par exemple les kératinocytes, cellules de la peau.



**Figure 15 : Hiérarchie des types de cellules souches et leur potentiel de différenciation**

Issues des premières divisions de l’œuf fécondé, les cellules souches totipotentes sont les cellules ayant la plus grande capacité de différenciation, permettant de donner naissance à tous les types de cellules de l’organisme. Au stade blastocyste, les cellules deviennent pluripotentes et peuvent donner naissance à toutes les cellules du corps, à partir des 3 feuillets embryonnaires (endoderme, ectoderme et mésoderme), à l’exception des annexes embryonnaires. Les cellules se spécialisent ensuite dans l’un de ces trois feuillets au stade multipotent. Enfin, les cellules atteignent un niveau d’unipotence dont le potentiel de différenciation est le plus limité, étant capable de se différencier en un seul type de cellule mature, spécifique à un tissu ou un organe. ESC : Embryonic Stem Cells / Cellules souches embryonnaires ; iPSCs : induced Pluripotent Stem Cells / Cellules Souches induites à la pluripotence.

*Adapté de (Erceg Ivkošić et al. 2023)*

Bien que chacun des types de cellules souches représente un intérêt pour la recherche scientifique et médicale, la suite de ce chapitre sera axée uniquement sur les **cellules souches pluripotentes**, qui sont au cœur de mon projet de thèse.

## II. Cellules souches pluripotentes humaines

Les cellules souches pluripotentes sont un type de cellules indifférenciées qui ont une capacité d'auto-renouveau théoriquement infinie, et de différenciation dans tous les types cellulaires qui composent un organisme adulte. Ces cellules sont capables de donner naissance aux trois lignages embryonnaires, à savoir l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme.

A ce jour, deux types de CSP humaines sont largement utilisés en recherche : les **cellules souches embryonnaires** (hESC, human embryonic stem cells) et les **cellules souches** reprogrammées à partir de cellules somatiques et dites **induites à la pluripotence** (hiPSc, human induced pluripotent stem cells).

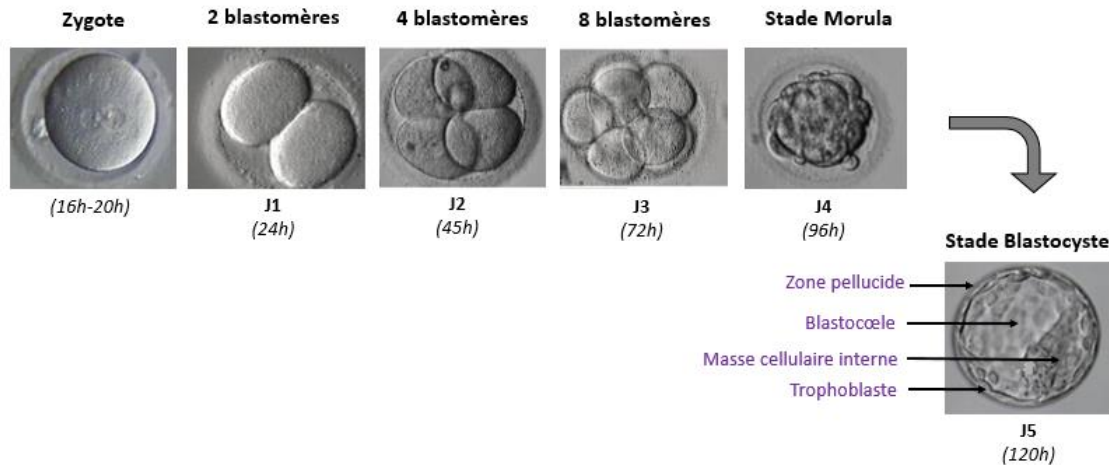
### A. Les cellules souches embryonnaires

#### a) Historique

Au début des années 1980, les travaux de Martins Evans et Matthew Kaufman, ont permis d'isoler pour la première fois, des lignées de ESC obtenues à partir de cellules de la masse interne de blastocyste d'embryon de souris (Evans and Kaufman 1981) puis de maintenir ces cellules en culture de manière efficace. Pour ce faire, les ESC ont été isolées par des techniques de microdissection des blastocystes, et sont ensuiteensemencées en co-culture sur des cellules nourricières (le plus souvent des fibroblastes embryonnaires murins) ayant pour but de sécréter des facteurs de maintien de la pluripotence. Au contact de ces cellules nourricières, les ESC forment des colonies qui sont par la suite amplifiées en les dissociant en petits fragments via des méthodes enzymatiques ou mécaniques, afin de générer à leur tour d'autres colonies. Ainsi, il a pu être démontré une prolifération indifférenciée et illimitée *in vitro* de ces lignées de ESC issues d'embryon de souris, sans apparition d'anomalie caryotypique. Dans les années qui ont suivi ces premiers travaux, la culture des ESC a ensuite pris une ampleur plus importante, en les isolant à partir d'autres mammifères, tels que le rat et le Macaque rhésus (Brenin et al. 1997; J A Thomson et al. 1995; Gardner and Brook 1997). Chez l'homme, il faudra attendre 1998, pour qu'une équipe américaine parvienne à isoler et cultiver des hESC à partir de la masse interne d'un blastocyste humain (James A. Thomson et al. 1998). Cette lignée cellulaire produite, présentait un caryotype normal et une capacité à se différencier dans les trois feuillets embryonnaires. Ces travaux ont permis à Evans, Kaufman et Martin, d'obtenir le prix Nobel de médecine en 2007.

b) Origine des cellules souches embryonnaires humaines

Les hESC sont obtenues au stade blastocyste du développement embryonnaire, entre le 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour après fécondation (figure 16).



**Figure 16 : Premiers stades du développement embryonnaire humain**

A l'issue de la fécondation (stade zygote), au cours du développement de l'embryon, des divisions successives se produisent entraînant une augmentation rapide du nombre de cellules (du jour 1 à 3), sans changement de volume. Le 4<sup>ème</sup> jour, le compactage cellulaire conduit au stade morula. Puis au jour 5, au stade blastocyste, deux types cellulaires différents sont présents : le trophoblaste et la masse cellulaire interne.

*Adapté de (ORIGEN, Center for Reproductive Medicine, Brazil et al. 2021)*

Au début de l'embryogénèse humaine, l'œuf fécondé (ou zygote) effectue des divisions successives, pour atteindre le stade « morula » au bout de quatre jours. Au cours de la division suivante, les cellules donnent naissance à une nouvelle structure embryonnaire appelée « blastocyste ». A ce stade la masse cellulaire interne se resserre et une nouvelle répartition des cellules est générée : les cellules en périphérie qui ne forment qu'une seule couche, nommée « trophoblaste », entourent toute la surface de l'œuf fécondé, et donneront naissance aux futurs structures extra-embryonnaires (cordon ombilical, chorion et placenta) ; les cellules les plus internes forment quant à elle une structure plus compacte appelée « masse cellulaire interne » (MCI) ; enfin, une troisième partie compose le blastocyste, à savoir le blastocœle, cavité centrale remplie de liquide.

Il est important de souligner, qu'à la différence du trophoblaste qui commence à former une structure de soutien spécialisée, les cellules de la MCI restent elles, indifférenciées, et prolifératives (Sukoyan et al. 1993). Cette MCI du blastocyste est composée, elle, de deux structures : l'hypoblaste et l'épiblaste. L'hypoblaste donnera naissance au sac vitellin (ou endoderme pariétal), et l'épiblaste, situé plus en profondeur, est constitué de cellules pluripotentes. Les hESC, et plus précisément les cellules pluripotentes épiblastiques sont donc issues de la MCI du blastocyste (Shamblott et al. 1998 ; James A. Thomson et al. 1998)

### c) Lois de bioéthique et réglementation relatives à l'utilisation des hESC

Cependant, l'accès et la manipulation des hESC soulève de nombreuses questions éthiques, en raison de leur origine, étant donné que celles-ci sont obtenues à partir d'embryons humains surnuméraires issus de fécondation *in vitro*, dans le cadre de projet parental abandonné. Leur utilisation en France est régie depuis 1994 par les lois de Bioéthique.

La loi du 29 juillet 1994 (n°94-654), première loi relative à l'encadrement de la biomédecine, a autorisé la destruction des embryons surnuméraires et refusé que l'embryon devienne source de savoir, interdisant toute recherche sur l'embryon.

Au fur et à mesure des avancées scientifiques, permettant de démontrer l'intérêt de ces cellules pour des applications biomédicales, une évolution législative a permis la modification de la loi de bioéthique en 2004. Cette nouvelle version (Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique), permettait dans le cadre de programme de recherche sur les hESC d'obtenir une dérogation par l'Agence de biomédecine, pour une durée de 5 ans : Article L2151-5 « Les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ».

Des révisions successives de la loi de bioéthique ont ensuite eu lieu en 2011 et 2013, permettant d'assouplir le système d'interdiction avec dérogation, en le remplaçant par un système d'autorisation encadré par l'Agence de biomédecine. Bien que plus souple, cette nouvelle législation nécessite que les programmes de recherche respectent impérativement quatre conditions spécifiques : la pertinence du projet scientifique, la finalité médicale de la recherche, l'absence de techniques alternatives et le respect des principes éthiques. Enfin, les états généraux de la bioéthique ont permis de promulguer la 4<sup>ème</sup> loi de bioéthique du 2 août 2021. Ce texte maintient le système d'autorisation sur les recherches sur les embryons mais l'encadrement des recherches sur les cellules souches embryonnaires humaines a été modifié, passant du régime d'autorisation au régime de déclaration préalable auprès de l'Agence



de Biomédecine. L'assouplissement progressif du dispositif juridique a ainsi permis à un certain nombre de projets de recherche d'être autorisés ces dernières années.

Les lignées de cellules souches embryonnaires sont dérivées à partir d'embryons surnuméraires générés par fécondation *in vitro*. Dans le cadre de cette démarche de procréation médicalement assistée, les parents qui cèdent les embryons non utilisés à la recherche médicale, sont dans l'obligation de signer un consentement libre et éclairé.

D'autre part, les couples ayant une forte probabilité de transmettre une maladie génétique grave et incurable à l'enfant, ont accès au diagnostic préimplantatoire (DPI), autorisée en France depuis 1999 (article L.2131-4 Code de la Santé Publique). Cette approche a permis d'obtenir des lignées hESC porteuses de pathologie d'origine génétique (Mateizel et al. 2006). Au total, il a été dénombré approximativement, au niveau international, 190 lignées d'hESC pathologiques, ayant permis de modéliser plus de 50 maladies génétiques humaines (Ilic and Ogilvie 2017).

Afin de s'affranchir des nombreuses questions éthiques que soulève l'utilisation des hESC, la génération d'une autre source de cellules souches pluripotentes a révolutionné le monde des cellules souches.

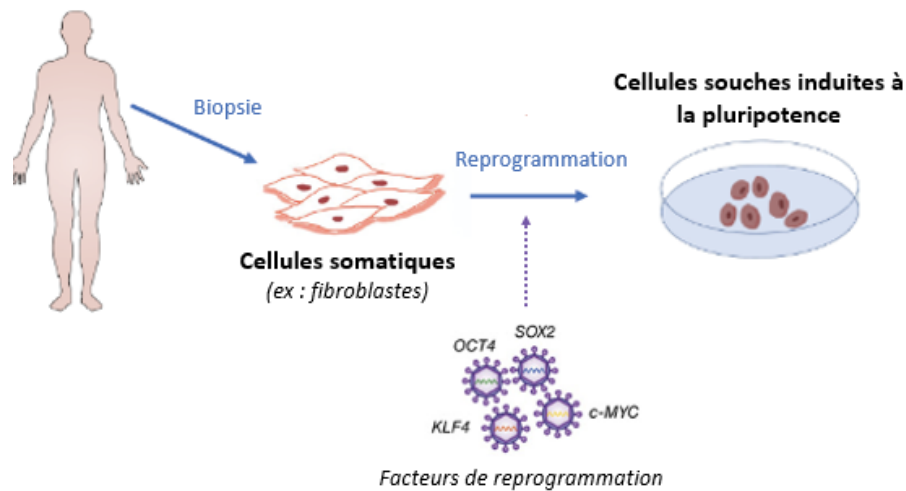
#### B. Les cellules souches induites à la pluripotence

Pendant plusieurs années, les hESC étaient l'unique source de cellules pluripotentes humaines. Cependant, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à disséquer les mécanismes impliqués dans le maintien de la pluripotence, dans le but d'identifier la possibilité de reproduire cet état *in vitro* et permettant ainsi l'émergence des cellules souches induites à la pluripotence : iPSc.

##### a) Génération d'iPSc

En 1962, John B. Gurdon contesta pour la première fois le dogme selon lequel l'identité cellulaire se met en place de manière unidirectionnelle, passant d'un état immature « pluripotent », à un état mature « différencié ». Afin de montrer que le destin cellulaire était finalement flexible et réversible, John B. Gurdon, transplanta le noyau d'une cellule somatique spécialisée de grenouille (*Xenopus laevis laevis*) dans un ovocyte énucléé de la même espèce. Cela conduisit à la formation d'un embryon, à la naissance de têtards puis de grenouilles adultes (Gurdon 1962). Ainsi, ses travaux ont permis pour la première fois la reprogrammation de cellules somatiques adultes en CSP par différents facteurs présents dans le cytoplasme de l'ovocyte. De plus, à travers cette expérience, il a été démontré que ces cellules reprogrammées pouvaient se différencier dans les différents lignages (ectoderme, endoderme et mésoderme) et ainsi que toute l'information nécessaire à la formation d'un embryon était présente dans des cellules adultes spécialisées.

En partant du postulat que les hESC avaient en leur possession des facteurs ayant une fonction importante dans le maintien de leur identité, et jouant également un rôle central dans l'induction de la pluripotence de cellules somatiques, en 2006 l'équipe du Pr. Yamanaka a mis en évidence que des cellules somatiques murines pouvaient être reprogrammées en sur exprimant des facteurs de pluripotence par le biais de vecteurs rétroviraux (Takahashi et al. 2007) (figure 17).



**Figure 17 : Représentation schématique de l'obtention des hiPSC**

*Adapté de (Leowattana et al. 2022)*

Pour identifier les régulateurs transcriptionnels capables de reprogrammer des cellules adultes en cellules pluripotentes, Yamanaka et Takahashi ont conçu une méthode de sélection de facteurs au sein d'un groupe de 24 gènes candidats associés à la pluripotence et susceptibles d'activer la protéine F-box15 (Fbx15), protéine exprimée dans des cellules souches embryonnaires non différenciées (Tokuzawa et al. 2003). La combinaison des 24 facteurs, lorsqu'ils sont co-exprimés à partir de vecteurs rétroviraux, dans des fibroblastes de souris, a en effet activé Fbx15 et induit la formation de colonies avec une morphologie caractéristique d'ESC (Takahashi and Yamanaka 2006). Par la suite, des cycles successifs d'élimination de facteurs de manière individuelle ont permis d'identifier la combinaison optimale pour reprogrammer des fibroblastes embryonnaires et adultes de souris en une population cellulaire pluripotente qui était composée des facteurs de transcription suivants (OKSM) : **OCT4** (*Octamer-binding transcription factor 4*), **KLF4** (*Krüppel-like factor 4*), **SOX2** (*sex determining region Y-box 2*) et **C-Myc** (*Myelocytomatosis oncogene*). Ainsi, les cellules issues de cette modification présentaient une morphologie et un potentiel de différenciation similaires aux cellules souches embryonnaires. De plus, le résultat des expériences démontre que les cellules possèdent la capacité d'auto-renouvellement et peuvent se différencier dans les trois feuillettes embryonnaires.

En 2007, la même équipe a transposé ce modèle à l'homme, permettant de générer la première lignée d'iPSC humaines (hiPSC). Cela a été possible grâce à la reprogrammation de fibroblastes humains par des approches légèrement différentes en terme de facteurs de reprogrammation utilisés (Oct4, Sox2, Nanog et Lin28) et de vecteurs viraux utilisés (lentivirus) (Takahashi et al. 2007 ; J. Yu et al. 2007). L'innovation, la transposition à d'autres espèces, telles que les rats (Li et al. 2009) et l'espoir généré autour de leurs travaux, a valu aux Pr. Yamanaka et Pr. Gurdon, l'attribution du prix Nobel de médecine en 2012.

A l'issue de cette découverte, d'importants progrès techniques ont été réalisés, notamment sur le choix des facteurs de reprogrammation, des méthodes de délivrance de ceux-ci, mais également sur le choix des cellules qui seront utilisées pour la reprogrammation en hiPSc.

#### b) Choix des facteurs de transcription pour la reprogrammation

Les facteurs OKSM initialement utilisés dans les études de Yamanaka ont été sélectionnés pour leur rôle dans la mise en place et le maintien des mécanismes impliqués dans l'état de pluripotence chez la souris : (1) le gène Oct4 code pour une protéine impliquée dans le passage du stade morula au stade blastocyste ainsi que dans l'auto-renouvellement (Nichols et al. 1998) ; (2) le gène KLF4 a été décrit comme jouant un rôle dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'auto-renouvellement (Nandan and Yang 2009); (3) le gène SOX2 est impliqué dans la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires (Avilion et al. 2003) ; (4) le gène C-Myc, code pour un proto-oncogène s'exprimant dans les cellules possédant une activité proliférative importante et possède également un rôle dans l'auto-renouvellement (Araki et al. 2011).

De manière générale, il a été démontré par exemple que seuls OCT4 et SOX2 étaient indispensables à la reprogrammation, alors que KLF4 et C-MYC ne permettaient que d'en améliorer le rendement *in vitro*, en améliorant la formation de colonies (I.-H. Park et al. 2008). D'autres combinaisons de facteurs, y compris de nouveaux facteurs, peuvent également favoriser la reprogrammation, et il a en effet été démontré que NANOG et LIN28 complètent OCT4 et SOX2 dans la reprogrammation (J. Yu et al. 2007).

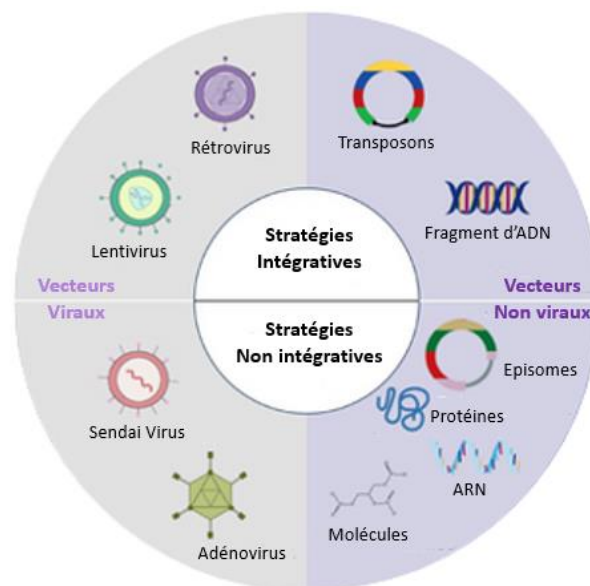
Néanmoins, les recherches réalisées ces dernières années, sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la reprogrammation, ont permis d'optimiser les protocoles. Tout d'abord l'avantage du protocole utilisé par l'équipe de Yu en 2007, repose sur l'absence du proto-oncogène C-MYC, qui a été décrit comme étant un inducteur d'apoptose et de différenciation des hESC (Sumi et al. 2007).

Suite à ces travaux princeps, il a également été démontré que l'application de seulement trois des quatre facteurs OKFM décrits par Yamanaka était suffisante pour générer des lignées d'iPSc ; l'oncogène était exclu car celui-ci entravait les applications cliniques (Nakagawa et al. 2008).

Enfin, au-delà du choix des facteurs de transcriptions, des recherches menées ces dernières années ont également montré que l'utilisation de molécules permettant le remodelage de la chromatine via l'inhibition d'histone (Onder et al. 2012) ou impactant le cycle cellulaire ou l'apoptose en inhibant la protéine p53 (Zhao et al. 2008; Banito et al. 2009), permettait d'améliorer l'efficacité de reprogrammation (Brouwer, Zhou, and Nadif Kasri 2016).

### c) Délivrance des facteurs de transcription

Afin d'obtenir une ressource biologique adaptée à l'application souhaitée, différentes méthodes de vectorisation ont été développées pour introduire les facteurs de reprogrammation et induire la pluripotence dans les cellules somatiques, à savoir : les systèmes **intégratifs**, dans lesquels le matériel exogène est inséré dans le génome des cellules de départ, et **non intégratifs** (Oh et al. 2012) (figure 18).



**Figure 18 : Méthodes de vectorisation pour la reprogrammation de cellules somatiques**

Selon les critères d'intégration et viraux, les méthodes utilisées sont classées en quatre catégories. Les lentivirus et rétrovirus font partie des stratégies virales intégratives ; tandis que les transposons et les fragments d'ADN correspondent aux stratégies non virales intégratives. Les stratégies non intégratives peuvent être virales avec le virus Sendai ou les adénovirus ; ou non virales avec les molécules, ARN, protéines ou épisomes.

*Adapté de (Mao et al. 2022)*

Avant d'initier une programmation, il est important de prendre en considération tous les avantages et inconvénients de chacune, que ce soit en terme d'intégration ou non, du taux d'efficacité, ou du type de cellules à reprogrammer.

Les premiers vecteurs utilisés pour délivrer les facteurs de reprogrammation font partie des stratégies intégratives de type viral :

- Les **vecteurs rétroviraux**, ont été utilisés par l'équipe du Pr Yamanaka lors des premières études de reprogrammation, afin de transporter les facteurs de reprogrammation OKSM dans les cellules (Rao and Malik 2012). Cependant, les rétrovirus ne peuvent uniquement s'insérer dans les cellules en division, représentant une limitation en terme d'efficacité de reprogrammation (Samoilova et al. 2018).
- Les **vecteurs lentiviraux**, qui affectent à la fois les cellules proliférantes et les cellules quiescentes, ont été sélectionnés par l'équipe de James Thomson, afin de permettre une reprogrammation plus efficace pour la génération d'iPSc (Rao and Malik 2012).

Malgré l'efficacité des vecteurs intégratifs, de manière générale, leur intégration multiple au sein du génome des cellules hôtes représente un risque de mutagenèse insertionnelle (risque de réactivation d'oncogènes, et d'extinctions de gènes importants dans des voies de différenciation) (Baum 2007).

Face à ces limitations, mais également pour permettre l'utilisation pratique d'iPSc dans des applications cliniques, des méthodes alternatives non intégratives ont été proposées, afin de ne pas intégrer les transgènes dans le génome des cellules receveuses :

- Les **Adénovirus**, non intégratifs, ont été utilisés pour la première fois par l'équipe d'Hochedlinger et ses collègues, permettant de la reprogrammation de fibroblastes de souris en iPSc, cependant cette méthode de délivrance présente une efficacité de reprogrammation limitée (Stadtfield et al. 2008).
- L'utilisation de **vecteurs épisomaux** ont permis la reprogrammation de fibroblastes humains en hiPSc, sans intégration dans le génome. Cependant, l'expression des facteurs de reprogrammation n'est pas suffisamment longue, entraînant une efficacité relativement faible de reprogrammation (J. Yu et al. 2009).
- Enfin, une des méthodes les plus couramment utilisée repose sur l'utilisation de **Virus Sendai** (Karagiannis et al. 2019). La première étude publiée utilisant ce virus pour la reprogrammation de fibroblastes néotals ou dermiques humains a permis de mettre en évidence une efficacité de reprogrammation plus importante que les autres méthodes non intégratives (Fusaki et al. 2009). En raison de la capacité de ce virus ARN à produire de grandes quantités de protéines, sans pénétrer dans le noyau d'une cellule infectée, cela en fait un candidat attrayant pour la

génération d'iPSc de qualité translationnelle. Cependant l'inconvénient principal de l'utilisation de ce virus réside dans la persistance au sein des cellules, en effet, celui-ci est éliminé au bout d'une dizaine de passages.

d) Choix de la cellule pour la reprogrammation

Initialement, les fibroblastes étaient choisis comme type cellulaire pour la reprogrammation, en raison de leurs nombreux avantages. Ces cellules, obtenues par biopsie de peau, peuvent être maintenues et amplifiées simplement en culture. De plus, celles-ci sont dotées d'une prédisposition correcte à la reprogrammation.

Par la suite, de nombreux autres types cellulaires ont permis l'obtention d'iPSc, permettant de souligner que l'efficacité de reprogrammation est fortement liée à la nature de la cellule source qui est utilisée, telle que les kératinocytes, les hépatocytes ou les adipocytes (Eminli et al. 2008 ; Aoi et al. 2008 ; Aasen et al. 2008).

Cependant, étant donné que l'obtention de ces sources cellulaires implique des chirurgies pouvant être des procédures invasives, il existe maintenant d'autres sources de cellules pour la reprogrammation en iPSc, comme les cellules sanguines ou urinaires (Staerk et al. 2010 ; Bento et al. 2020).

e) Lois de bioéthique et réglementation relatives à l'utilisation de hiPSc

Les hiPSc, sont apparues dans le code de santé publique lorsque la loi de bioéthique du 02 août 2021 a été promulguée ; ce texte de loi (décret n° 2022-294) est intitulé « Recherche sur l'embryon humain, les cellules souches embryonnaires humaines et les cellules souches pluripotentes induites ». Comme pour les hESC cette loi a permis d'instaurer un régime déclaratif pour certaines recherches recourant à l'utilisation d'hiPSc.

Soulignons également que, comme pour le régime déclaratif des protocoles de recherches portant sur les hESC, le directeur général de l'Agence de la biomédecine peut s'opposer à la réalisation d'expérimentation, si elle ne respecte pas les principaux fondamentaux de respect du corps humain (articles 16 à 16-8 du code civil) et les principes éthiques qui régissent la recherche sur l'embryon et le don, ainsi que l'utilisation d'éléments et produits du corps humain.

### III. Propriétés des cellules souches pluripotentes humaines

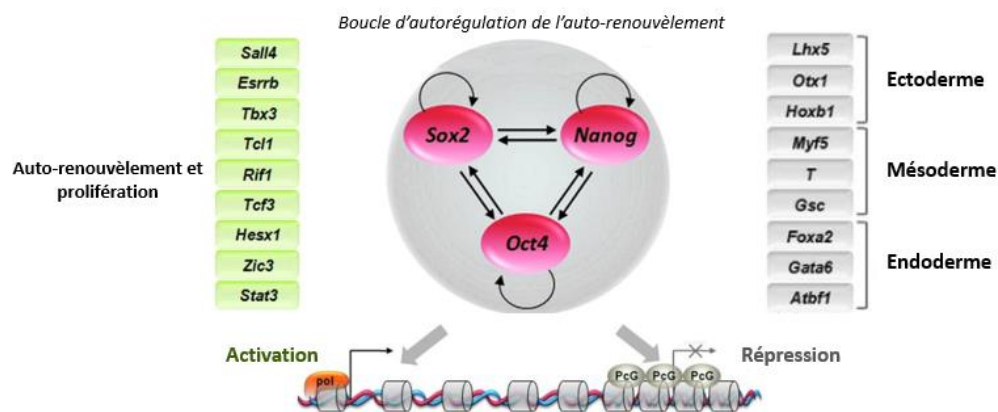
Le principal défi du maintien et de la culture *in vitro* des CSP humaines, qu'elles soient des hESC ou des hiPSc, est de maintenir leur intégrité génomique tout en préservant leurs deux propriétés principales : l'auto-renouvellement et la pluripotence (Henry et al. 2018).

#### A. Maintien de la pluripotence

L'état de pluripotence des cellules souches leur permettant de s'auto-renouveler et de rester indifférenciées, repose sur un réseau étroit de régulation génique, épigénétique et de modulations de voies de signalisation.

##### a) Facteurs clés

Tout d'abord, un « réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence » permet de réguler la mise en place et le maintien des capacités de pluripotence des cellules souches (figure 19).



**Figure 19 : Réseau de régulation génique de la pluripotence**

Les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog, forme une boucle autorégulatrice et permettent :

- 1) d'initier la transcription des gènes nécessaires au maintien de l'état cellulaire de CSP, en activant positivement l'ARN polymérase II ;
- 2) d'inhiber l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire, par l'action répressive des protéines Polycomb (PcG).

*Adapté de (Han and Yoon 2011)*

Ce réseau est composé d'un trio de facteurs de transcription clés que sont : NANOG, OCT4 et SOX2, qui permettent de réguler de manière directe la transcription de nombreux autres gènes importants dans la physiologie des CSP (Boyer et al. 2005).

De plus, ces 3 facteurs collaborent pour former un circuit de régulation composé de boucles d'auto-régulation et de rétroactivation régulant leur expression et dictant ainsi la pluripotence et l'autorenouvellement (Rodda et al. 2005 ; Navarro et al. 2012).

Ceux-ci sont également en capacité d'activer l'expression d'une catégorie de gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence, et de réprimer l'expression de gènes impliqués dans les processus de différenciation cellulaire.

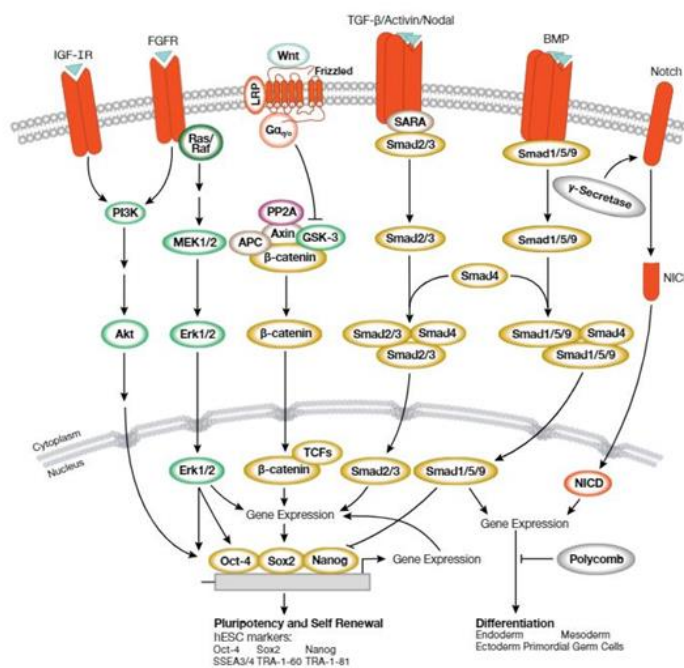
Pour la répression de gènes, l'implication des protéines du groupe Polycomb constituant une famille de régulateurs de la chromatine, permet d'obtenir et de maintenir l'inactivation de gènes homéotiques et sont donc essentiels au maintien de la pluripotence des cellules souches (Ringrose 2006; 2007). Enfin, pour permettre l'activation de l'expression de gènes, les protéines inhibitrices quittent le promoteur et les facteurs de transcription permettent de médier le recrutement de la polymérase II, stimulant l'étape d'élongation de la transcription des gènes.

#### b) Réseaux de signalisation régulant la pluripotence

Afin de conserver l'état pluripotent des CSP humaines en culture, l'apport de facteurs extrinsèques est également nécessaire pour permettre l'activation de trois voies de signalisation moléculaire prédominante et ainsi induire l'expression des 3 facteurs clés de pluripotence (figure 20) :

- La voie du TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ )
- La voie Wnt/ $\beta$ -catenin
- La voie du FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor)





**Figure 20 : Voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement des CSP**

Un certain nombre de voies de signalisation cellulaires permet la régulation des propriétés des CSP, à savoir la capacité à se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme, mais également le pouvoir de se diviser continuellement à l'état indifférencié.

Issu de cell signaling <https://www.cellsignal.com/pathways/pluripotencyand-differentiation-pathway>

Les molécules qui participent à l'activation de ces voies ont un rôle crucial dans le choix du destin cellulaire entre pluripotence et différenciation cellulaire. L'Activine A et Nodal, membres de la voie du TGF-β, sont décrits comme nécessaires dans le maintien de l'état indifférencié des hESC et agissent en activant les récepteurs membranaires et SMAD 2/3 (Beattie et al. 2005 ; Bertero et al. 2015).

Plusieurs études ont démontré que les SMAD 2/3, effecteurs directs de la signalisation Activin/Nodal, contrôlent directement l'expression du gène Nanog pour soutenir l'auto-renouvellement (Vallier et al. 2009). La voie de signalisation du FGF (Fibroblast growth factor) maintient également la pluripotence des hESC, par le biais de différentes molécules. Par exemple, le FGF2 joue un rôle essentiel dans le maintien des propriétés des cellules souches, par l'inhibition de la voie BMP ou l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK, PLCγ et PI3K/AKT et JAK/STAT notamment par l'activation de l'Activin A (Saxena et al. 2008; Nakashima and Omasa 2016).

Enfin, l'implication de la voie de signalisation Wnt dans cette régulation complexe est encore mal comprise, mais semble permettre l'inhibition de la dégradation de la  $\beta$ -caténine, qui est un coactivateur de la transcription des gènes NANOG et OCT4. En revanche, le maintien de la pluripotence via la voie Wnt repose sur un équilibre complexe entre activation et répression de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. En effet, une surexpression de la  $\beta$ -caténine sur un temps court induirait l'autorenouveau des hESC tandis qu'à long terme une forte concentration de  $\beta$ -caténine libre dans le cytoplasme entraînerait la différenciation des cellules, vers le lignage mésodermique (T.-S. Huang et al. 2015).

#### c) Conditions de culture des CSP humaines

Au-delà des facteurs clés et des voies de signalisation, les conditions de cultures optimales des CSP humaines sont indispensables pour maintenir l'état de pluripotence.

De nombreuses méthodes ont vu le jour afin de cultiver ces cellules. Initialement, les premières méthodes consistaient à utiliser un sérum de remplacement (KSR pour Knock-out Serum Replacement) (S. T. Lee et al. 2006) ou à ensemercer les hESC en co-cultures sur des cellules nourricières, le plus souvent des fibroblastes murins (MEF : Mouse Embryonic Fibroblast) ou humains (Mallon et al. 2006), inactivés préalablement par traitement chimique ou irradiation ; celles-ci ayant pour but de sécréter des facteurs nécessaires au maintien de la pluripotence.

Actuellement, les CSP sont principalement cultivées sur des revêtements tels que la vitronectine ou le Matrigel, dans un milieu de culture contenant des petites molécules qui permettent l'activation des voies impliquées dans la pluripotence ou l'inhibition de voies de signalisation impliquées dans la différenciation cellulaire, tel que le FGF2 (comme décrit précédemment) (Rivera et al. 2020). Dans ces conditions de culture, les CSP s'amplifient ainsi sous forme de colonies, dont les critères morphologiques sont contrôlés visuellement. Ces colonies sont par la suite dissociées mécaniquement (à l'aide d'aiguille) ou de façon enzymatique, pour être à leur tour amplifiées ; ces 2 méthodes permettent une amplification en « clumps » ou en « cellules uniques » (single cell) respectivement. De plus, une fois les cellules dissociées, leur survie peut être augmentée grâce à l'utilisation de composés tels que l'inhibiteur Rho-kinases (ROCK) (comme le Y-27632) (K. Kim et al. 2021).

#### d) Caractéristiques moléculaires et contrôles qualités

La culture en laboratoire de cellules souches humaines vise à obtenir un état cellulaire en tant que substitut *in vitro* d'un système biologique. De ce fait, pour que les résultats des recherches soient précis, significatifs et durables, des normes pour l'utilisation de ces hCSP ont été établies et consistent notamment à identifier et à caractériser la pluripotence des cellules, à les maintenir en culture, et également vérifier le génotype des cellules au cours du temps (Ludwig et al. 2023).

D'un point de vue pratique, à l'issue de la culture cellulaire, il est alors important de vérifier par différents contrôles qualités que les cellules obtenues ont conservé leur potentiel de pluripotence et leur intégrité génomique.

D'un point de vue morphologique, une observation microscopique en contraste de phase permet de s'assurer d'une morphologie caractéristique des CSP, à savoir la formation de colonies plates, à bords lisses, possédant des noyaux volumineux avec un cytoplasme restreint (Robinton and Daley 2012).

A l'échelle cellulaire et moléculaire, l'analyse de certains marqueurs de pluripotence peut être effectuée : OCT4, SOX2 et NANOG (intracellulaire) ainsi que SSEA3, SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 3/4), TRA1-60 et TRA1-81 (tumor-related antigen -60/-81) (extracellulaire, associés au stade embryonnaire) (Sullivan et al. 2018). La seconde propriété des CSP étant la capacité à se différencier, le but est d'étudier leur capacité à donner les trois feuillets embryonnaires que sont : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Pour ce faire, deux stratégies peuvent être utilisées : (1) l'analyse *in vitro* des structures tridimensionnelles formées spontanément par les hCSP, nommées « corps embryoïdes » (EB, Embryonic Bodies) composés eux de précurseurs des 3 feuillets embryonnaires, dont les marqueurs sont ensuite analysés RT-qPCR (Itskovitz-Eldor et al. 2000) ; (2) l'injection *in vivo* de ces cellules dans des souris immunodéficientes, qui induit la formation d'un tératome, sur lequel des analyses histologiques sont enfin effectuées afin d'observer la présence des 3 feuillets embryonnaires (Smith, Luong, and Stein 2009).

Enfin, en raison des techniques d'obtention et des conditions de culture *in vitro* de ces CSP, il est indispensable de vérifier l'absence d'apparition d'anomalies telles qu'une perte de chromosome, ou l'amplification 20q11.21 (Lefort et al. 2008) (Halliwell, Barbaric, and Andrews 2020). La vérification de la non intégration des transgènes est effectuée. De plus, les méthodes utilisées pour vérifier l'intégrité génomique reposent sur l'analyse du caryotype, qui permet la détection d'anomalies telles que des polyploïdies, ou d'autres techniques d'analyses telles que le mFISH (multicolor Fluorescent in situ Hybridation), des analyses de Single Nucleotide Polymorphisms mais également la PCR (polymerase chain reaction) droplet digital, technique plus récente, permettant de détecter jusqu'à 90% des

anomalies courantes des CSP à partir de l'analyse du surnageant (Steichen et al. 2019 ; Assou et al. 2020).

## B. Potentiel de différenciation des iPSc

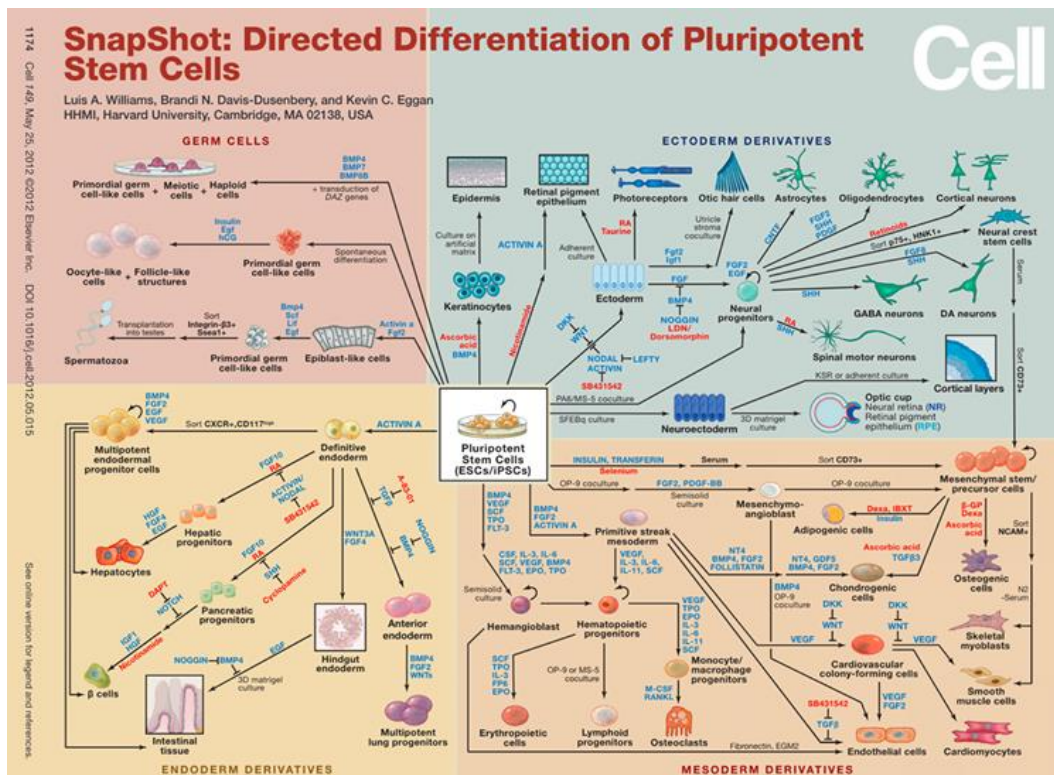
Au-delà de la capacité d'auto-renouvellement, la seconde propriété des CSP repose sur leur capacité à se différencier en tous types cellulaires dérivés des 3 feuillets embryonnaires : l'endoderme, mésoderme et ectoderme (Itskovitz-Eldor et al. 2000; Smith, Luong, and Stein 2009).

### a) Généralités

Grâce à l'avancée des connaissances sur les mécanismes moléculaires de spécialisation ainsi que sur les voies de signalisation impliquées au cours de l'embryogénèse, une multitude de protocoles de différenciation des CSP vers un type cellulaire d'intérêt a été développée, tel que les kératinocytes (Guenou et al. 2009; Williams, Davis-Dusenbery, and Eggan 2012).

Deux méthodes de différenciation (différenciation guidée ou surexpression) *in vitro*, présentant des avantages et inconvénients ont été proposées à partir de CSP :

- **La différenciation guidée**, consiste à induire la différenciation cellulaire via un ajout de cytokines et de petites molécules, de manière séquentielle avec une concentration et durée de traitement contrôlée (figure 21). Ces différents composés identifiés sur les bases de connaissances en biologie de développement, sont ajoutés directement au milieu de culture afin de moduler spécifiquement la différenciation vers l'un des 3 feuillets embryonnaires, puis vers le lignage d'intérêt (Irion et al. 2008).
- La différenciation des CSP vers la **voie endodermique**, peut-être induite via l'utilisation de molécules telles que l'activine A, activateur de la voie TGF- $\beta$  ou encore la combinaison d'activine, FGF2, BMP4 et LY294004, pouvant ainsi donner l'épithélium du tube digestif, l'arbre trachéo-bronchopulmonaire ainsi que les glandes annexes du tube digestif et la thyroïde. (D'Amour et al. 2005 ; Touboul et al. 2010)
- La **voie mésodermique** pouvant être activée par des molécules telles que l'activine A et WNT3A, peut ainsi permettre une différenciation des CSP en tissu conjonctif, en cellules de l'appareil locomoteur (muscle, squelette) (Oldershaw et al. 2010), appareil cardio-vasculaire (cœur, vaisseaux et sang), ou appareil uro-génital.
- Enfin, la **voie ectodermique** et les étapes précises de l'induction permettant entre autre la différenciation des CSP en cellules de l'épiderme seront détaillées par la suite.



**Figure 21 : Différenciation guidée des CSP**

La différenciation des CSP peut donner différents types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme). Pour chacune des voies, les facteurs de croissance et de différenciation clés, sont indiqués en bleu et les petites molécules en rouge.

*(Williams, Davis-Dusenbery, and Eggan 2012)*

Les protocoles de différenciation suivant cette stratégie, récapitulent le programme de développement embryonnaire et prennent donc du temps avant l'obtention de cellules d'intérêts. D'autre part, une autre limitation repose sur la difficulté à obtenir une population pure et homogène à l'issue de la différenciation ; toutefois, il est possible à l'heure actuelle de détourner cette limite en passant par une étape supplémentaire de purification par sélection génique ou tri cellulaire.

- La **surexpression**, consiste à forcer l'expression de facteurs de transcription (FT) (unique ou multiples) liés à des stades de différenciation terminale, afin de d'obtenir plus rapidement des cultures cellulaires matures homogènes et fonctionnelles, en contournant les processus précoces (Hammelman et al. 2022 ; Chanda et al. 2014). Malgré l'avantage d'être rapide et efficace pour l'obtention de cellules d'intérêts, cette méthode peut avoir un impact sur les cellules obtenues en raison du temps de différenciation qui n'est pas comparable au processus

physiologique. De plus, l'utilisation de vecteurs intégratifs pour la surexpression de ces FT rend cette méthode incompatible avec des applications cliniques.

#### b) Différenciation des CSP en cellules de la peau

A l'heure actuelle, de nombreux travaux ont permis d'identifier des conditions de cultures adéquates pour la différenciation des CSP en cellules de la peau, telles que les fibroblastes (Hewitt et al. 2011), les mélanocytes (Nissan et al. 2011 ; Ohta et al. 2011) et les kératinocytes (Aberdam 2004). D'autres types cellulaires présents dans les appendices cutanés ont été différenciés avec succès à partir de CSP, tels que les cellules épithéliales du follicule pileux (R. Yang et al. 2014) et les cellules de type papille dermique (Gnedeva et al. 2015).

En 2003, le premier rapport montrant la capacité des hESC à produire des cellules épithéliales a été publié ; celles-ci exprimaient la kératine 14 et étaient capables de stratifier et d'exprimer l'involucrine (Green, Easley, and Iuchi 2003). L'année qui a suivi ces travaux, l'équipe d'Aberdam a démontré pour la première fois la génération de kératinocytes dérivés de cellules embryonnaires de souris (Aberdam 2004).

Depuis, différents protocoles de différenciation en 2D ont été développés. Ceux-ci, utilisant des hiPSC ou hESC, sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7). Ils peuvent varier en terme de réactifs utilisés et de durée, mais visent tous à imiter la chronobiologie du développement épidermique, en induisant la voie ectodermique et le microenvironnement *in vivo*. Pour ce faire, deux cytokines agissant de manière synergique dans les étapes précoces de la génération de kératinocytes dérivés de CSP sont majoritairement utilisées : BMP4 (protéine morphogénétique osseuse 4) et RA (acide rétinoïque). Le BMP4 permet de bloquer le destin neural en inhibant la voie de signalisation SMAD, tandis que le RA favorise le destin ectodermique en se liant à des récepteurs nucléaires pour activer ou inhiber l'expression de gènes spécifiques (Wilson and Hemmati-Brivanlou 1995; Guenou et al. 2009 ; Ibrahim et al. 2020). Une étude a permis de mettre en évidence que l'ajout combiné de ces deux cytokines pour différencier les hESC permettait d'augmenter de manière significative le nombre de cellules exprimant K14 (marqueur précoce de différenciation), puis l'expression de marqueurs de différenciation épidermique terminal à savoir : K10, l'involucrine et la Filaggrin (Metallo et al. 2008).

**Tableau 7 : Listes de différents protocoles utilisant des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ou des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSc) pour la différenciation en kératinocytes (2D ou 3D)**

Adapté de (Oceguera-Yanez, Avila-Robinson, and Woltjen 2022)

	Type cellulaire	Composition du milieu	Facteurs de croissances et composés	Matrice	Références
Human embryonic stem cells (hESC)	hESC	DMEM/Ham's F12 1:1 or FAD	BMP4	P16 cells fixed with 4% Formaldehyde	Aberdam et al., (2008)
	hESC	FAD medium	RA, BMP4	mitomycin-C-treated 3T3 fibroblasts	Guenou et al., (2009)
	hESC ; hiPSc	DMEM/Ham's F12 1:1 ; D-KSFM	SU6656; RA, BMP4	MEF feeders; Matrigel	Lian et al., (2013)
	hESC	D-KSFM	RA, BMP4	Gelatin, Matrigel	Metallo et al., (2008) Metallo et al., (2010)
	hESC	a) FAD, D-KSFM b) D-KSFM	a) AA, RA; 20 days later activin A b) RA	a) H1-derived Fibroblasts : Collagen IV b) Decellularized H1-derived Fibroblasts + FicolI as crowing agent; Collagen IV	Movahednia et al., 2015
	hESC ; hiPSc	mTESR1; FAD; D-KSFM; EpiLife + S7 supplement	RA, BMP4	3D decellularized Human dermal Fibroblasts; Collagen IV	Petrovac et al., (2014)
	hESC ; hiPSc	StemXVivo Ectoderm kit DMEM/F12 (1:1) until D10;	BMP4, DAPT, SB431542	na	Qu et al., (2016)
	hESC	Thereafter D-KSFM for KC differentiation	BMP4, FCS +/- DAPT	Matrigel, Collagen I	Tadeu and Horsley (2013) Tadeu et al., (2015)
	hESC	KSFM	RA, BMP4, AA	Matrigel	Zhao et al., (2020)
	hESC ; hiPSc	DMEM/F12	SB431542 (D0-6), CHIR99021 (D1-5), BMP4 (D1-8), DAPT (D4-8), BMP4/DAPT/EGF (D9-11)	Vitronectin; albumin-free conditions	Zhong et al., (2020)
Human induced pluripotent stem cells (hiPSc)	hiPSc	NOD Cg-Prkdc-scid IL2rgtm1Wjl/SzJ mice (NSG)	na	Teratoma	Garcia et al., (2016)
	hiPSc	D-KSFM; KSFM	RA, BMP4	Initially Matrigel. After passaging, Fibronectin and Collagen	(Itoh et al., 2011) Kajiwara et al., 2017 Matsumura et al., 2018)
	hiPSc	D-KSFM; Cnt-07 after D4	RA, BMP4	Matrigel	(Itoh et al., 2013) (Gledhill et al., 2015) (Domingues et al., 2017)
	hiPSc	D-KSFM	RA + BMP4 until D4; hEGF, ROCKi	Vitronectin, Fibronectin + Collagen I	(Kajiwara et al., 2017)
	hiPSc	DMEM:F12; D-KSFM:KSFM	RA, BMP4, EGF	Collagen IV	(Kim et al., 2018)
	hiPSc	hEB (after D4); D-KSFM (after D6); Cnt-07 after D30	RA, BMP4, ROCKi (until D10)	Collagen IV	(Koch et al., 2022)
	hiPSc	D-KSFM; Cnt-07	RA, BMP4	Geltrex + Collagen I --> Col I + Col IV	(Kogut et al., 2014)
	hiPSc	D-KSFM	RA, BMP4	na	(Larriere et al., 2017)
	hiPSc	D-KSFM; Cnt-07 (after D9)	RA, BMP4 (until D9); ROCKi [Y-27632] (after D28)	Matrigel; collagen (after D28)	(Sah et al., 2021)
	hiPSc	D-KSFM; Cnt-07 after D4	RA, BMP4 (until D4); ROCKi [Y-27632] (after D10)	Fibronectin, Col IV	(Ruiz-Torres et al., 2021)
	hiPSc	FAD D4, N2 D7; D-KSFM	RA + ROCKi D2 ; RA + BMP4 D7	Gelatin --> MEF --> CELLstar	(Sebastiano et al., 2014)
	hiPSc	FAD	BMP4, Ascorbic Acid, TFG-b inhibitor (SB431542)	3T3 feeders	(Shalom-Feuerstein et al., 2014)
	hiPSc	D-KSFM or Cnt-07 until D22-28 --> Cnt-57	RA, BMP4	na	(Umegaki-Arao et al., 2014)
	hiPSc	D-KSFM	RA, BMP4	Collagen I	(Veraitch et al., 2013)
hiPSc	1. FAD ; 2. D-KSFM ; 3. KSFM	Initially low BMP4, followed by RA, then RA+ BMP4+EGF	Matrigel. Differentiation on 3T3 feeders	(Yan et al., 2014a) (Yang et al., 2014b)	
Organoids	hiPSc	KCs: D-KSFM; Cnt-Prime Epithelial Medium   Spheroid: D-KSFM; D-KSFM+EGF, BPE; D-KSFM+supplements; EBM; EGM	RA, BMP4 (until D6); KGF stabilized mRNA (D0 and D2)	na	(Ebner-Peking et al., 2021)
	hiPSc	KCs: DMEM:F12 (D0-8); D-KSFM (D9-12); D-KSFM:KSFM (D13-30)   Organoid: DMEM:F12 (3:1) (D5-7); DMEM:F12 (1:1) (D8-9); F12 (after D10)	RA, BMP4, EGF (until D12); BMP4, EGF (from D13-30)	Col IV (KCs); Col I (organoid)	(Kim and Ju., 2019)

De plus, des milieux de croissance disponibles dans le commerce ou des milieux personnalisés, sont utilisés afin de favoriser la différenciation des progéniteurs obtenus, vers une lignée épidermique. Enfin, les matrices permettant d'imiter la matrice extracellulaire, telles que le collagène, la fibronectine ou encore la laminine, sont actuellement utilisées dans la quasi-totalité des protocoles de différenciation épidermique (Itoh et al. 2011 ; Kogut, Roop, and Bilousova 2013 ; Koch et al. 2022).

D'autre part, des études visent maintenant à développer des modèles de peau en 3D dérivés de CSP pour la médecine régénérative ou la modélisation, par exemple avec l'utilisation de kératinocytes et fibroblastes, principaux composants cellulaires de l'épiderme et du derme, qui ont été différenciés à partir d'hiPSc et ont été déposés sur des inserts en polycarbonate (PC) ou Polytétrafluorure d'éthylène (PTFE) additionnés à des matrices, permettant de reproduire la matrice extracellulaire telle que le collagène, la fibrine ou la laminine. Ces modèles de peau 3D sont cultivés dans des conditions de culture de milieux définis, fréquemment en interface air-liquide permettant une différenciation terminale des cellules dérivées de CSP et la maturation de la peau (Y. Kim et al. 2018).

#### c) Contrôles qualités des kératinocytes dérivés de CSP

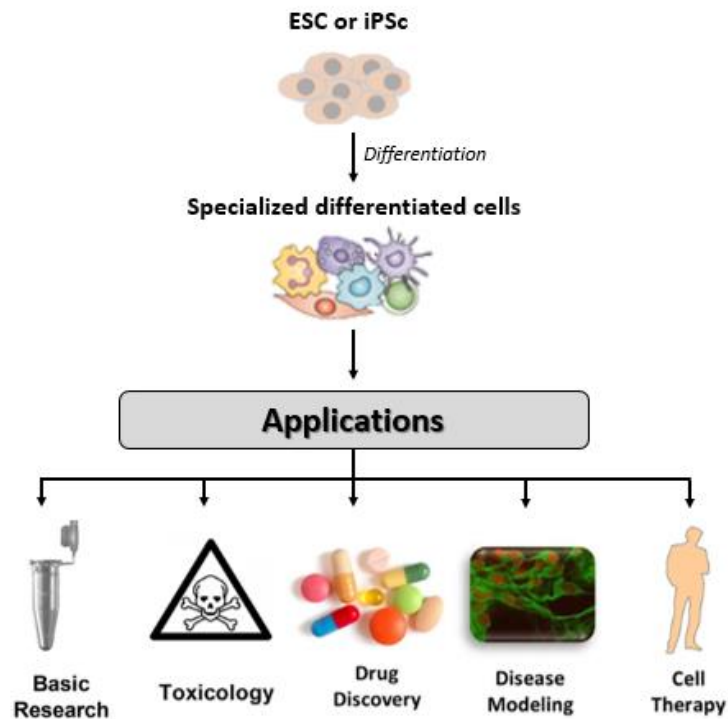
Afin de garantir la pureté et l'identité des cellules dérivées de cellules souches pluripotentes humaines, l'évaluation de différents paramètres est effectuée :

- L'expression de la kératine 14 et la kératine 5 (Blanpain and Fuchs 2009), confirmant un engagement vers le lignage épidermique, peut-être vérifiée à l'aide d'analyse par cytométrie en flux, immunofluorescence ou RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction) (Khurana et al. 2021).
- L'observation en microscopie à contraste de phase permet de s'assurer de la morphologie pavimenteuse des cellules, caractéristique des kératinocytes.
- La vérification de la stérilité microbiologique peut inclure des tests de stérilité pour les mycoplasmes.
- Vérification de l'intégrité génomique, en effectuant des caryotypes ou SNP.
- De plus, des analyses cytogénétiques peuvent être effectuées telles que le mFISH, afin de détecter d'éventuelles mutations survenues au cours de processus de différenciation.



### C. Les CSP et leurs applications

De par leurs capacités d'auto-renouveau et de différenciation dans tous les types cellulaires de l'organisme, les cellules souches pluripotentes, quelle que soit leur origine, contribuent grandement à de nombreuses applications telles que : la thérapie cellulaire, la modélisation pathologique mais également le criblage de molécules pour la découverte de nouveau médicament et tests de toxicité (Moradi et al. 2019) (figure 22).



**Figure 22 : Différentes applications des cellules souches pluripotentes**

Les cellule souches pluripotentes (ESC : Embryonic stem cell ; iPSc : induced pluripotent stem cell) peuvent être différenciées en tous types cellulaires et ainsi permettre diverses applications telles que la modélisation pathologique, la recherche fondamentale, le criblage de molécule pour la découverte de nouveau médicament et la thérapie cellulaire.

*Adapté de (Moradi et al. 2019)*

#### a) Modélisation pathologique

La capacité de prolifération et de différenciation des CSP permet de les utiliser comme modèle pour de la modélisation pathologique, et permet ainsi une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans les maladies génétiques.

De manière générale, la modélisation pathologique à partir de CSP permet à la fois d'étudier les mécanismes impliqués dans la pathologie mais également d'identifier des phénotypes et biomarqueurs pertinents, en comparant des cellules saines à des cellules pathologiques. Ces biomarqueurs sont d'ailleurs couramment utilisés pour tester par la suite l'effet de molécules chimiques afin d'en développer de nouveaux traitements thérapeutiques.

Initialement, l'élaboration de modèles pathologiques était réalisée à partir de modèles animaux (principalement murins) ou de cellules primaires issues de biopsies de patients. Cependant, bien que ces modèles aient permis des avancées majeures sur l'identification de mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans de nombreuses pathologies, ils présentent de nombreuses limitations. Les modèles animaux peuvent être limités pour modéliser tous les aspects des troubles complexes humains, y compris dans le cadre de pathologie comme l'Epidermolyse bulleuse Simple, où la peau murine n'est pas identique à la peau humaine et où les souris meurent précocement (Vassar et al. 1991 ; Cao et al. 2001). D'autre part, les cellules primaires nécessitant une biopsie, sont disponibles qu'en faible quantité et sont difficiles d'accès pour certain type cellulaire tel que les neurones.

Face à ces limitations, les CSP humaines constituent alors une ressource biologique alternative pour la modélisation pathologique.

Tout d'abord, les études de modélisation pathologique portaient sur l'utilisation de lignées hESC porteuses de mutations, ayant été obtenues à la suite d'un DPI dans le cadre d'un projet de fécondation *in vitro*. Cependant, en raison du faible nombre de maladies dépistées lors des DPI, cette approche reste limitée pour modéliser un grand nombre de maladies.

Les hiPSc qui présentent non seulement les mêmes capacités que les hESC à savoir, l'auto-renouveau et la différenciation en tout type cellulaire de l'organisme, peuvent, elles, être générées directement à partir de cellules de patients (fibroblastes, cellules sanguines ou autres sources de cellules somatiques) permettant de fournir une ressource cellulaire illimitée extrêmement précieuse jusqu'alors inaccessible, pertinente pour l'étude de la pathologie. A ce jour, quelques lignées d'hiPSc sont existantes, pour l'étude de diverses maladies cutanées, et sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

**Tableau 8 : Lignées d’hiPSc pertinentes pour l’étude de troubles cutanés**

*Adapté de (Khurana et al. 2021)*

	Maladie cutanée	Cellule d'origine	Méthode de reprogrammation	Cellules différenciées	Références
Lignées d'hiPSc spécifiques de maladies	Atopic dermatitis	KCS from patient with heterozygous mutation	Sendai Virus	KCs	(Devito et al., 2018) (Kolundzic et al., 2019)
	Atopic dermatitis	KCS from patient with maximum number of filaggrin tandem repeats	Sendai Virus	KCs	Khurana et al., 2020
	EB simplex, Dowling-Maera	KCs from patient with K5 mutation	Sendai Virus	N/A	(Kolundzic et al., 2019)
	JEB	FBs from 2 patients with mutation	Retroviral	KCs	(Tolar et al., 2013)
	Psoriasis	PBMCs from two patients with psoriasis	Sendai Virus	KCs	(Ali et al., 2020)
	RDEB	KCs of healthy and RDEB patient	Sendai Virus	MSCs	(Nakayama et al., 2018)
	RDEB	T cells from RDEB patient	Sendai Virus	N/A	(Itoh et al., 2016)
	RDEB	KCs from healthy and RDEB patients	Sendai Virus	FBs and KCs	(Matsumara et al., 2018)

b) Développement de médicaments

Grâce à la modélisation pathologique à partir de CSP, il est maintenant possible de les utiliser pour la recherche pharmacologique, afin de mesurer l’efficacité et la toxicité de nombreuses molécules dans ces modèles cellulaires. Les modèles d’hiPSc de patients jouent un rôle crucial dans la découverte de médicaments pour différentes raisons à savoir : (1) leur reproductibilité (2) leur pertinence dans l’identification de mécanisme et cibles pertinentes dans le cadre de modélisation pathologique et (3) leur capacité à se différencier en tout type cellulaire et dans des formats miniaturisés compatibles avec du criblage de molécules à haut débit.

Les tests de criblages de médicaments peuvent être effectués sur des modèles cellulaires dérivés de CSP humaines pertinents pour l’étude d’une pathologie. Cette technique se base sur l’identification de composés actifs sur un phénotype pathologique préalablement identifié et qui est compatible avec une quantification automatisable, dit « hits ».

Plusieurs stratégies de criblages de molécules grâce à l'exploitation du potentiel des CSP sont possibles (Avior, Sagi, and Benvenisty 2016) :

- **L'approche de médicament-candidat** consiste à tester un nombre limité de molécules afin de corriger le phénotype dans le modèle cellulaire spécifique de la maladie à étudier, qui a été généré au préalable. Cette approche convient lorsqu'un phénotype cellulaire pathologique indique qu'une voie spécifique est responsable de ce phénotype ou lorsque des maladies similaires ont déjà été modélisées et traitées avec succès *in vitro* à l'aide de ces médicaments. Cette approche permet aux médicaments approuvés par les agences réglementaires d'être testés immédiatement sur un nouveau modèle cellulaire pathologique et de fournir ainsi des premiers résultats rapides avant l'utilisation en clinique sur des patients.
- **Le criblage à haut débit** (HTS, *High Throughput Screening*) consiste à tester l'effet de banques de molécules (chimiothèques) afin d'identifier de nouvelles molécules permettant de corriger le(s) phénotype(s) pathologique(s) au sein du modèle cellulaire utilisé. Dans le cadre de maladies pour lesquelles les mécanismes moléculaires physiopathologiques sont peu ou mal connus, cette approche est particulièrement appropriée, de plus elle permet d'identifier des effets bénéfiques de molécules déjà présentes sur le marché (ayant donc passé les différentes phases de tests) et FDA-approved (*Food and Drug Administration*) pour d'autres pathologies. Cependant, cette approche nécessite un grand nombre de cellules pour y tester une large gamme de composés.

Enfin, des études ont également tiré parti des avantages de chacune des approches, par exemple une équipe a d'abord effectué un criblage à haut débit extrêmement volumineux, sur des neurones de souris malades, et ce n'est qu'ensuite que des composés ayant été sélectionnés ont été évalués sur des motoneurones et des astrocytes différenciés d'hiPSc de patients malades (Barmada et al. 2014).

### c) Thérapie cellulaire

Dès leur découverte, les CSP humaines ont également suscité beaucoup d'espoir dans des approches thérapeutiques par thérapie cellulaire pour le traitement de maladie. La thérapie cellulaire vise à remplacer les cellules endommagées, non fonctionnelles ou perdues, d'un tissu ou organe, grâce à la transplantation de cellules différenciées saines (I. Kim 2013). Grâce au potentiel de prolifération des CSP, celles-ci peuvent-être produites par milliards et représentent donc une source cellulaire potentiellement illimitée de matériel biologique pour le traitement de, théoriquement, n'importe quel organe.

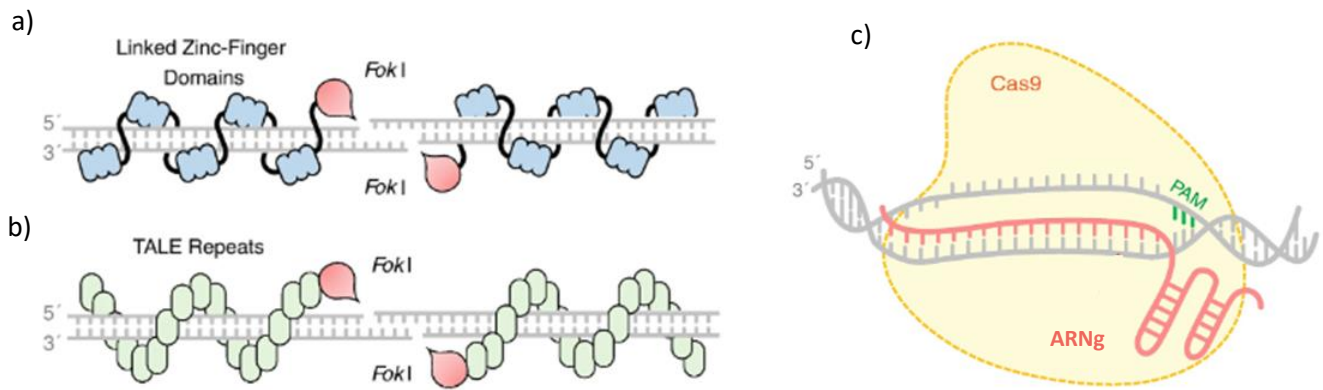
Pour ce faire, deux stratégies principales sont proposées : (1) l'injection de cellules saines qui ont été différenciées à partir de hESC ; (2) l'injection de cellules de patients qui ont été reprogrammées puis différenciées avant d'être ré implantées, qui dans ce cas permet de s'affranchir de tout rejet de greffe et de limiter l'utilisation d'immunosuppresseurs. En 2023, une base de donnée proposée par la société TreeFrog Thérapeutic (<https://treefrog.fr/stemcelljungle/list-of-cell-therapy-clinical-trials-based-on-pluripotent-stem-cells-es-ips-cells/>) a identifié 102 essais cliniques basés sur l'utilisation de CSP humaines, en cours ou planifiés, pour des pathologies variées, comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinite pigmentaire mais également la maladie de parkinson (Yamanaka 2020). A l'heure actuelle, un seul essai clinique randomisé et contrôlé de phase I, concernant la peau a été lancé et est encore en cours, en Australie (NCT05165628). Cet essai consiste à évaluer la sécurité, la tolérabilité et l'efficacité du produit CYP-006TK, composé de cellules souches mésenchymateuses dérivées d'hiPScensemencées sur un pansement en silicone revêtu de plasma d'heptylamine, chez des adultes atteints d'ulcères diabétiques.

#### **IV. CSP et technologies d'édition du génome**

Combinées à l'utilisation des cellules souches pluripotentes, les technologies d'édition du génome qui ont fait leur apparition depuis maintenant plusieurs années, sont devenues incontournables dans les laboratoires de recherche du monde entier. Cela a ouvert la voie à des stratégies de thérapie génique, de thérapie cellulaire mais également à la modélisation pathologique (De Masi et al. 2020).

Au cours des dernières années, le développement de technologies d'édition du génome n'a cessé d'évoluer. De manière générale, l'édition génomique consiste en l'ensemble de techniques servant à modifier une séquence nucléotidique au sein de l'ADN d'une cellule. Ces modifications permettent de réparer, d'éliminer ou d'ajouter un ou des gènes de manière sélective. Pour permettre cela, les scientifiques se sont concentrés sur le développement et l'utilisation de différents mécanismes basés sur les propriétés d'endonucléases pour créer des cassures d'ADN double brin et sur le déclenchement de mécanismes de réparation de l'ADN cellulaire, à savoir notamment la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et la réparation dirigée par homologie (HDR).

Pour ce faire, les endonucléases pouvant être utilisées sont regroupées en trois grandes familles principales : (1) les nucléases à doigt de zinc (**ZFN**, zinc-finger nucleases) ; (2) les nucléases effectrices de type activateur de transcription (**TALEN**, transcription activator-like effector nucleases) ; (3) le système **CRISPR-Cas9** (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats ; Cas9, CRISPR-associated protein 9) (figure 23).



**Figure 23 : Principales classes de nucléases programmables**

Une représentation schématique des domaines de liaison à l'ADN dans les ZFN (a) et les TALEN (b) est présentée. Les nucléases *Fok I* dimérisées introduisent une coupure d'ADN. Schéma de la protéine nucléase Cas9 et de son ARN guide unique (ARNg) lié à sa séquence cible. La séquence cible nécessite un motif court appelé Protospacer Adjacent Motif (PAM), pour permettre la reconnaissance par la Cas9 qui va induire une coupure de l'ADN.

*Adapté de (Shamshirgaran et al. 2022)*

#### A. ZFN et TALEN

Les ZFN et TALEN sont des protéines chimériques construites artificiellement en fusionnant deux domaines protéiques : domaine de liaison à ADN et enzymes de restrictions *Fok I* pour les ZFN, domaine de liaison à l'ADN et domaine de liaison à doigt de zinc (ZF) (Y. G. Kim, Cha, and Chandrasegaran 1996) pour les TALEN ; les modules de liaison à l'ADN sont des domaines TALE (transcription activator like domain), effecteurs activateurs de la transcription. De manière générale, les domaines de liaison à l'ADN dans les ZFN (modules ZF) ou les TALEN (modules de liaison à l'ADN, TALE) reconnaissent l'ADN et se lient spécifiquement à une séquence cible. Le domaine nucléase *Fok I* quant à lui, permet de couper l'ADN. Pour rendre possible la dimérisation du domaine de clivage de *Fok I*, une paire de ZFN ou TALEN doit se lier à l'ADN à une distance appropriée et dans une orientation correcte. Bien que les TALEN et ZFN permettent d'induire un clivage de l'ADN dans des régions ciblées, la reconnaissance de l'ADN se fait via l'ingénierie protéique. En effet, de nouveaux modèles protéiques TALE/ZFN doivent être générés pour chaque nouvelle séquence à cibler.

En revanche, un autre système basé sur l'utilisation de la nucléase Cas9, s'avère plus simple, car celle-ci nécessite une seule molécule d'ARN guide (ARNg) pour reconnaître sa séquence d'ADN cible dans le génome. Cela offre plusieurs avantages, à savoir une synthèse plus facile d'un ARN guide par rapport

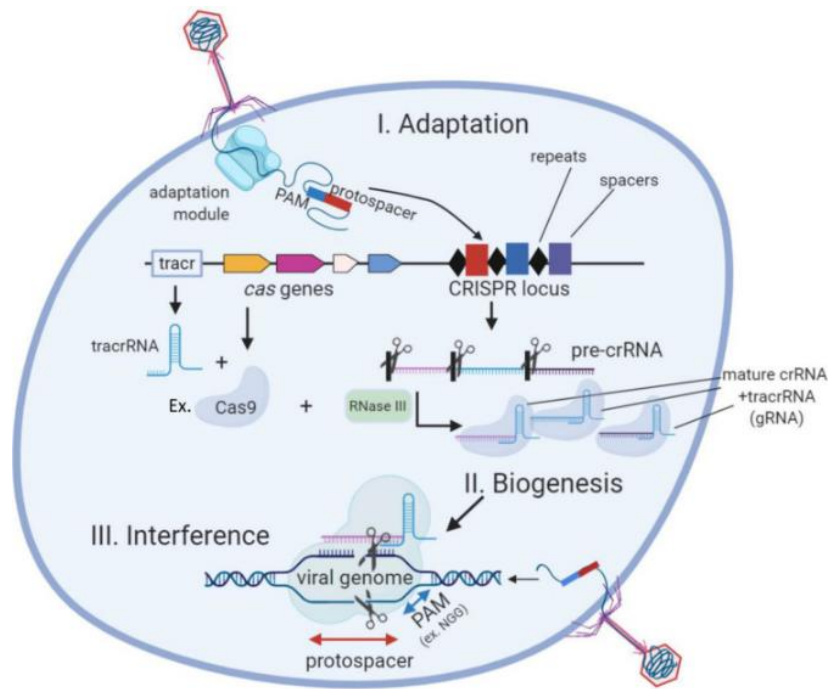
à un domaine protéique dans le cas d'approche ZFN ou TALEN, et donc une conception plus facile pour toutes les cibles génomiques, ainsi qu'une prédiction facile des sites hors cible mais également la probabilité à modifier plusieurs sites génomiques simultanément.

#### B. Origine du système CRISPR-Cas

La technologie CRISPR-Cas9 qui est de nos jours une technologie d'édition du génome bien établie, est basée sur la découverte du système de défense présent dans les organismes procaryotes (bactéries et archées) pour se protéger des infections virales de phages étrangers (Barrangou et al. 2007). Au sein de l'ADN bactérien se trouve un locus CRISPR constitué de séquences nucléiques partiellement palindromiques, séparées par des fragments d'ADN nommés « spacers » correspondant à des séquences nucléiques virales acquises lors de l'infection des bactéries par le virus. Adjacent à ce locus se trouvent des séquences codant pour un tracrRNA (Trans-activating CRISPR RNA) et des protéines Cas (figure 24).

Lors de la primo infection de la bactérie par un phage, une étape d'immunisation/acquisition a lieu : les protéines Cas1 et Cas2 sont activées formant un complexe protéique, reconnaissant un motif de 3 nucléotides « région PAM » (protospaceur adjacent motif) au sein de l'ADN viral, qui coupe un fragment d'ADN et le dirige vers l'extrémité du locus CRISPR où il sera intégré ; cela correspondra au « spaceur ».

Puis lors de la réexposition du phage, une deuxième phase de défense/résistance entre en jeu : le locus CRISPR, contenant les séquences répétées et les spaceurs ainsi que la région codant pour le tracrRNA sont transcrits, en pre-crRNA (pre-CRISPR RNA) et tracrRNA respectivement. Le pré-crRNA est ensuite clivé par une RNase III permettant de générer différents des crRNA. Chaque crRNA se lie ensuite au tracrRNA par complémentarité de bases, formant des ARN guide (ARNg) individuels, sur lesquels se lie ensuite la ribonucléase Cas9, formant un complexe ribonucléoprotique (RNP). Cette RNP va ainsi cibler les séquences complémentaires au niveau de l'ADN du phage infiltrant, provoquant ainsi son clivage par l'activité endonucléase de la Cas9, permettant ainsi sa dégradation.



**Figure 24 : Schéma de la réponse immunitaire adaptative bactérienne médiée par le système CRISPR/Cas**

Lors de la primo infection, l'injection d'ADN du phage dans une cellule bactérienne active les protéines du module d'adaptation qui vont cliver des fragments d'ADN de phage de la taille d'un espaceur « Spacer » pour les incorporer dans les locus CRISPR. Au cours de la biogenèse de l'ARN CRISPR, les locus CRISPR sont transcrits et le pré-crRNA résultant est traité par une RNaseIII pour générer des crRNA matures qui se couplent au tracrRNA, formant divers ARNg. Les ARNg individuels sont liés par des effecteurs de la protéine Cas (par exemple, Cas9). Après l'apparition d'une nouvelle infection par un phage avec des séquences correspondant à un « spacer » CRISPR dans la cellule (en bas à droite), des complexes Cas/ARNg spécifiques se lient à l'ADN viral qui le clive afin de le dégrader. (Arroyo-Olarte, Bravo Rodríguez, and Morales-Ríos 2021)



### C. Système CRISPR/Cas9 et édition du génome

Suite à la découverte de ce mécanisme de défense bactérienne de haute efficacité, de sa spécificité et de sa nature modulaire, le système CRISPR-Cas a été détourné pour être utilisé comme une technologie révolutionnaire dans l'édition du génome. C'est en 2012, que le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR-associated protéine 9) a été utilisé pour l'édition du génome par une équipe de recherche dirigée par Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier (Jinek et al. 2012). Pour récompenser leur découverte révolutionnaire, plus communément appelée « ciseaux moléculaires », le prix Nobel de la chimie leur a été attribué en 2020.

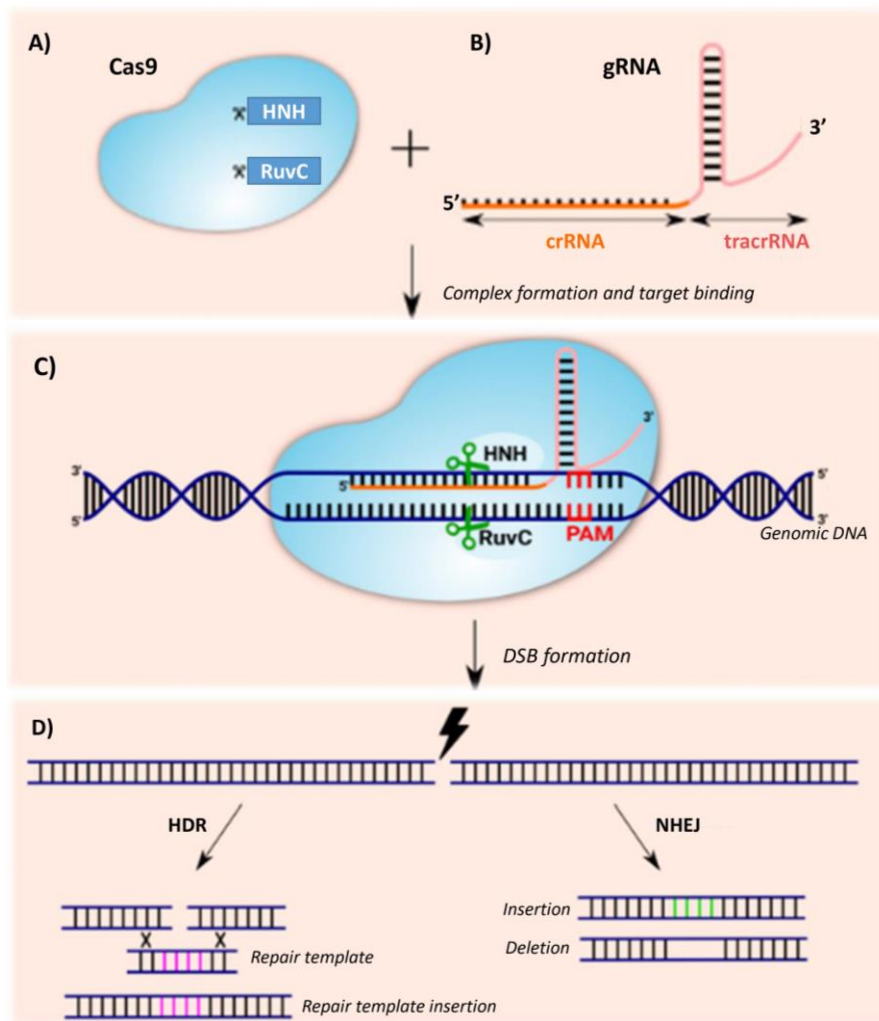
#### a) Constituants et mécanisme d'action du système d'édition CRISPR/Cas9

Cette technologie « CRISPR/Cas9 » ainsi reconnue comme un outil prometteur pour la modification d'ADN, permet de cibler des ADN double brin, afin d'induire une cassure double brin dans une région ciblée et in fine mener à l'édition de cette région. Cela requière les constituants suivants : une nucléase Cas9 et un ARN guide (ARNg) (Mali et al. 2013) (Figure 25). Le site cible de l'ADN doit être constitué de la séquence complémentaire à l'ARNg et d'un motif PAM, reconnu par la protéine Cas9.

Parmi les différents systèmes Cas, la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), actuellement la plus utilisée comme outil d'édition de gènes, identifie le motif PAM 5'-NGG-3' sur le brin d'ADN non cible (Cong and Zhang 2015; Mir et al. 2018). Cette protéine Cas9 est composée de deux domaines à activité nucléase : (1) le domaine HNH qui va couper le brin cible, sur lequel s'est hybridé l'ARNg ; (2) le domaine RuvC qui va lui couper le brin opposé, sur lequel se trouve le motif PAM (figure 25A) (Doudna and Charpentier 2014 ; Jiang and Doudna 2017).

L'ARNg constitué de l'hybridation entre le crRNA et le tracrRNA est composé 20 nucléotides complémentaires à la séquence cible et de 12 nucléotides complémentaires au tracrRNA (figure 25B). Le tracrRNA permet lui de s'hybrider au crRNA et de se lier à la protéine Cas9 formant ainsi un complexe ribonucléoprotéine (RNP : Cas9 + crRNA + tracrRNA). Pour une édition génome plus efficace, il a été mis au point un ARNg chimérique où le crRNA et le tracrRNA sont déjà fusionnés, formant ainsi l'ARNg.

En terme de mécanisme d'action, la liaison de la RNP avec l'ADN cible va dans un premier temps induire l'ouverture de la double hélice d'ADN et à l'ARNg de s'hybrider à la séquence complémentaire. Puis, les domaines à activité nucléase clivent les deux brins d'ADN trois nucléotides en amont du motif PAM. Cette cassure double brin (DSB) va ainsi déclencher un processus de réparation de l'ADN (figure 25).



**Figure 25 : Schéma du mécanisme moléculaire du système CRISPR/Cas9**

- (A) La protéine Cas9 contenant deux domaines nucléases : RuvC, qui clive le brin non ciblé par l'ARNg et le domaine HNH, qui clive le brin d'ADN complémentaire à l'ARNg.
- (B) L'ARNg est composé d'un crRNA et d'un tracrRNA. Le crRNA est constitué de 20 nucléotides complémentaires à la séquence cible, et quelques nucléotides supplémentaires, complémentaires au tracrRNA. Le tracrRNA se lie au crRNA formant l'ARNg.
- (C) L'ARNg se lie ensuite à la protéine Cas9 formant la complexe Cas9/ARNg. Lors de la liaison de ce complexe à l'ADN, cela permet l'ouverture de l'ADN double brin, et l'hybridation de l'ARNg au brin cible. Les domaines nucléases de la Cas9 clivent les deux brins d'ADN, trois bases avant le PAM.
- (D) La cassure double brin dans l'ADN induit une réparation endogène pouvant être deux types : HDR permettant une édition précise du génome avec l'apport d'une matrice de réparation ou NHEJ introduisant des courtes insertions ou délétions (indels) au niveau du site de coupure.

*Adapté de (Janik et al. 2020)*

## b) Deux mécanismes de réparation de l'ADN double brin

Il existe deux mécanismes de réparation endogènes majeurs qui sont activés après une cassure double brin : la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et la réparation dirigée par homologie (HDR) (Haapaniemi et al. 2018) (figure 25) :

- Le mécanisme **NHEJ** majoritaire, pouvant survenir à n'importe quelle phase du cycle cellulaire, implique une ligation de manière aléatoire des extrémités à bout franc générées au niveau du site de coupure, générant des insertions et/ou délétions (indels) au niveau de ce site. Ces indels peuvent induire un décalage du cadre, aboutissant dans la majorité des cas à l'apparition de codons stops prématurés.
- Le deuxième mécanisme de réparation par **HDR**, nécessite l'apport d'une matrice d'ADN servant de modèle de réparation (S. Lin et al. 2014). Cette séquence d'ADN, contenant la séquence à introduire, est bordée par des séquences homologues à celles entourant la coupure. Cela permet ainsi un échange entre l'ADN cible et l'ADN donneur, par recombinaison homologue, conduisant à l'intégration de la séquence d'intérêt au niveau de la coupure, et à l'édition du génome. Cependant en plus d'être possible qu'en présence d'une matrice d'ADN, ce mécanisme de réparation possède une efficacité moins importante (entre 0,5 et 20%) que celle par NHEJ (20 à 60%) ; cela s'explique notamment en raison des protéines impliquées dans la recombinaison homologue, qui sont exprimées uniquement lors des phases S et G2 du cycle cellulaire (Maruyama et al. 2015).

Combiné aux différents mécanismes de réparation de l'ADN, ce système CRISPR/Cas9 peut ainsi être utilisé pour différentes stratégies d'édition du génome. En effet, associé à une réparation par NHEJ, le système CRISPR/Cas9 va être utilisé essentiellement pour des stratégies dites de Knock-out (Maruyama et al. 2015; Vogt and He 2023), conduisant à la perte d'expression d'un gène. A l'inverse, une réparation médiée par HDR, va aboutir à des stratégies de knock-in, permettant de corriger une mutation en la remplaçant par une séquence saine, ou au contraire d'induire une mutation précise pour l'étude d'une maladie (se trouvant dans la matrice de réparation qui est apportée), mais également d'intégrer une séquence exogène (par exemple un gène rapporteur) (S.-S. Wu et al. 2020).

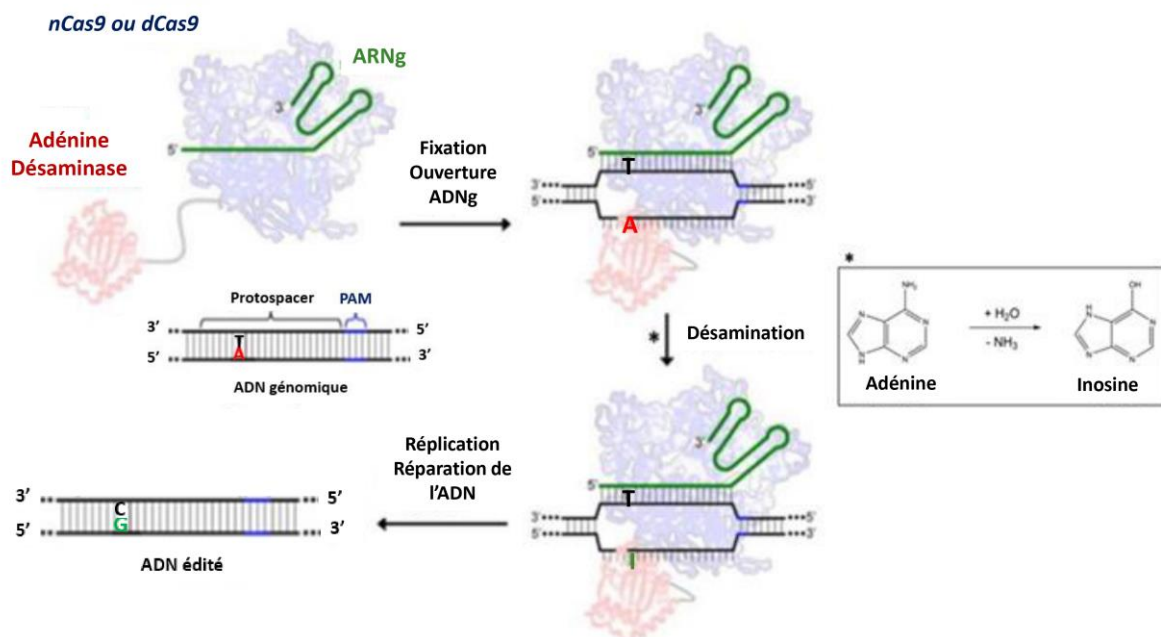
### c) Limitations du système CRISPR/Cas9

L'une des limitations majeures de l'édition du génome médiée par la technologie CRISPR/Cas9 réside dans le risque d'effets hors cible dits « off-target ». Bien que la spécificité de la protéine Cas9 est étroitement contrôlée par la présence d'un motif PAM adjacent à la séquence cible et par la séquence de l'ARNg, une activité potentielle de clivage peut se produire en dehors de la séquence cible. Cela est en partie dû à l'activité de la protéine Cas9 pouvant induire une cassure double brin même lors d'une hybridation partielle (mésappariements) de l'ARNg à la séquence cible (Cong and Zhang 2015). Néanmoins, plusieurs études ont été réalisées afin d'obtenir des mutations de la protéine Cas9, plus spécifiques. En 2016, l'équipe du Pr. Feng Zhang a pu générer une protéine eSpCas9 (« Enhanced specificity » SpCas9), au sein de laquelle l'activité hélicase a été atténuée, étant ainsi capable de réduire les off-target, tout en maintenant une activité robuste (Slaymaker et al. 2016). Cette même année, une autre étude a permis la génération d'une protéine SpCas9-HF1 (High-fidelity), hébergeant des altérations au niveau de certains résidus, afin de réduire les contacts non spécifiques (principalement les liaisons hydrogènes) entre la protéine et l'ADN, permettant ainsi de réduire considérablement les effets off-target (Kleinstiver et al. 2016).

La nécessité d'un motif PAM à proximité de la séquence d'ADN, représente également une limitation, car celui-ci est indispensable pour la reconnaissance de la séquence cible par la Cas9. La protéine Cas9 la plus couramment utilisée de *Streptococcus pyogenes* est capable de reconnaître un motif PAM relativement court 5'-NGG-3'. Si ce motif NGG n'est pas présent au niveau de la séquence cible, l'édition n'est pas possible. Pour pallier à cette limitation et permettre d'agrandir la fenêtre de ciblage des gènes, de nouveaux variants de la protéine Cas9 ont été développés comme la SpCas9-NG, capable de reconnaître un motif très court 5'-NG-3' (Nishimasu et al. 2018) ou encore la xCas9 capable quant à elle de reconnaître différents motifs PAM tels que 5'-NG-3', 5'-GAA-3' et 5'-GAT-3' (Hu et al. 2018 ; H. K. Kim et al. 2020).

#### D. Base Editing et Prime Editing

Plus récemment, la technologie de Base Editing dérivée de la technologie CRISPR-Cas9, a été décrite et permet d'éditer très précisément un nucléotide, sans générer de coupure double brin et sans apport de matrice de réparation (Komor et al. 2016). Cette nouvelle approche qui consiste à convertir spécifiquement un nucléotide nécessite un ARNg, une protéine Cas9 déplétée de sa fonction de clivage, fusionnée à une enzyme désaminase (figure 26).



**Figure 26 : Technologie du Base Editing (Exemple : Adénine Désaminase)**

La Cas9D10A (Cas9 déplétée de son activité catalytique) fusionnée à une adénine désaminase forme un complexe avec l'ARN guide (ARNg). L'hybridation de l'ARNg sur la séquence cible 3 nucléotides avant la séquence PAM, induit une ouverture de l'ADN double brin, et permet de positionner l'adénine désaminase dans une fenêtre de -3 à -12 nucléotides à l'extrémité 5' de la séquence PAM. L'adénine désaminase se positionne au niveau du nucléotide cible A (Adénine), et permet d'induire une désamination hydrolytique de l'Adénine (A) en Inosine (I), qui sera ensuite lors de la réplication ou réparation de l'ADN transformée en Guanine (G).

*Adapté de (Komor et al. 2016)*

Les protéines Cas9 utilisées, n'induisant pas de cassure double brin, peuvent-être :

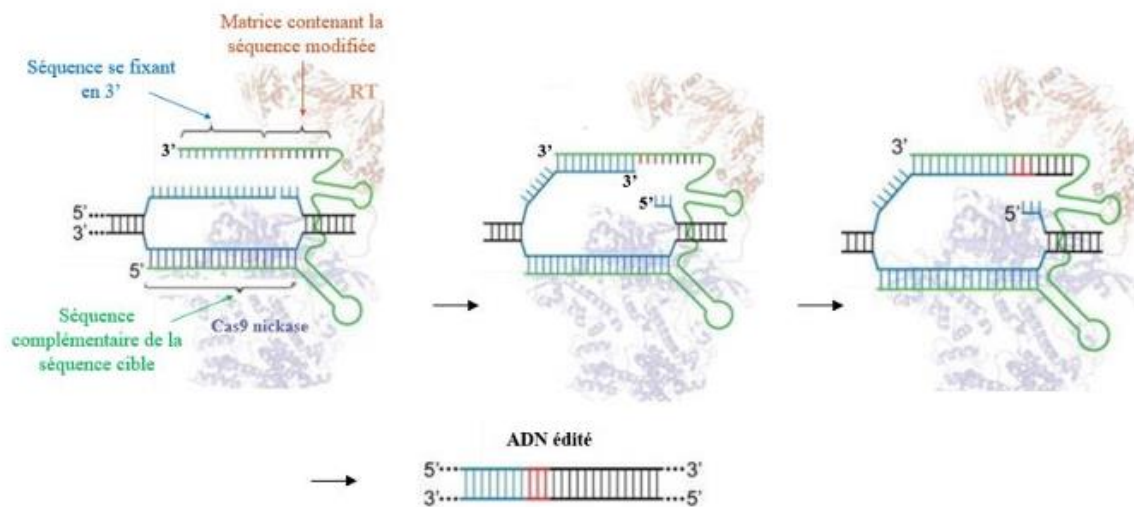
- Les protéines nCas9 (nickases) : Cas9D10A (substitution de l'aspartate en position 10 par une alanine au niveau du domaine RuvC) ou Cas9 H840 (substitution d'une histidine par une alanine au niveau du domaine HNH) permettent le clivage d'un seul brin d'ADN.
- La protéine dCas9 (dead Cas9) au sein de laquelle les deux domaines à activité nucléase, RuvC et HNH ont été mutés, et est donc déplétée de toute fonction catalytique, ne générant aucun clivage de l'ADN.

L'enzyme désaminase fusionnée à cette protéine Cas9 mutée (Cas9-Enzyme désaminase), grâce à son activité désamination va permettre la conversion d'un nucléotide en un autre, et peut-être de deux types : Cytidine désaminase permettant la conversion d'une cytidine en thymine (C→T) ou Adénine désaminase, permettant la conversion d'une adénine en guanine (A→G) (S.-S. Wu et al. 2020) .

En terme de mécanisme d'action, l'ARNg fusionné au complexe protéique formé de la protéine Cas9 mutée et de l'enzyme désaminase, va permettre de positionner celui-ci sur la séquence cible, au plus proche du nucléotide à convertir. Puis, par exemple dans le cas de l'Adénine désaminase, celle-ci va induire une désamination hydrolytique de l'Adénine (A) en Inosine (I) qui sera lue comme une Guanine (G) par les enzymes polymérases, permettant ainsi la conversion d'Adénine en Guanine (A → G) (Schatoff, Zafra, and Dow 2019).

Ces éditeurs de bases peuvent ainsi corriger ou induire des mutations de manière extrêmement précise, dans divers modèles cellulaires et animaux (Rees and Liu 2018; Molla and Yang 2019; B. Yang, Yang, and Chen 2019). Cependant un des facteurs limitant de cette technologie réside dans la fenêtre d'édition de l'enzyme désaminase, exigeant la sélection d'un ARNg permettant de positionner le complexe protéique Cas9-enzyme désaminase au plus proche de la mutation. De plus cela peut également engendrer la conversion de nucléotides non cibles présents à proximité du nucléotide à modifier (effet bystander) (Rees and Liu 2018). De plus cette technologie se limite à la transition de 4 bases seulement (c'est-à-dire C→T, G→A, A→G et T→C) et ne peut effectuer que deux transversions (C→G et C→A) (Komor et al. 2016 ; Gaudelli et al. 2017).

De ce fait, pour pallier à ses limitations et pour ouvrir encore plus le champ d'applications, en 2019 un nouveau système d'édition du génome a été développé par l'équipe du Pr. David Liu : le Prime Editing. Cette stratégie permet d'induire de petites insertions et délétions ciblées ainsi que les 12 conversions base-à-base possibles, sans nécessité de cassure double brin et de matrice de réparation (Anzalone et al. 2019) (Sürün et al. 2020; Doman et al. 2022) (figure 27).



**Figure 27 : Représentation schématique de la technologie Prime Editing**

La protéine Cas9 nickase est fusionnée à une Reverse Transcriptase (RT). Le pegRNA est composé d'un ARN guide avec une séquence en 5' se liant à l'ADN (flèche verte), d'une séquence en 3' (flèche bleu) permettant de se lier à l'extrémité dépassante 3' qui sera générée après cassure d'un des brins, et d'une matrice contenant la séquence modifiée à insérer (flèche marron). Après cassure d'un des brins d'ADN, par la protéine Cas9, la séquence en 3' du pegRNA s'hybride à l'extrémité dépassante de l'ADN cible. La reverse transcriptase fusionnée à la protéine Cas9 va initier la transcription inverse à partir de la matrice présente sur le pegRNA. Le brin édité est incorporé dans l'ADN au niveau de la cassure simple brin ; et l'extrémité 5' dépassante de l'ADN d'origine est retirée par une endonucléase cellulaire. Un mécanisme de réparation cellulaire permet ensuite de copier les informations.

*Adapté de (Anzalone et al. 2019)*

Pour ce faire cette approche nécessite un complexe formé d'une protéine Cas9 nickase (Cas9 H840A) fusionnée à une reverse transcriptase et un long ARNg (pegRNA) contenant la séquence permettant de guider le complexe au niveau du site cible et la séquence éditée désirée. Guidé par l'ARN guide, ce complexe se positionne au niveau de l'ADN à éditer. Après coupure du brin opposé par la Cas9 nickase, l'activité reverse transcriptase copie alors la séquence désirée en utilisant le pegRNA comme matrice, permettant l'introduction de la séquence désirée au niveau de l'ADN cible.

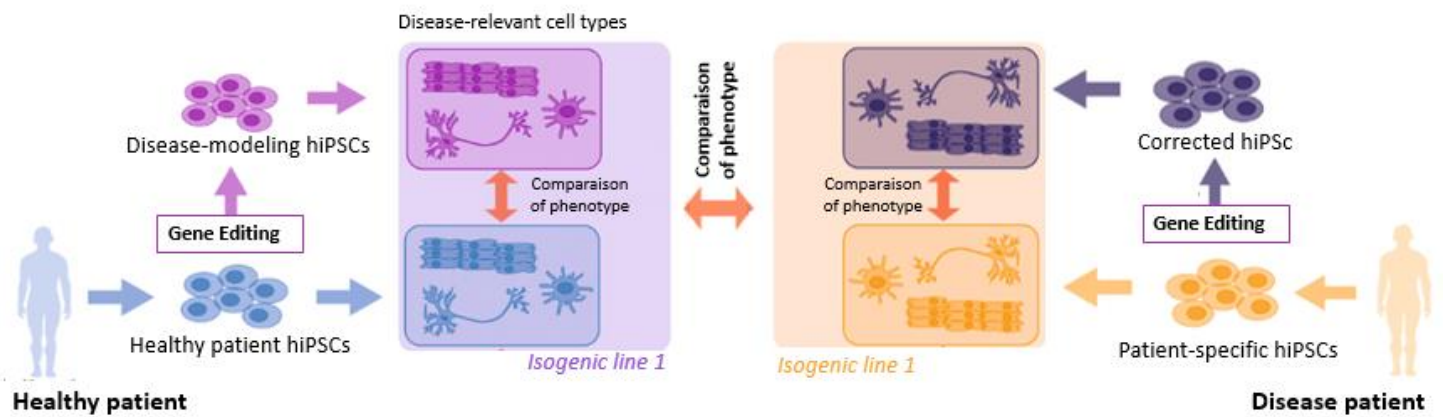
Pour conclure, la combinaison de l'utilisation des technologies CRISPR et des CSP représente des perspectives d'innovations très importantes, notamment pour l'étude de maladies monogéniques.

En effet, dans le cadre d'approches de modélisation pathologique à partir de CSP, une hétérogénéité est régulièrement observée en raison de variations entre les individus. Un des défis majeurs réside alors dans la discrimination entre les phénotypes résultant de la mutation causale de la maladie et ceux dus à de simples variations inter-individus. Pour pallier à ces variations pouvant être causées par le fond génétique des lignées cellulaires, ou encore par d'autres variables telles que l'épigénétique, le sexe ou l'âge (De Masi et al. 2020), la génération de lignées isogéniques est devenue primordiale pour les programmes de modélisation pathologique et est fortement recommandée par les directives de l'ISSCR (International Society for Stem cell research) (Ludwig et al. 2023).

Le développement de ces lignées a été rendu possible par les approches d'édition du génome détaillées ci-dessus, qui permettent d'effectuer des modifications géniques ciblées dans tous types cellulaires, grâce à des outils moléculaires spécifiques, pour induire ou réparer des mutations responsables de maladies (figure 28). D'une part, il est possible de créer la mutation dans des lignées saines, puis de comparer ensuite la lignée mutée et la lignée saine pour étudier l'effet de la mutation. D'autre part, il est également possible de corriger la mutation à partir de cellules de patients malades, afin de comparer la lignée porteuse de la mutation et la lignée corrigée afin d'étudier si cela a permis la restauration de phénotypes pathologiques.

De manière générale, cette approche permet ainsi d'obtenir des lignées ayant pour seule variable le changement génétique induit volontairement, et permet de garantir l'identification de l'impact direct de la mutation sur les phénotypes pathologiques identifiés.





**Figure 28 : Elaboration de lignées isogéniques, grâce à l'utilisation de technologies d'édition du génome**

Les hiPSc peuvent être dérivées de patients sains (bleu) et malades (orange), et après différenciation en un type de cellule approprié, une comparaison des phénotypes moléculaires ou cellulaires peut être effectuée. Pour minimiser la variabilité due au fond génétique, l'édition du génome peut être utilisée soit pour corriger les cellules dérivées du patient (bleu foncé), soit pour introduire des lésions causales putatives dans des cellules dérivées d'individus sains (violet). Cela conduit à des paires isogéniques de lignées cellulaires (boîte violette ou boîte orange) qui identifient le véritable impact du changement artificiel sur le phénotype cellulaire.

*Adapté de (Bassett 2017)*

Enfin, l'ensemble des nombreuses qualités indiscutables de ces deux outils, hiPSc et édition du génome, dans le cadre de projet de recherche, l'utilisation de ceux-ci a été au cœur de mon projet de doctorat, afin de modéliser une maladie génétique, l'Epidermolyse Bulleuse Simple et de permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires.

# Problématique et démarches expérimentales

L'Epidermolyse Bulleuse simple est une maladie cutanée principalement causée par des mutations dans les gènes pour les kératine 5 (*KRT5*) ou 14 (*KRT14*) qui altèrent l'assemblage du réseau de filaments intermédiaires de kératines dans les kératinocytes basaux de l'épiderme. Ce défaut moléculaire, entraîne une cytolysse cellulaire, induisant un décollement entre le derme et l'épiderme. D'un point de vue phénotypique, cela se traduit par la présence de bulles et une inflammation cutanée.

Ces dernières années, malgré des avancées majeures sur l'étude de l'Epidermolyse bulleuse simple, la compréhension et l'implication des mécanismes physiopathologiques restent mal compris. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif ; les approches thérapeutiques se limitent au traitement des plaies, et à la gestion de la douleur. La principale limitation à la compréhension et au développement de thérapies efficaces repose sur le manque de disponibilité de modèles d'EBS *in vivo* ou *in vitro*, pertinents et pertinents. En effet les modèles actuels reposent majoritairement sur l'utilisation de : (1) modèles murins, mourant précocement et dont la peau est anatomiquement différente de la peau humaine ; (2) kératinocytes primaires, issus de biopsies de patients (méthode invasive) dont la prolifération *in vitro* reste limitée ; (3) kératinocytes primaires immortalisés, dont le processus d'immortalisation aboutit à la modification du cycle cellulaire des cellules.

C'est dans ce contexte que le premier objectif de ma thèse a consisté à participer au développement d'un nouveau modèle cellulaire, en exploitant les propriétés des cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSc) afin d'obtenir une source cellulaire illimitée pour la modélisation de l'EBS. Dans une approche de modélisation pathologique nous avons généré des kératinocytes dérivés d'hiPSc de patients EBS porteurs de mutations au sein du gène *KRT5* (K-EBS) et de patients sains (K-WT), qui ont ensuite été comparés entre eux afin de vérifier si ce nouveau modèle cellulaire permet de récapituler les principaux phénotypes associés à l'EBS. De plus une analyse transcriptomique comparative à partir de ces lignées cellulaires de K-EBS et K-WT a été effectuée afin d'approfondir les mécanismes moléculaires sous-jacents aux mutations au sein du gène *KRT5*. Cette analyse m'a ensuite amenée à orienter la suite de mes travaux de thèse sur l'étude du profil cytokinique pro-inflammatoire dans l'EBS, à l'aide du nouveau modèle cellulaire pertinent que l'on a mis au point, dans le but de comprendre l'origine et les conséquences de la composante inflammatoire dans l'EBS.

En parallèle, un autre objectif de ma thèse a consisté à utiliser le système CRISPR/Cas9, outil puissant d'édition du génome pour générer une lignée cellulaire d'hiPSc EBS isogénique, ne différant ainsi que par une seule modification génétique. Cette stratégie permettant de s'affranchir des variations dues

au fond génétique entre les patients, ainsi qu'à d'autres variables telles que l'âge et le sexe, a donc été utilisée pour générer cette lignée isogénique, afin d'établir un lien direct entre la mutation causale et la composante inflammatoire dans l'EBS.

L'ensemble de ces travaux s'est articulé autour de trois axes qui seront détaillés dans la suite de ce manuscrit :

**Partie 1** : Développement d'un modèle d'étude, à partir de kératinocytes dérivés d'hiPSc, pour l'identification et l'exploration des phénotypes pathologiques de l'EBS.

*Ces travaux ont été valorisés par une publication dans Journal of Investigative Dermatology en 2022.*

**Partie 2** : Génération d'une lignée isogénique de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS, par la technologie CRISPR/Cas9, afin de corréliser spécifiquement la mutation aux phénotypes pathologiques mis en évidence.

*Cette partie vous est présentée sous forme de résultats.*

**Partie 3** : Etude du phénotype cytokinique pro-inflammatoire dans l'EBS.

*Cette partie vous est présentée sous forme de résultats.*

## Résultats

# **Partie 1 :**

## **Article de Recherche**

**« Les kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines, un modèle utile pour identifier et explorer les phénotypes pathologiques de l'Epidermolyse bulleuse simple »**

### **Human-Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Keratinocytes, a Useful Model to Identify and Explore the Pathological Phenotype of Epidermolysis Bullosa Simplex**

Julien Coutier<sup>1,6</sup>, Manon Bonnette<sup>2,3,6</sup>, Sabrina Martineau<sup>2,3</sup>, Aurélie Mercadier<sup>1</sup>, Sophie Domingues<sup>1</sup>, Manoubia Saidani<sup>1</sup>, Margot Jarrige<sup>1</sup>, Hélène Polveche<sup>1</sup>, Annabelle Darle<sup>1</sup>, Nathalie Holic<sup>2,3</sup>, Smail Hadj-Rabia<sup>4,5</sup>, Christine Bodemer<sup>4,5</sup>, Gilles Lemaitre<sup>2,3</sup>, Cécile Martinat<sup>2</sup> and Christine Baldeschi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Stem Cell Study Center, Corbeil-Essonnes, France

<sup>2</sup>NSERM U861, I-Stem, Association Française contre les Myopathies, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, Corbeil-Essonnes, France

<sup>3</sup>U861, Evry Val d'Essonne University, Paris-Saclay University, Corbeil-Essonnes, France;

<sup>4</sup>Department of Dermatology, Reference Centre for Genodermatoses and Rare Skin Disease (MAGEC), Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique - Hôpitals of Paris, Paris, France

<sup>5</sup>University of Paris, France

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work

Correspondence : Christine Baldeschi, Genodermatoses I-stem, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases UMR U861, 28 rue Henri Desbrùères, Corbeil-Essonnes 91100, France. E-mail: cbaldeschi@istem.fr

#### **Objectif de l'étude :**

Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents aux mutations au sein du gène *KRT5* ne sont pas clairement compris à ce jour, en raison de modèles animaux et cellulaires qui ne sont pas suffisamment pertinents, ralentissant ainsi l'identification de traitements adaptés.

L'objectif principal de cette étude a donc consisté à développer un nouveau modèle cellulaire, basé sur l'utilisation de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSc), pour modéliser l'EBS et ainsi permettre par la suite une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et leur implication dans l'EBS.

## **1. Génération et caractérisation d'un modèle de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS**

La première étape de ce projet a consisté à générer des cellules d'intérêts pour l'étude de l'EBS, à savoir des kératinocytes épidermiques basaux. Pour ce faire, nous avons à disposition 2 lignées d'hiPSc ayant été reprogrammées à partir de fibroblastes de 2 patients sains non affectés (hiPSc WT1 et WT2), ou de trois patients porteurs de mutations au sein du gène *KRT5* (hiPSc EBS1, EBS2 et EBS3).

Dans un premier temps nous avons caractérisé ces hiPSc par cytométrie en flux pour les marqueurs de pluripotence TRA1-81 et SSEA-3, dont les résultats ont montré un maintien de la pluripotence, ce qui est essentiel pour que les hiPSc puissent être différenciées correctement en cellules d'intérêt. Par la suite selon un protocole de différenciation kératinocytaire adapté de Itoh et al (Itoh et al. 2011 ; Domingues et al. 2022), nous avons généré des kératinocytes dérivés d'hiPSc WT (K-WT1, K-WT2) et EBS (K-EBS1, K-EBS2, K-EBS3) par différenciation des hiPSc. Les K-WT et K-EBS obtenus présentaient une morphologie pavimenteuse typique des kératinocytes. Une analyse par cytométrie de flux a permis de montrer que plus de 95% des K-WT et K-EBS obtenus exprimaient la kératine 5 (K5) et la kératine 14 (K14), marqueurs spécifiques des kératinocytes basaux. De plus, une analyse par Western blot a permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence d'expression de K5 et K14 entre les K-EBS et les K-WT, signifiant qu'une mutation sur le gène *KRT5* n'altère pas l'expression de ces protéines. La fonctionnalité des K-WT et K-EBS a été confirmée par leur capacité à générer un épiderme pluristratifié *in vitro*. Une analyse immunohistochimique sur ces coupes d'épidermes reconstruits a permis de montrer que des marqueurs basaux et de différenciation tel que K5, K14, K10 et l'involucrine étaient exprimés et localisés dans les différentes couches respectives de l'épiderme.

L'ensemble de ces caractérisations a ainsi permis de montrer que notre approche permettait une conversion efficace et robuste d'hiPSc en une population de kératinocytes basaux homogène, suggérant que les mutations au sein du gène *KRT5* n'altèrent pas la capacité des hiPSc à se différencier en kératinocytes.

## **2. Mise en évidence des phénotypes pathologiques**

A l'issue de l'obtention et de la caractérisation de ces kératinocytes dérivés d'hiPSc WT et EBS, ceux-ci ont été comparés afin d'étudier si les K-EBS reproduisent les principaux phénotypes cellulaires et moléculaires de l'EBS décrits dans d'autres modèles d'études.

La présence d'agrégats de kératines ayant déjà été montrée dans le cytoplasme de kératinocytes immortalisés générés à partir de biopsies cutanées de patients EBS, sous l'effet d'un stress thermique (Wally, Lettner, et al. 2013) ou d'une variation osmotique (D'Alessandro et al. 2002) et étant décrite comme l'un des principaux stigmates cellulaires associé à l'EBS, nous avons évalué ce phénotype dans les K-EBS, après un choc osmotique. Il a été observé, après 4h de récupération, une persistance importante des agrégats de kératine dans les K-EBS, contrairement aux K-WT. Ces résultats permettent de valider la sensibilité accrue des K-EBS au stress osmotique.

Dans un second temps, nous avons évalué les conséquences de l'agrégation de kératines, sur l'expression des protéines hémidesmosomales, du fait de la fonction des filaments intermédiaires de kératines (KIF) à participer à l'adhésion des kératinocytes basaux à la membrane extracellulaire via les hémidesmosomes. L'analyse par immunofluorescence a permis de révéler : (1) une diminution de l'expression de la plectine, de l'intégrine  $\alpha 6$  et l'intégrine  $\beta 4$  dans les K-EBS, par rapport aux K-WT (2) une absence de différence d'expression de BP230 et BP180, ainsi que des composants de la lame basale  $\beta 3$  et  $\gamma 2$ -laminine. Ces résultats montrent que les mutations au sein du gène *KRT5* affectent l'expression des protéines hémidesmosomales mais suggèrent que cela n'induit aucun changement dans l'expression des composants impliqués dans l'adhésion épidermique à la lame basale.

Par la suite, l'impact fonctionnel des mutations *KRT5* a été évalué et a permis de montrer une migration accrue des K-EBS par rapport aux K-WT, ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire.

Afin de mettre en évidence les voies de signalisation sous-jacentes aux différents phénotypes cellulaires mis en évidence, nous avons évalué l'activation des voies de signalisation les plus courantes et avons mis en évidence par Western blot : (1) une diminution de l'activation des voies de signalisation ERK (Extracellular signal-regulated kinases) et JNK (c-jun N-terminal kinase) dans les K-EBS par rapport aux K-WT (2) aucune différence d'expression significative d'AKT, mTor et p38.

Pour l'ensemble des phénotypes analysés, les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS reproduisent les défauts observés dans les kératinocytes primaires EBS que l'on a utilisé en contrôle dans notre étude (ceux-ci sont dérivés de prépuce de patients à partir desquels les hiPSc EBS-2 ont été développés).

Cela montre ainsi que les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS sont un modèle relevant pour l'étude de l'EBS.

### **3. Approche pharmacologique : utilisation du composé PBA pour la restauration de certains phénotypes pathologiques associés à l'EBS**

A l'issue de ces différentes observations et résultats, nous avons évalué la compatibilité de notre modèle cellulaire avec des applications de criblage pharmacologique. Pour ce faire, nous avons cultivé les K-EBS en présence d'acide 4-phényl butyrique (PBA), chaperon chimique décrit pour faciliter le repliement des protéines et permettant de réduire l'agrégation de kératines dans des kératinocytes primaires EBS immortalisés après un choc thermique (Spörrer et al. 2019). Nous avons pu mettre en évidence dans les K-EBS traités au PBA : (1) une diminution de 40% du nombre d'agrégats de kératines cytoplasmiques (2) une migration cellulaire plus lente (3) une capacité de prolifération plus rapide (4) un effet positif sur l'activation de la voie de signalisation ERK. Le PBA a donc permis de corriger les principaux phénotypes pathologiques dans les K-EBS.

### **4. Identification de mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'EBS, par analyse transcriptomique (RNA-Seq)**

Enfin, pour permettre une caractérisation plus approfondie des mécanismes moléculaires sous-jacents aux mutations *KRT5* dans l'EBS, nous avons réalisé une analyse transcriptomique différentielle, en comparant les 3 lignées de K-WT et 3 lignées de K-EBS. Cette analyse a permis d'identifier 138 gènes différentiellement exprimés, dont 41 gènes régulés à la baisse et 97 gènes régulés à la hausse.

Ces gènes différentiellement exprimés ont été soumis à une analyse d'enrichissement et le regroupement d'annotations fonctionnelles a permis de mettre en évidence trois clusters fortement liés comprenant des gènes impliqués dans : (1) l'organisation de la matrice extracellulaire (2) l'organisation des chromosomes et du packaging de l'ADN (3) la chimiotaxie cellulaire et la réponse inflammatoire.

### **Conclusions :**

Dans le cadre de notre approche de modélisation pathologique de l'Epidermolyse Bulleuse Simple, nous sommes parvenus à générer un nouveau modèle cellulaire basé sur l'utilisation de kératinocytes dérivés d'hiPSc provenant de patients porteurs de mutations au sein du gène *KRT5*, qui récapitulent les principaux stigmates associés à l'EBS. La pertinence de ce modèle a été validée grâce à la comparaison systématique avec des kératinocytes primaires EBS.

L'utilisation de ce modèle a également confirmé l'effet du PBA sur la stabilité des filaments intermédiaires de kératines au sein des cellules K-EBS. Ces résultats montrent la compatibilité de notre modèle avec un potentiel criblage pharmacologique afin d'identifier des molécules permettant d'améliorer ou de restaurer les phénotypes pathologiques mis en évidence.

Enfin, les résultats obtenus par analyse transcriptomique ont permis de révéler un ensemble de gènes différentiellement exprimés, révélant un enrichissement de processus liés à la matrice extracellulaire, au packaging de l'ADN et à la réponse inflammatoire. Notre nouveau modèle cellulaire pourrait ainsi permettre d'analyser les conséquences fonctionnelles de ces gènes au sein des K-EBS, et ainsi ouvrir la voie à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'EBS.

C'est dans ce contexte que la suite de mon projet de thèse a porté sur l'étude de la composante inflammatoire et plus précisément du profil cytokinique pro-inflammatoire, à partir de ce modèle cellulaire, qui sera détaillée en « **Partie 3** »



# Human-Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Keratinocytes, a Useful Model to Identify and Explore the Pathological Phenotype of Epidermolysis Bullosa Simplex



Julien Coutier<sup>1,6</sup>, Manon Bonnette<sup>2,3,6</sup>, Sabrina Martineau<sup>2,3</sup>, Aurélie Mercadier<sup>1</sup>, Sophie Domingues<sup>1</sup>, Manoubia Saidani<sup>1</sup>, Margot Jarrige<sup>1</sup>, Hélène Polveche<sup>1</sup>, Annabelle Darle<sup>1</sup>, Nathalie Holic<sup>2,3</sup>, Smail Hadj-Rabia<sup>4,5</sup>, Christine Bodemer<sup>4,5</sup>, Gilles Lemaître<sup>2,3</sup>, Cécile Martinat<sup>2</sup> and Christine Baldeschi<sup>2,3</sup>

Epidermolysis bullosa simplex (EBS), an autosomal dominant skin disorder, is characterized by skin fragility. Genetically, the majority of cases are related to missense sequence variations in two keratin genes *K5* or *K14*, leading to cytolysis of basal keratinocytes (KCs) and intraepidermal blistering. Progress toward the identification of treatments has been hampered by an incomplete understanding of the mechanisms underlying this disease and availability of relevant and reliable in vitro models recapitulating the physiopathological mechanisms. Recent advances in stem cell field have fueled the prospect that these limitations could be overcome, thanks to the availability of disease-specific human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). In this study, we generated hiPSC-derived KCs from patients carrying keratin gene *K5*-dominant sequence variations and compared them with nonaffected hiPSC-derived KCs as well as their primary counterparts. Our results showed that EBS hiPSC-derived KCs displayed proliferative defects, increased capacity to migrate, alteration of extracellular signal–regulated kinase signaling pathway, and cytoplasmic keratin filament aggregates as observed in primary EBS KCs. Of interest, EBS hiPSC-derived KCs exhibited downregulation of hemidesmosomal proteins, revealing the different effects of keratin gene *K5* sequence variations on keratin cytoskeletal organization. With a combination of culture miniaturization and treatment with the chaperone molecule 4-phenylbutyric acid, our results showed that hiPSC-derived KCs represent a suitable model for identifying novel therapies for EBS.

*Journal of Investigative Dermatology* (2022) 142, 2695–2705; doi:10.1016/j.jid.2022.04.009

## INTRODUCTION

Epidermolysis bullosa simplex (EBS) is an inherited skin fragility disorder characterized by basal keratinocyte (KC) cytolysis, intraepidermal blister formation, and skin fragility. No curative treatment has been identified yet, and current standards of care consist of wound and pain management. This disease is primarily caused by dominantly inherited

sequence variation in the keratin (K) 5 gene *K5* or *K14* gene (Bolling et al., 2011), encoding type II and type I intermediate filaments (Steinert, 1990) that copolymerize into heterodimers to form keratin intermediate filaments and participate in cytoskeleton architecture (Fuchs, 1996; Lee et al., 2012). Keratin intermediate filaments interact with BP180, BP230, plectin, and the basal  $\alpha6\beta4$ -integrin subunits to form hemidesmosome (Tsuruta et al., 2011). The coiled–coil 1 domain of *K5* and *K14* appears important for the binding to plectin (Bouameur et al., 2014) and consequently to interact with  $\alpha6\beta4$ -integrins (Seltmann et al., 2013). Therefore, keratin intermediate filaments participate in KCs adhesion, intracellular cohesion, structure, and integrity (Seltmann et al., 2013). Despite these extensive studies, the mechanisms by which keratin sequence variation lead to EBS are still not clearly understood, therefore slowing down the identification of adapted treatments.

This fact is worsened by the lack of reliable EBS models. Most of the studies on EBS have been based on animal models. Although *K5*- or *K14*-knockout mice models reproduced skin blistering (Cao et al., 2001; Lu et al., 2007), murine skin is anatomically different from human skin. In addition, differences between mouse models have been described, and affected mice die soon after birth (Bruckner-Tuderman et al., 2010). More recently, cultured human

<sup>1</sup>Stem Cell Study Center, Corbeil-Essonnes, France; <sup>2</sup>INSERM U861, I-Stem, Association Française contre les Myopathies, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, Corbeil-Essonnes, France; <sup>3</sup>U861, Evry Val d'Essonne University, Paris-Saclay University, Corbeil-Essonnes, France; <sup>4</sup>Department of Dermatology, Reference Centre for Genodermatoses and Rare Skin Disease (MAGEC), Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique - H  pitals of Paris, Paris, France; and <sup>5</sup>University of Paris, France

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Christine Baldeschi, Genodermatoses I-stem, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases UMR U861, 28 rue Henri Desbru  eres, Corbeil-Essonnes 91100, France. E-mail: cbaldeschi@istem.fr

Abbreviations: 4-PBA, 4-phenyl butyric acid; EBS, epidermolysis bullosa simplex; ERK, extracellular signal–regulated kinase; hiPSC, human induced pluripotent stem cell; K, keratin; KC, keratinocyte; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; WT, wild type

Received 5 July 2021; revised 5 April 2022; accepted 6 April 2022; accepted manuscript published online 28 April 2022; corrected proof published online 10 June 2022

primary KCs derived from biopsies of patients with EBS have been shown to partially reproduce the main cellular stigmata associated with EBS, such as keratin aggregates after heat-shock treatments (Chamcheu et al., 2011a, 2011b). However, these primary cultures have the disadvantages of being short lived and of having variability over time, making them unsuitable for more extensive functional assays. Consequently, patient-derived immortalized cell lines have been generated. Although these cell lines exhibit the same phenotypes as the primary cultures, immortalized processes might impair physiopathological mechanisms (Chamcheu et al., 2009).

Therefore, access to an unlimited source of human KCs not genetically modified represent a breakthrough for EBS pathological modeling and consequently the development of drug screening campaigns. In this context, using self-renewal and pluripotency of disease-specific human induced pluripotent stem cells (hiPSC) offer an interesting alternative solution. Although previous studies have already shown the feasibility to generate hiPSC from the biopsies of patients with EBS, none of them has shown the potential of using these EBS hiPSCs to generate pathological KCs. To evaluate this, we based our approach on our previous protocol allowing the efficient and robust conversion of hiPSCs into homogenous basal KCs. In this study, we showed the potential offered by hiPSCs to develop a model for EBS able to reproduce the main cellular stigmata associated with *K5* sequence variations and compatible with drug screening approaches.

## RESULTS

### Generation and characterization of EBS hiPSC-derived KCs

EBS hiPSCs were generated from three patients carrying distinct sequence variations in *K5* gene (Supplementary Figure S1a and b). As a control, hiPSC lines were generated from two healthy nonaffected patients. In all cases, fibroblasts or blood cells were reprogrammed into hiPSCs, generating wild-type (WT) hiPSCs or *K5*-mutant hiPSCs (termed EBS hiPSCs 1, 2, 3) carrying the following single nucleotide variation: c.536T>C (Phe > Ser), c.1429G>A (Glu > Lys), and c.527A>G (Asn > Ser), respectively. All hiPSCs expressed >80% of the pluripotency markers TRA-1-81 and SSEA-3 (Supplementary Figure S2a). We next evaluated the potential of these EBS hiPSCs to give rise to homogeneous populations of KCs (Guenou et al., 2009; Itoh et al., 2011). Briefly, hiPSCs were seeded for approximately 20 days on a defined matrix in a medium for KCs proliferation supplemented with retinoic acid and BMP4 on days 1 and 3 of differentiation (Supplementary Figure S2b). As a pathological control, human primary healthy and human primary EBS KCs (K-EBS) have been derived from the foreskin of patients from whom WT and EBS hiPSCs (c.1429G>A) have been generated. After one passage, homogenous populations of KCs were obtained (K-EBS and WT KCs [K-WT]) and presented a morphology of packed cobblestone-shaped cells, as observed in human primary KCs (Figure 1a and Supplementary Figure S3a).

To characterize hiPSC-derived KCs, a transcriptomic analysis focused on the genes associated with differentiated or progenitor KCs was conducted. Hierarchical clustering analysis of K-EBS and K-WT expression profiles revealed no

clustering in the function of the genotype, indicating no major differences in terms of gene expression associated with KCs identity across all the cell lines (Supplementary Figure S4a and b). We also took advantage of a recent in-house quality-controlled curated gene expression database, namely SISTEMA (Jarrige et al., 2021), built on a catalog of hiPSC lines and their derivatives for which transcriptomic analyses have been generated using a single experimental pipeline. We therefore compared the expression profile of 10 genes associated with the Gene Ontology term KC differentiation that led to the distinction between hiPSC-derived KCs and other derivatives of hiPSC such as retinal epithelial cells, mesenchymal cells, myotubes, cortical neurons, and even melanocytes (Supplementary Figure S4c).

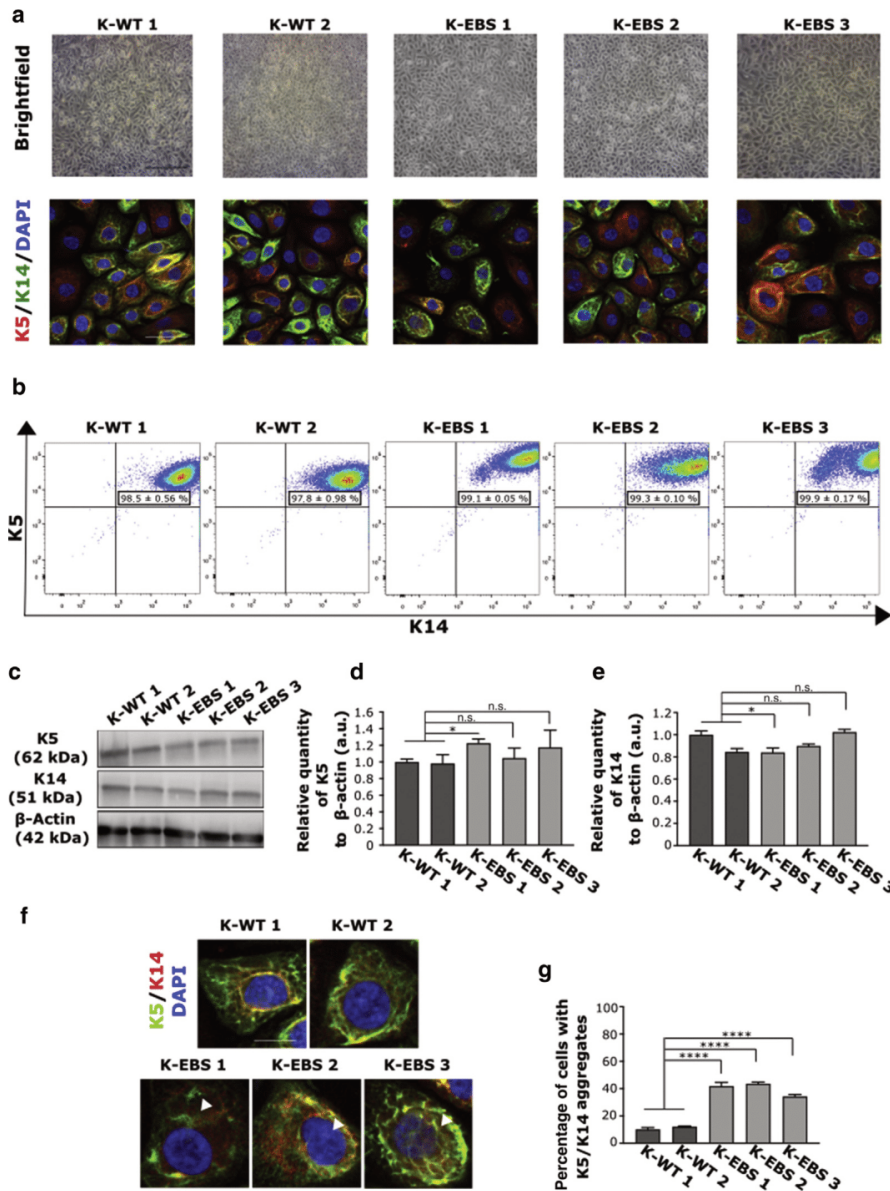
The functionality of WT and EBS hiPSC-derived KCs was confirmed by their capability to generate a pluristratified epidermis *in vitro*. Immunohistochemical analysis confirmed that basal and differentiation markers such as K5, K14, K10, and involucrin were expressed and located in the different layers of the epidermis (Supplementary Figure S5).

To determine whether *K5* sequence variations affected the expression of basal keratins, *K5* and *K14* protein expressions were analyzed in K-WT and K-EBS cells (Figure 1a). Flow cytometry analysis showed that >95% of the cells expressed both basal *K5* and *K14* in K-WT and K-EBS (Figure 1b), as observed in human primary K-WT and K-EBS (Supplementary Figure S3b). This result was also confirmed by western blot analysis (Figure 1c–e and Supplementary Figure S3c). Despite these similar levels of expression, an increased number of EBS hiPSC-derived KCs harboring keratin aggregates was observed in comparison with that in K-WT cells (K-EBS: 40.0 ± 4.7%; K-WT: 11.1 ± 1.5%) (Figure 1f and g). A similar observation was made in primary K-EBS when compared with WT primary KCs (Supplementary Figure S3d).

It was previously shown that immortalized KCs generated from EBS skin biopsies are highly sensitive to stress, such as heat shock or osmotic variation, leading to persistent cytoplasmic aggregation of keratins (Lloyd et al., 1995; Peters et al., 2001; Vassar et al., 1991). We thus sought to evaluate whether a similar phenotype could be observed in K-EBS. After urea-induced osmotic shock, both K-WT and K-EBS presented a similar percentage of cells positive for keratin aggregates (K-WT: 74 ± 12%; K-EBS: 83 ± 13%) (Figure 2a and b). However, after 4 hours of recovery under normal culture condition, an average of 83 ± 11% of K-EBS still presented keratin aggregates, compared with only 26 ± 8% for K-WT cells (Figure 2a–c), validating the increased sensitivity of K-EBS cells to osmotic stress.

### *K5* sequence variations lead to decreased expression of hemidesmosomal proteins

Because one of the functions of keratin intermediate filaments is to participate in KC adhesion to the extracellular matrix through hemidesmosome (Seltmann et al., 2015; Tsuruta et al., 2011), we next evaluated the consequences of keratin aggregations on these structures (Supplementary Figure S6a). Comparative immunofluorescence and western blot analyses were performed for plectin,  $\alpha 6$ -integrin, and  $\beta 4$ -integrin, revealing no significant difference in the percentage of KCs expressing plectin between K-EBS and K-WT



**Figure 1. K5 sequence variations have no impact on basal keratin expression but alter KIF organization.** (a) Representative phase-contrast (bar = 500 μm) and immunostaining images (bar = 50 μm) for K5 and K14 of K-WT and K-EBS. (b) Flow cytometry analysis of K5 and K14 expression in K-WT and K-EBS. (c) Western blot analysis of K5 and K14 protein expression (d, e) Quantification of (d) K5 or (e) K14 expression relative to β-actin expression. (f) Confocal analysis (bar = 20 μm) of K5 and K14 immunostaining. White arrows indicate keratins aggregates. (g) Percentage of keratinocytes presenting at least one KIF aggregate. n = 50 cells per condition. Results are expressed as mean ± SD (n = 3). Data were analyzed by Mann-Whitney nonparametric *t*-test for side-by-side comparison. \**P* < 0.05 and \*\*\*\**P* < 0.001. a.u., arbitrary unit; K, keratin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; KIF, keratin intermediate filament; n.s., nonsignificant.

(Figure 3a and b). However, a significant two-fold decrease in plectin expression was detected in K-EBS cells compared with that in K-WT cells (Figure 3c), a result not observed in the primary counterparts (Supplementary Figure S3e). A decreased percentage of α6-integrin-positive K-EBS (57 ± 10%) compared with that of K-WT (92 ± 5%) was detected (Figure 3d and e) and was confirmed by western blot quantification (K-EBS: 0.3 ± 0.09 arbitrary unit; K-WT: 1.0 ± 0.3 arbitrary unit) (Figure 3f). β4-Integrin expression displayed a pattern similar to that of α6-integrin expression (K-EBS: 53 ± 18%; K-WT: 93 ± 3%) (Figure 3g and h), also confirmed by western blot (Figure 3i). Integrin expression patterns were also observed in primary cells (Supplementary Figure S3e).

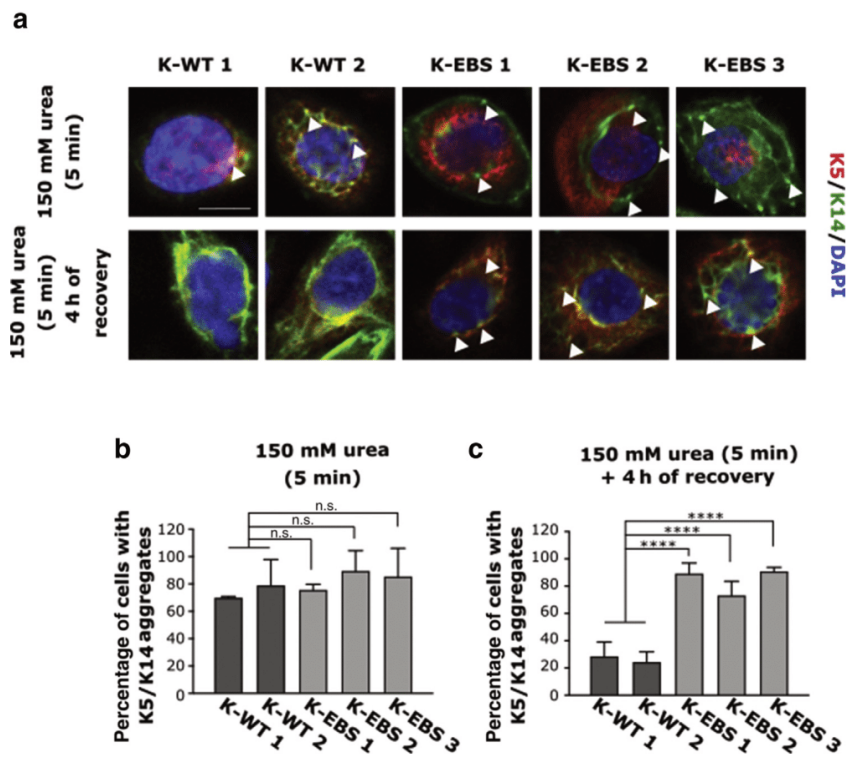
Strikingly, no significant difference in BP180 and BP230 protein expression between K-EBS and K-WT was observed (Supplementary Figure S6b). It is interesting to note that components of the basal lamina, β3- and γ2-laminin, are not modified either (Supplementary Figure S6c), suggesting that there is no change in the specific components involved in epidermal adhesion to basal lamina.

#### K5 sequence variations affect the migration and proliferation of K-EBS

Studies using human primary KCs reported an increased migration of K-EBS compared with that of the control

**Figure 2. K-EBS displayed persistent keratin aggregates after osmotic shock.**

(a) Representative confocal microscopy images (bar = 20 μm) of K5 and K14 immunostaining after 150 mM urea treatment. The top tips of white arrows indicate keratins aggregates. The upper panel shows the results after 5 min of 150 mM urea. The lower panel shows the results after 5 min of 150 mM urea followed by 4 h recovery. (b) Percentage of keratinocytes presenting KIF aggregates 5 min after osmotic shock. (c) Percentage of keratinocytes presenting KIF aggregates for 4 h of recovery after osmotic shock. Results are expressed as mean ± SD (n = 200 cells per condition). Statistical analyses were performed using Mann–Whitney nonparametric *t*-test for side-by-side comparison. \*\*\*\**P* < 0.001. h, hour; K, keratin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; KIF, keratin intermediate filament; min, minute; n.s., nonsignificant.



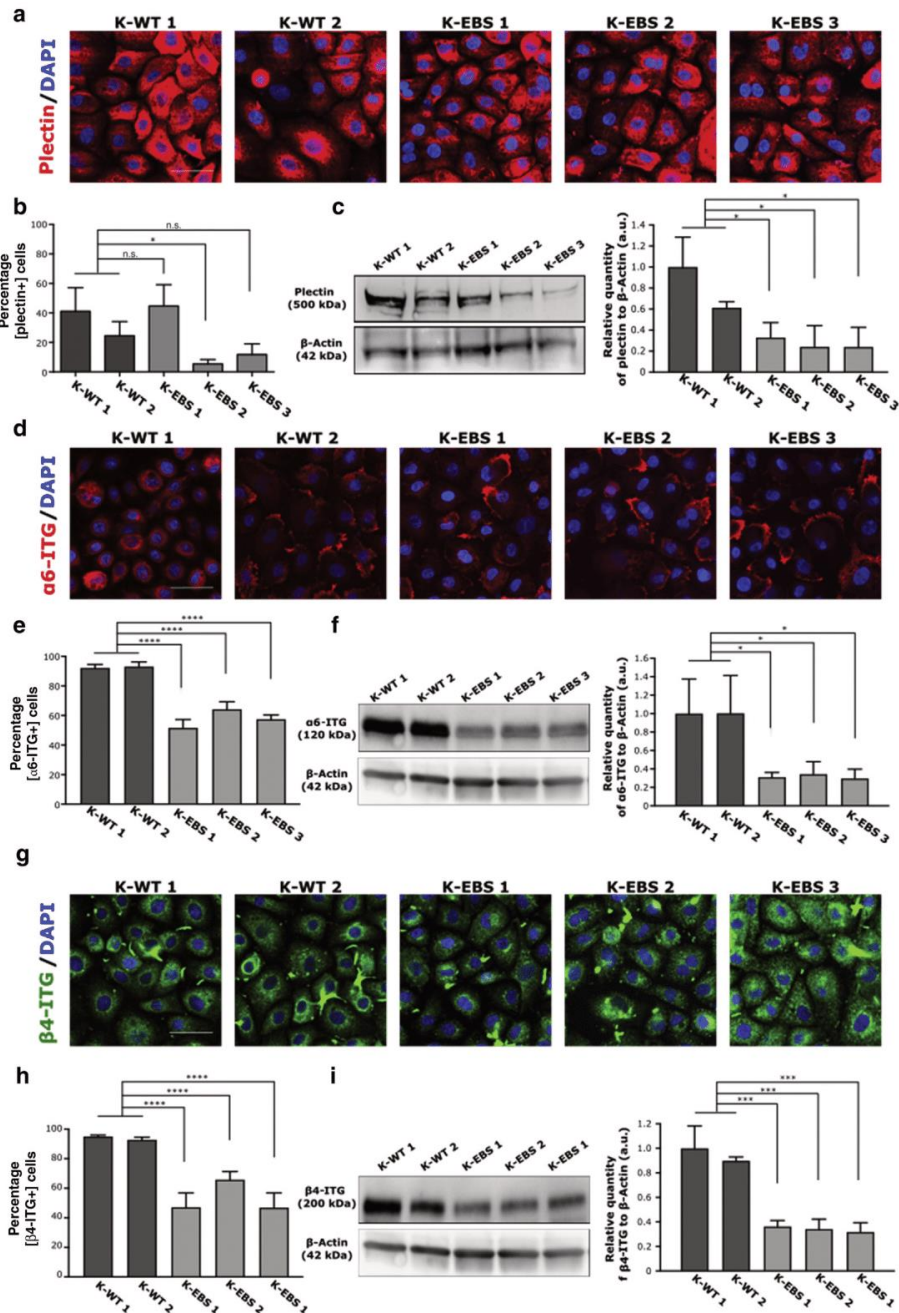
(Morley et al., 2003) as well as a decreased proliferation (Chamcheu et al., 2009).

To evaluate the functional impact of *K5* sequence variations on the migration, a scratch wound assay was performed when K-WT or K-EBS reached 100% confluence. The relative wound density was calculated for over 24 hours (Figure 4a and Supplementary Figure S3f). K-EBS cells recolonized the wound faster than K-WT cells (half wound closure time = 5 ± 1 hour for K-EBS and 8 ± 2 hours for K-WT) (Figure 4b and c). Similar results were obtained with primary K-EBS when compared with WT primary KCs (half wound closure time = 7.5 ± 1.0 hours for human primary K-EBS and 13.5 ± 3.0 hours for human primary healthy KCs) (Supplementary Figure S3f). To determine whether this increased migration was due to increased proliferation, we measured the proliferative capacity of KCs. Cell expansion ratio was calculated after 9 days, showing a decreased capacity of K-EBS to expand (Figure 4d). Accordingly, K-EBS showed a two-fold increased doubling time compared with K-WT (125.0 ± 57 and 64.0 ± 2.1 hours, respectively) (Figure 4e). Human primary K-EBS also showed an increased doubling time compared with human primary healthy KCs (74.6 ± 10.0 and 29.1 ± 2.2 hours, respectively) (Supplementary Figure S3g). Cell cycle analysis after 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation indicated that 15.7 ± 4.8% of K-EBS cells were in the S phase of the cell cycle, compared with 28.3 ± 4.8% of K-WT (Figure 4f), suggesting that the increased migratory capacity is not due to an increased proliferation rate but rather due to a difference in term of migratory properties.

**K5 sequence variations affect extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways**

To define the signaling pathways underlying these cellular phenotypes, we evaluated the activation of the most common signaling pathways protein kinase B, mTOR, p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK), and c-Jun N-terminal kinase by western blot. No significant difference in protein kinase B, mTOR, and p38 signaling pathways was observed between K-WT and K-EBS (Figure 5a–c). However, a decreased activation of ERK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways was observed in K-EBS compared with that in K-WT (Figure 5d and e), as observed in their primary counterparts (Supplementary Figure S3h).

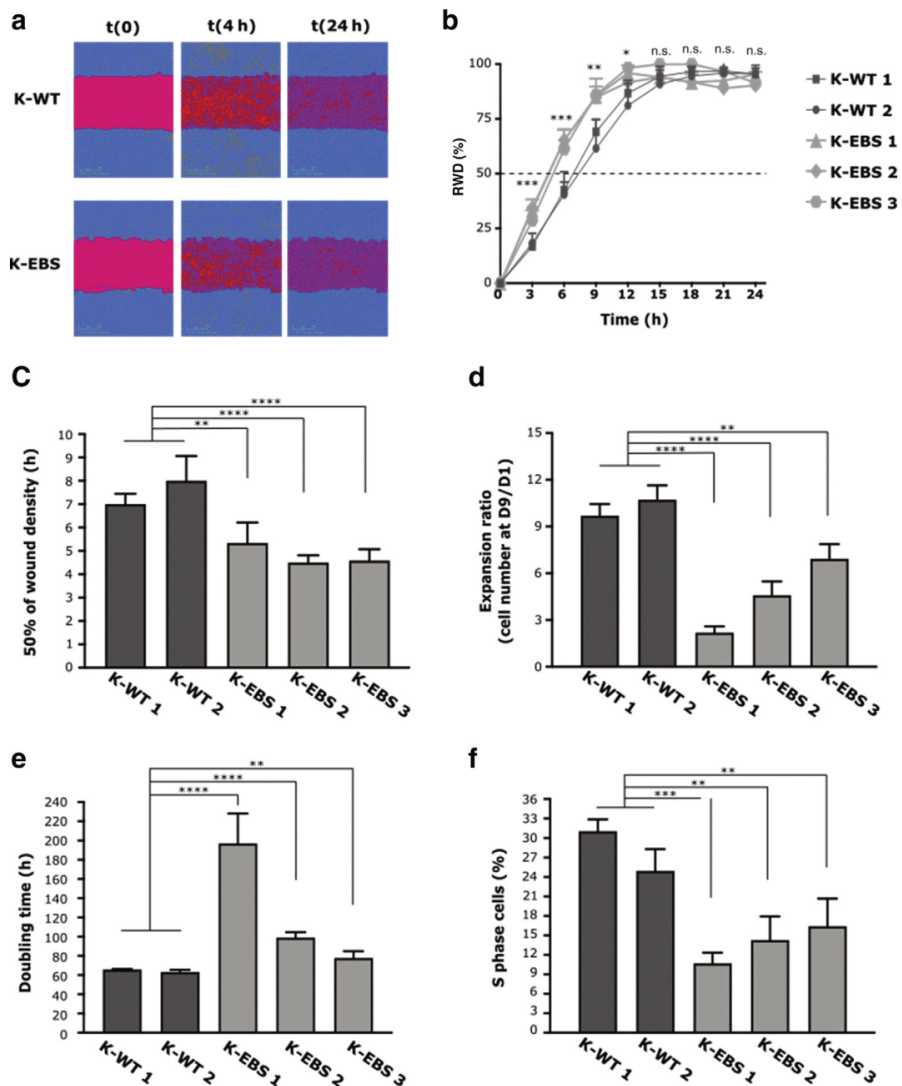
To go further in the characterization of the molecular mechanisms underlying *K5* sequence variations, a differential transcriptomic analysis comparing K-WT with K-EBS was performed. This analysis identified 138 differentially expressed genes, including 41 downregulated and 97 upregulated (Supplementary Table S1). The identified differentially expressed genes were subjected to Gene Ontology enrichment analysis (Ashburner et al., 2000; Gene Ontology Consortium, 2021; Mi et al., 2019) using the EnrichR webtool. This analysis showed enrichment for cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221) (adjusted *P* = 1.05E-04) or inflammatory response (GO:0006954) (adjusted *P* = 1.31E-04) (Supplementary Figure S7a). Functional annotation clustering using STRING webtool allowed us to reveal three highly related clusters (Supplementary Figure S7b). In addition to the already well-known cluster linked to cell



**Figure 3.** K5 sequence variations impact the expression of the hemidesmosomal proteins plectin and  $\alpha 6\beta 4$ -ITG. (a) Representative images (bar = 50  $\mu$ m) of plectin immunostaining and DAPI nuclear staining. (b) Quantification of plectin-positive keratinocytes. (c) Western blot analysis and quantification of plectin expression normalized to that of  $\beta$ -actin. (d) Representative images of  $\alpha 6$ -ITG immunostaining and DAPI staining. (e) Quantification of  $\alpha 6$ -ITG-positive keratinocytes. (f) Western blot analysis and quantification of  $\alpha 6$ -ITG expression normalized to  $\beta$ -actin. (g) Representative images of  $\beta 4$ -ITG immunostaining and DAPI staining. (h) Quantification of  $\beta 4$ -ITG-positive keratinocytes. (i) Western blot analysis and quantification of  $\beta 4$ -ITG expression normalized to that of  $\beta$ -actin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical analyses were performed using Mann-Whitney nonparametric *t*-test for side-by-side comparison. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.005, and \*\*\*\**P* < 0.001. a.u., arbitrary unit; ITG, integrin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; n.s., nonsignificant.

**Figure 4. K5 sequence variations impact the proliferation and migration properties of keratinocytes.**

(a) A 24-h scratch wound closure on K-WT and K-EBS. (b) RWD corresponding to the cell density in the wound over the cell density outside the wound was measured over time. (c) Histograms showing the time needed to reach 50% of RWD. (d) Expansion ratio (number of cells at D9/number of cells at D1) after 9 days of culture. (e) Doubling time of K-WT and K-EBS. (f) K-WT and K-EBS cell cycle analysis by EdU incorporation. Results correspond to cell percentage in the S phase of the cell cycle. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical analyses were performed using Mann-Whitney nonparametric t-test for side-by-side comparison. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , and \*\*\*\* $P < 0.001$ . D1, day 1; D9, day 9; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; h, hour; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; n.s., nonsignificant; RWD, relative wound density; t, time.

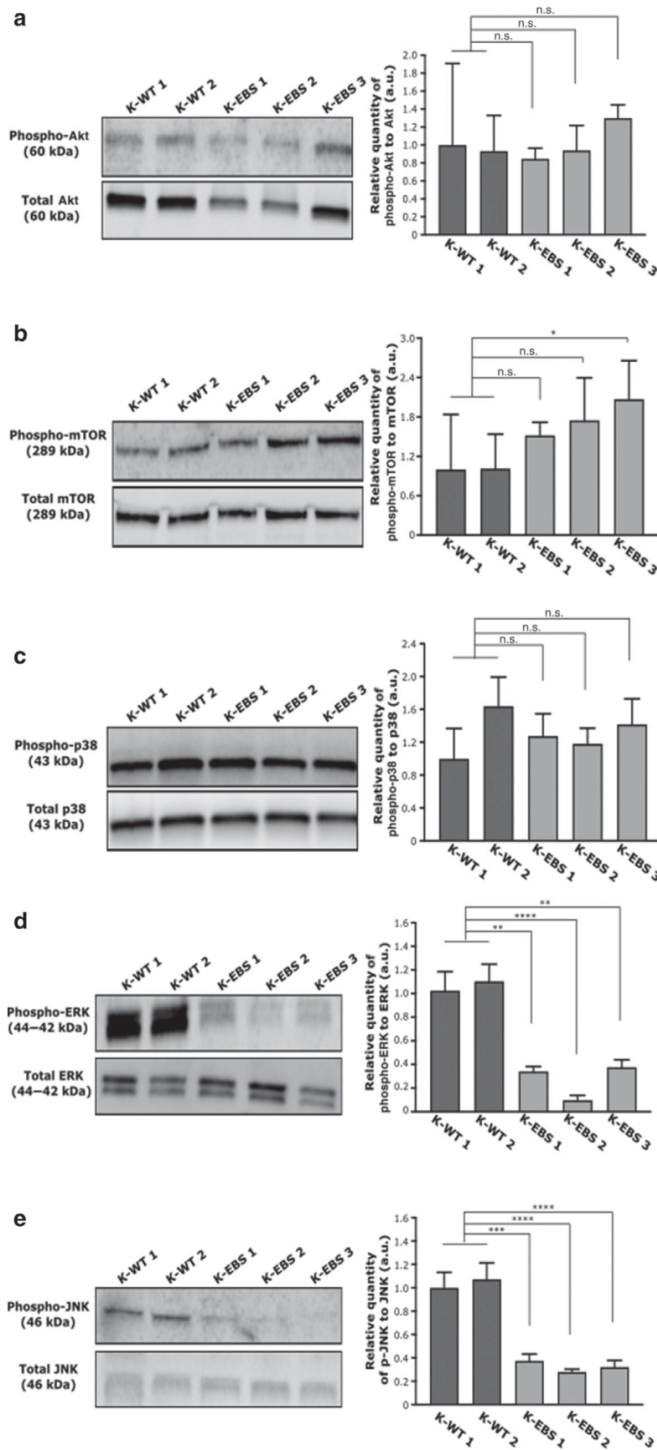


chemotaxis and inflammatory response (Supplementary Figure S7c) with genes such as *IL1A*, *IL1B*, or *CCL20*, our analysis also revealed the functional clusters potentially implicated in EBS. These latter include genes involved in extracellular matrix organization, with genes such as *ELN*, *SMOC1*, or *SMOC2* (Supplementary Figure S7d) and genes implicated in chromosome organization and DNA packaging (Supplementary Figure S7e).

**The 4-phenyl butyric acid treatment rescued some EBS-associated pathological phenotypes**

To evaluate whether our model is compatible with drug screening applications, K-EBS were cultured in a 96-well plate, and the effect of 4-phenyl butyric acid (4-PBA) on K-EBS was analyzed on keratin aggregation, proliferation, migration, and ERK signaling. The 4-PBA is a chemical chaperone described to facilitate protein folding that has

been recently shown to reduce keratin aggregation in immortalized EBS primary KCs after heat shock (Chamcheu et al., 2011a). As expected, 4-PBA treatment led to a reduction of around 40% of the number of K-EBS containing cytoplasmic keratin aggregates (untreated:  $53.3 \pm 12.2\%$ ; 4-PBA:  $35.8 \pm 7.6\%$ ) (Figure 6a and b). When K-EBS were treated with 4-PBA, the average expansion ratio (day 9/day 1) increased from  $2.77 \pm 0.17$  to  $3.6 \pm 0.31$  (Figure 6c). Concordant with these results, the doubling time was decreased in 4-PBA-treated K-EBS ( $115.4 \pm 10.6$  hours) compared with that in the untreated cells ( $163.9 \pm 7.15$  hours) (Figure 6d). When migration property was assessed by scratch wound assay, 4-PBA-treated K-EBS recolonized the wound at a slower rate than the untreated cells (Figure 6e and f). Finally, monitoring of ERK activation by western blot analysis indicated that 4-PBA has a positive effect on ERK activation (Figure 6g). However, the 4-PBA treatment showed



**Figure 5. K-EBS presents a decreased activation of ERK and JNK signaling pathways but not of Akt, mTOR, or p38 signaling pathways.** Western blot analysis of (a) phospho-Akt and total Akt, (b) phospho-mTOR and total mTOR, (c) phospho-p38 and total p38, (d) phospho-ERK1/2 and total ERK 1/2, (e) phospho-JNK and total JNK. The left panel shows the representative photography. The right panels show the relative quantification of the protein expressions. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical analyses were performed using Mann–Whitney nonparametric *t*-test for side-by-side comparison. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.005, and \*\*\*\**P* < 0.001. Akt, protein kinase B; a.u., arbitrary unit; ERK, extracellular signal–regulated kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; n.s., nonsignificant; phospho-Akt, phosphorylated protein kinase B; phospho-ERK, phosphorylated extracellular signal–regulated kinase; phospho-JNK, phosphorylated c-Jun N-terminal kinase; phospho-mTOR, phosphorylated mTOR; phospho-p38, phosphorylated p38.

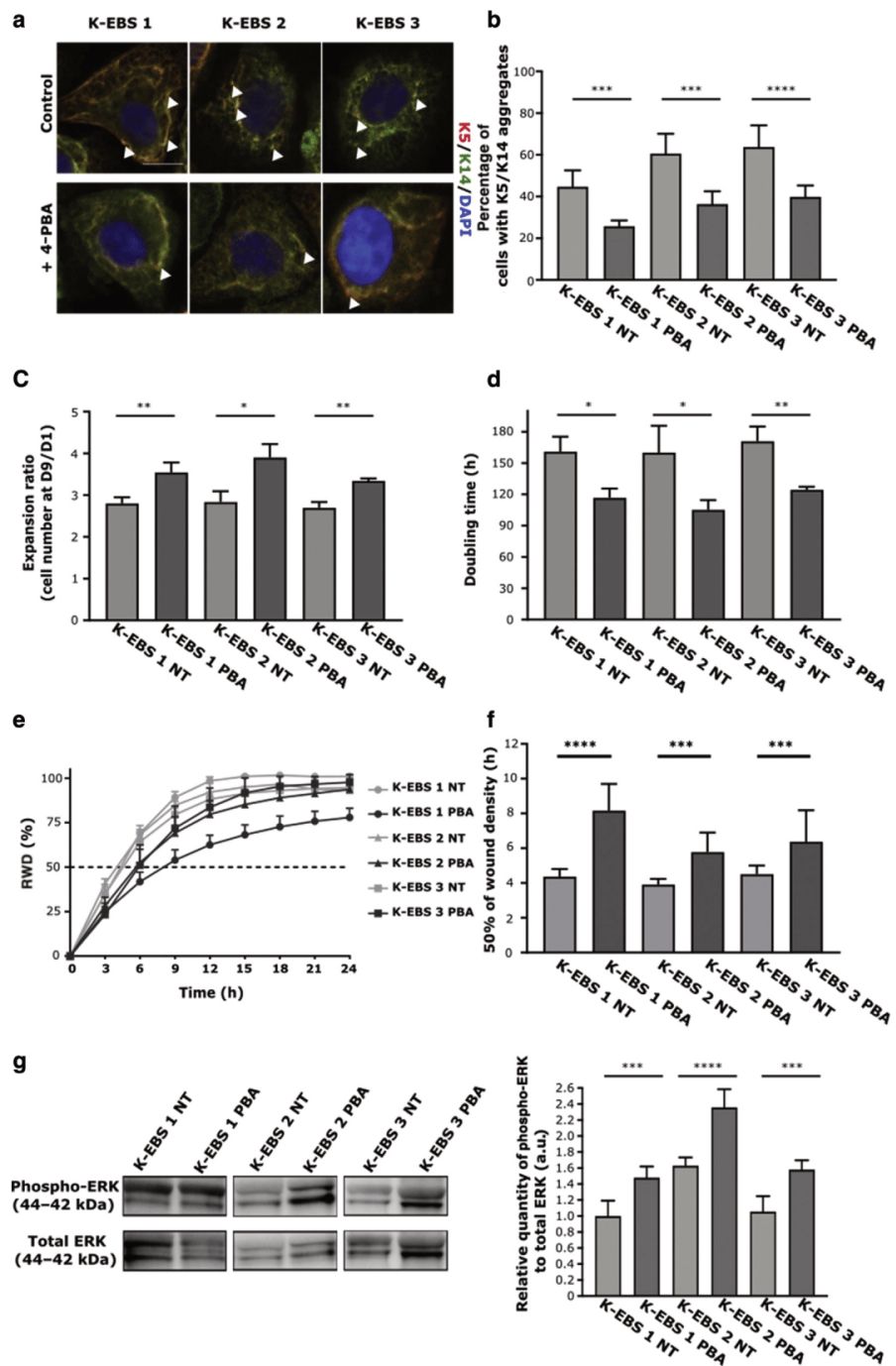
no effect on  $\alpha 6\beta 4$ -integrins expression (Supplementary Figure S8a and b) and HSP70/90 either (Supplementary Figure S8c and d).

**DISCUSSION**

Development of relevant and robust cellular models for EBS in which the sequence variation is expressed within its

**Figure 6. A 4-PBA treatment rescues major EBS pathological phenotypes.**

(a) Representative images (bar = 20  $\mu$ m) of K5 and K14 immunostaining without (NT) or with 4-PBA treatment. White arrows indicate keratin aggregates. (b) Percentage of keratinocytes presenting at least one KIF aggregate without/with 4-PBA. (c) Expansion ratio (cell number at D9/cell number at D1) after 9 days of culture. (d) The doubling time of K-EBS treated or not with 4-PBA. (e) RWD related to the time of closure. (f) Histograms showing the time needed for each cell line to reach 50% of RWD. (g) Western blot and quantification of phosphorylated and total ERK1/2 proteins. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical analyses were performed using Mann-Whitney nonparametric t-test for side-by-side comparison. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , and \*\*\*\* $P < 0.001$ . 4-PBA, 4-phenyl butyric acid; a.u., arbitrary unit; D1, day 1; D9, day 9; EBS, epidermolysis bullosa simplex; ERK, extracellular signal-regulated kinase; h, hour; K, keratin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; KIF, keratin intermediate filament; NT, not treated; phospho-ERK, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase; RWD, relative wound density.



natural context is essential to understanding the disease process at the subcellular level and to assay new therapeutic strategies for this inherited incurable genodermatosis. In this study, we described the possibility of using hiPSC-derived KCs as a reliable and relevant model for EBS modeling and for the identification of new therapeutic strategies.

Currently, different cellular and animal models have been developed. These include knockout or conditional mouse models for which clinical presentation is generally more severe than that observed in patients, with the death of affected mice soon after birth (Lloyd et al., 1995; Peters et al., 2001; Vassar et al., 1991). In addition, the fundamental differences



in wound healing mechanisms and skin architecture observed between mouse and human hampered their pathological relevance (Vijayaraj et al., 2007; Zomer and Trentin, 2018). To date, most of the published human cellular models rely on either human primary KCs or immortalized KCs. However, the short lifespan of primary KCs has been a daunting barrier to their use. On the other hand, immortalized KC cell lines turn out to have several undesirable genetic abnormalities and are trapped in cell cycle, which could mask other functional defects such as decreased proliferation or changes in related signaling pathways (Chamcheu et al., 2010, 2009; D'Alessandro et al., 2002). Moreover, only a few immortalized K-EBS lines have been generated so far, and most of the studies used the KEB7 (K14:R125P) versus NEB1 (control) cell line (Herzog et al., 2015; Lettner et al., 2013; Morley et al., 2003; Wagner et al., 2013). In this context, an alternate approach to circumventing the drawback of limited cell samples is by generating hiPSCs. Thanks to their capacity to propagate indefinitely, combined with their potential to be differentiated into KCs, hiPSCs would enable the undertaking of mechanistic studies as well as large screening approaches to identify new therapeutic solutions. Although two recent studies have shown the generation of EBS hiPSCs derived from skin biopsies of patients carrying either *K5* or *K14* sequence variations (Bchetnia et al., 2020; Kolundzic et al., 2019), these studies were limited to undifferentiated hiPSCs and the pathological relevance of EBS hiPSC-derived KCs had not yet been reported.

In this study, we described the generation of a pathomimetic model based on hiPSC-derived KCs from patients with EBS carrying *K5*-dominant sequence variations that recapitulate the main pathological stigmates associated with EBS: decreased proliferation (Chamcheu et al., 2009), increased migration (Morley et al., 2003), presence of cytoplasmic keratin aggregates and increased sensitivity to osmotic or heat shock (Chamcheu et al., 2011a), and dominance of an inflammatory signature (Alexeev et al., 2017; Spörrer et al., 2019). In our study, EBS hiPSC-derived KCs displayed a decreased proliferation, which can be related to defective ERK signaling pathways. This result illustrated the pathological relevance of our model because this defective phosphorylation of ERK was not consistently observed in immortalized EBS KCs (Chamcheu et al., 2011a; Spörrer et al., 2019).

hiPSCs have ushered in an exciting era for disease modeling and drug discovery. Nonetheless, the main conditions for these applications rely on the holy grail to differentiate hiPSCs efficiently and accurately into cell types of interest. The differentiation protocol used in this study allowed us to have access to homogenous populations of EBS hiPSC-derived KCs in which >98% of cells coexpress the two main KC markers *K5* and *K14*. Thanks to the comparative transcriptomic analysis between WT and EBS hiPSC-derived KCs, our results identified 138 misregulated genes specifically in EBS cells. Enrichment analysis applied in our study first confirmed the misregulation of genes associated with inflammatory cytokines or chemokines. We compared our transcriptomic results with two previously published datasets (Figure S7f): a microarray profiling of EBS-immortalized KC cell line KEB7 compared with the WT control, NEB1 KC cell

line (207 differentially expressed genes) (Herzog et al., 2015) and differential transcriptomic analysis comparing blistered and nonblistered epidermis from 11 patients (116 differentially expressed genes) (Lee et al., 2022). Only four genes were found in common between these datasets, among which are three genes coding for IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , monocyte-chemoattractant-protein-1 (Alexeev et al., 2017; Lee et al., 2022; Spörrer et al., 2019). Our results also revealed the misregulation of several genes associated with the extracellular matrix, including genes coding for elastin (*ELN*) and for SMOC2 (*SMOC-1/2*). Strikingly, previous studies have shown that KC migration could be stimulated in vitro by elastin (Kajiya et al., 1997) and SMOC-1/2 (Maier et al., 2008). In further studies, analyzing the functional consequences of these genes on the biology of K-EBS may offer new opportunities to deepen the pathophysiology associated with EBS.

Currently, hiPSCs are predominantly investigated for therapeutic purposes in dystrophic epidermolysis bullosa, including ex vivo correction of the disease-associated sequence variations by gene-editing tools and the generation of autologous skin sheets for transplantation back onto the patient (Matsumura et al., 2018; Sebastiano et al., 2014). However, hiPSC-derived KCs would enable the undertaking of large screening approaches to identify new drugs for epidermolysis bullosa. In this context, we investigated whether EBS hiPSC-derived KCs carrying *K5*-dominant sequence variations could be used to identify potential therapeutic compounds. For this purpose, we first showed the possibility to miniaturize the culture of EBS hiPSC KCs to a format compatible with drug screenings. Using 4-PBA, previously shown to reverse different phenotypes observed in immortalized EBS KCs (Spörrer et al., 2019), our results validated the potential offered by hiPSC-derived KCs to identify compounds capable to reverse defective proliferation and/or the keratin aggregates that should consequently be a way of reducing the tissue fragility phenotypes of EBS.

## MATERIALS AND METHODS

Supplementary methods can be found in [Supplementary Materials and Methods](#).

### Cell culture

Patient-derived fibroblasts carrying *K5* sequence variations (Supplementary Figure S1) were purchased from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ) and EBS PBMCs and skin biopsies (patient 2 only) were obtained from the Reference center for rare diseases of the skin and mucous membranes of genetic origin (Necker Hospital, Paris, France) after approval of the local ethical committee of Ile de France (institutional review board 00001072) (CPP2015-03-03/DC2014-2272). Written informed consent was received from patients (Declaration AC-2013-1973).

Cell lines were reprogrammed into hiPSCs by Phenocell (Grasse, France) and maintained and amplified as previously described (Ben M'Barek et al., 2020). KC differentiation was performed as previously described (Itoh et al., 2011). KCs (hiPSC derived or primary) were passaged by trypsinization and amplified in CnT07-medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland) on collagen type I. For drug screening-compatible approaches, KCs were cultured in parallel microcultures in 96-well plates.

### Western blot analysis

Total proteins were extracted in radioimmunoprecipitation assay buffer containing antiproteases/antiphosphatases, sonicated, and quantified using the Bradford method. SDS-PAGE was performed using NuPAGE Novex 4–12% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Primary antibodies (Supplementary Table S2) incubation was followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL revelation on Image-Quant™-LAS-4000-mini (GE Healthcare, Chicago, IL).

### Immunofluorescence

KCs were fixed, permeabilized, and incubated with primary antibodies followed by species-specific fluorophore-conjugated secondary antibodies and DAPI counterstaining. Images were acquired with a confocal microscope (LSM880-Airyscan, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) or CellInsight CX7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

### Flow cytometry analysis

A total of 15,000 cells were analyzed per sample with MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and Flowjo software. Acquisition parameters were set up on a control cell line and kept thereafter. KCs were trypsinized, fixed, and permeabilized (BD Cytotfix). hiPSCs were harvested using accutase, labeled, and directly analyzed.

### Cell-cycle analysis

KCs were treated using Click-iTEdu Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kits (Invitrogen, Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions.

### Scratch wound assay

KCs were seeded at 75,000 cells/well in an ImageLock™ 96-well plate. After 24 hours, scratches were made using WoundMaker. Pictures of entire wells were taken every 30 minutes for 24 hours using IncuCyte ZOOM live-cell imaging system. Relative wound density was calculated as below: percentage relative wound density ( $t$ ) =  $100 \times (w[t] - w[0]) / (c[t] - w[0])$ , with  $w(t)$  being the density of wound region at time ( $t$ ) and  $c(t)$  being the density of cell region at time ( $t$ ).

### Osmotic shock

KCs were seeded at 15,000 cells/cm<sup>2</sup> in 96-well plates. At 80% confluency, cells were treated with 150 mM urea for 5 minutes at 37 °C. After medium change and 4-hour recovery (or not), cells were fixed, permeabilized, and processed for immunostaining.

### 4-PBA treatment

Ten days after KC differentiation induction, cell cultures were treated with 4-PBA (1 μM) every 2 days. During KC amplification, 1 μM of 4-PBA was added to medium change every 2 days until KCs were harvested for analysis.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Mann–Whitney nonparametric *t*-test for side-by-side comparison (GraphPad Prism 8.2.1, San Diego, CA). Results are expressed as mean ± SD. *P*-values < 0.05 were considered significant. For statistical significance, n.s. denotes nonsignificant, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.005, and \*\*\*\**P* < 0.001.

### Data availability statement

The main data supporting the results of this study are available within the paper and its Supplementary Materials. The raw and analyzed

datasets generated during the study are available for research purposes from the corresponding authors. Transcriptomic datasets related to this article can be found at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE196116> hosted by the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE196116).

### ORCID

Julien Coutier: <http://orcid.org/0000-0002-2407-5387>  
Manon Bonnet: <http://orcid.org/0000-0003-0049-2781>  
Sabrina Martineau: <http://orcid.org/0000-0002-0780-8454>  
Aurélien Mercadier: <http://orcid.org/0000-0003-3163-333X>  
Sophie Domingues: <http://orcid.org/0000-0002-7968-3304>  
Manoubia Saidani: <http://orcid.org/0000-0002-2805-4639>  
Margot Jarrige: <http://orcid.org/0000-0002-5877-2615>  
Hélène Polvéche: <http://orcid.org/0000-0002-5601-3498>  
Annabelle Darle: <http://orcid.org/0000-0002-9350-654X>  
Nathalie Holic: <http://orcid.org/0000-0001-9869-1388>  
Smail Hadj-Rabia: <http://orcid.org/0000-0001-6801-7106>  
Christine Bodemer: <http://orcid.org/0000-0001-8772-0905>  
Gilles Lemaitre: <http://orcid.org/0000-0002-0898-1582>  
Cécile Martinat: <http://orcid.org/0000-0002-5234-1064>  
Christine Baldeschi: <http://orcid.org/0000-0001-6624-0507>

### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Jessica Feteira and Carol Trzaska for their scientific contribution, Sophie Clement for helpful critical reviews of the manuscript, I-Stem core facilities for their support, and support from the PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique) of the Ecole Normale Supérieure de Lyon for computing resources. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies-Téléthon, INSERM and Université d'Evry Val d'Essonne/Paris Saclay. This work was supported by grants from URGO-Research Innovation and Development, Laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), and the program "investissement d'avenir" INGESTEM.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: JC, MB, CBA; Formal Analysis: JC, MB, SM, AM, SD, MS, MJ, HP, AD; Funding Acquisition: CBA; Investigation: JC, MB, AM; Methodology: JC, MB, AM, SD, MS, MJ, HP, AD; Resources: SHR, CBo; Writing - Original Draft Preparation: JC, MB, AM, NH, GL, CM, CBA; Writing - Review and Editing: JC, CM, CBA.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at [www.jidonline.org](http://www.jidonline.org), and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.04.009>.

### REFERENCES

- Alexeev V, Salas-Alanis JC, Palisson F, Mukhtarzada L, Fortuna G, Uitto J, et al. Pro-inflammatory chemokines and cytokines dominate the blister fluid molecular signature in patients with epidermolysis bullosa and affect leukocyte and stem cell migration. *J Invest Dermatol* 2017;137:2298–308.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 2000;25:25–9.
- Bchetnia M, Martineau L, Racine V, Powell J, McCuaig C, Puymirat J, et al. Generation of a human induced pluripotent stem cell line (UQACi001-A) from a severe epidermolysis bullosa simplex patient with the heterozygous mutation p.R125S in the KRT14 gene. *Stem Cell Res* 2020;44:101748.
- Ben M'Barek K, Bertin S, Brazhnikova E, Jaillard C, Habeler W, Plancheron A, et al. Clinical-grade production and safe delivery of human ESC derived RPE sheets in primates and rodents. *Biomaterials* 2020;230:119603.
- Bolling MC, Lemmink HH, Jansen GH, Jonkman ME. Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *Br J Dermatol* 2011;164:637–44.
- Bouameur JE, Favre B, Fontao L, Lingasamy P, Bègré N, Borradori L. Interaction of plectin with keratins 5 and 14: dependence on several plectin domains and keratin quaternary structure. *J Invest Dermatol* 2014;134:2776–83.
- Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Robinson EC, Uitto J. Animal models of epidermolysis bullosa: update 2010. *J Invest Dermatol* 2010;130:1485–8.

- Cao T, Longley MA, Wang XJ, Roop DR. An inducible mouse model for epidermolysis bullosa simplex: implications for gene therapy. *J Cell Biol* 2001;152:651–6.
- Chamcheu JC, Loric EP, Akgul B, Bannbers E, Virtanen M, Gammon L, et al. Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition. *J Dermatol Sci* 2009;53:198–206.
- Chamcheu JC, Navsaria H, Pihl-Lundin I, Liovic M, Vahlquist A, Törmä H. Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation: involvement of heat shock proteins and MAP kinases. *J Invest Dermatol* 2011a;131:1684–91.
- Chamcheu JC, Pihl-Lundin I, Mouyobo CE, Gester T, Virtanen M, Moustakas A, et al. Immortalized keratinocytes derived from patients with epidermolysis bullosa reproduce the disease phenotype: a useful in vitro model for testing new treatments. *Br J Dermatol* 2011b;164:263–72.
- Chamcheu JC, Virtanen M, Navsaria H, Bowden PE, Vahlquist A, Törmä H. Epidermolysis bullosa simplex due to KRT5 mutations: mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide in cultured primary keratinocytes. *Br J Dermatol* 2010;162:980–9.
- D'Alessandro M, Russell D, Morley SM, Davies AM, Lane EB. Keratin mutations of epidermolysis bullosa simplex alter the kinetics of stress response to osmotic shock. *J Cell Sci* 2002;115:4341–51.
- Fuchs E. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu Rev Genet* 1996;30:197–231.
- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D325–34.
- Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaître G, Saidani M, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 2009;374:1745–53.
- Herzog J, Rid R, Wagner M, Hundsberger H, Eger A, Bauer J, et al. Whole-transcriptome gene expression profiling in an epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara model keratinocyte cell line uncovered novel, potential therapeutic targets and affected pathways. *BMC Res Notes* 2015;8:785.
- Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:8797–802.
- Jarrige M, Polvèche H, Carteron A, Janczarski S, Peschanski M, Auboeuf D, et al. SISTEMA: a large and standardized collection of transcriptome data sets for human pluripotent stem cell research. *iScience* 2021;24:102767.
- Kajiya H, Tanaka N, Inazumi T, Seyama Y, Tajima S, Ishibashi A. Cultured human keratinocytes express tropoelastin. *J Invest Dermatol* 1997;109:641–4.
- Kolundzic N, Khurana P, Hobbs C, Rogar M, Ropret S, Törmä H, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC) line from an epidermolysis bullosa simplex patient heterozygous for keratin 5 E475G mutation and with the Dowling Meara phenotype. *Stem Cell Res* 2019;37:101424.
- Lee CH, Kim MS, Chung BM, Leahy DJ, Coulombe PA. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:707–15.
- Lee GH, Lekwuttikarn R, Tafoya E, Martin M, Sarin KY, Teng JM. Transcriptomic repositioning analysis identifies mTOR inhibitor as potential therapy for epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol* 2022;142:382–9.
- Lettnner T, Lang R, Klaussegger A, Hainzl S, Bauer JW, Wally V. MMP-9 and CXCL8/IL-8 are potential therapeutic targets in epidermolysis bullosa simplex. *PLoS One* 2013;8:e70123.
- Lloyd C, Yu QC, Cheng J, Turksen K, Degenstein L, Hutton E, et al. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. *J Cell Biol* 1995;129:1329–44.
- Lu H, Chen J, Planko L, Zigrino P, Klein-Hitpass L, Magin TM. Induction of inflammatory cytokines by a keratin mutation and their repression by a small molecule in a mouse model for EBS. *J Invest Dermatol* 2007;127:2781–9.
- Maier S, Paulsson M, Hartmann U. The widely expressed extracellular matrix protein SMOC-2 promotes keratinocyte attachment and migration. *Exp Cell Res* 2008;314:2477–87.
- Matsumura W, Fujita Y, Nakayama C, Shinkuma S, Suzuki S, Nomura T, et al. Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2018;89:263–71.
- Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D419–26.
- Morley SM, D'Alessandro M, Sexton C, Rugg EL, Navsaria H, Shemanko CS, et al. Generation and characterization of epidermolysis bullosa simplex cell lines: scratch assays show faster migration with disruptive keratin mutations. *Br J Dermatol* 2003;149:46–58.
- Peters B, Kirfel J, Büssov H, Vidal M, Magin TM. Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex. *Mol Biol Cell* 2001;12:1775–89.
- Sebastiano V, Zhen HH, Haddad B, Bashkirova E, Melo SP, Wang P, et al. Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa [published correction appears in *Sci Transl Med* 2014;6:267er8]. *Sci Transl Med* 2014;6:264ra163.
- Seltmann K, Cheng F, Wiche G, Eriksson JE, Magin TM. Keratins stabilize hemidesmosomes through regulation of  $\beta$ 4-Integrin turnover. *J Invest Dermatol* 2015;135:1609–20.
- Seltmann K, Roth W, Kröger C, Loschke F, Lederer M, Hüttelmaier S, et al. Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *J Invest Dermatol* 2013;133:181–90.
- Spörrer M, Prochnicki A, Tölle RC, Nyström A, Esser PR, Homberg M, et al. Treatment of keratinocytes with 4-phenylbutyrate in epidermolysis bullosa: lessons for therapies in keratin disorders. *Ebiomedicine* 2019;44:502–15.
- Steinert PM. The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer. *J Biol Chem* 1990;265:8766–74.
- Tsuruta D, Hashimoto T, Hamill KJ, Jones JC. Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J Dermatol Sci* 2011;62:1–7.
- Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 1991;64:365–80.
- Vijayaraj P, Söhl G, Magin TM. Keratin transgenic and knockout mice: functional analysis and validation of disease-causing mutations. *Methods Mol Biol* 2007;360:203–51.
- Wagner M, Trost A, Hintner H, Bauer JW, Onder K. Imbalance of intermediate filament component keratin 14 contributes to increased stress signalling in epidermolysis bullosa simplex. *Exp Dermatol* 2013;22:292–4.
- Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research. *J Dermatol Sci* 2018;90:3–12.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

### RNA extraction

Total RNA was extracted using the Qiacube instrument and the RNeasy micro or mini kit depending on the quantity of cells. The quality of the RNA was evaluated using the Bio-analyseur 2100 Agilent following the instructions of the manufacturer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Only samples with an RNA integrity number >7 were proceeded for sequencing.

### Ion ampliseq transcriptome human gene expression

Total RNA was extracted using the Qiacube instrument and the RNeasy micro or mini kit depending on the quantity of cells. The quality of the RNA was evaluated using the Bio-analyseur 2100 Agilent following the instructions of the manufacturer (Agilent Technologies). Only samples with an RNA integrity number >7 were proceeded for sequencing.

For each of the samples (three wild-type keratinocytes and three epidermolysis bullosa simplex keratinocytes), 50 ng of total RNA was reverse transcribed using the Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression kit, following the instructions of the manufacturer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The cDNA libraries were amplified and bar-coded using Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression core panel and Ion Xpress Barcode Adapter (Thermo Fisher Scientific). The amplicons were quantified using Agilent High Sensitivity DNA kit. Emulsion PCR and enrichment were performed on the Ion OT2 system Instrument using the Ion PI Hi-Q OT2 200 kit (Thermo Fisher Scientific). Samples were loaded on an Ion PI v3 Chip and sequenced on the Ion Proton System using Ion PI Hi-Q sequencing 200 kit chemistry (200 base pairs read length, Thermo Fisher Scientific). The fastQ file was generated on the Ion Torrent server and transferred to the Pôle Scientifique de Modélisation Numérique (for a scientific pole for numerical modeling at ENS Lyon; [www.ens-lyon.fr/PSMN](http://www.ens-lyon.fr/PSMN))

The quality control of the sequencing data was evaluated using FastQC (version 0.11.2). The reads were trimmed using Prinseq (version 0.20.4) (-trim-right 20) and filtered by average quality score (-trim-qual 20). Reads were mapped to the amplicons sequence reference using bowtie2 local (version 2.3.4.1) (Langmead and Salzberg, 2012). Reads below a mapping score of 10 or multimapped were filtered using samtools (version 0.1.19) (Li et al., 2009). The gene expression level in each sample was quantified with the specific GRCh38.92 annotation. The differential gene expression between the conditions was calculated with DESeq2 (Love et al., 2014) (version 1.18.1 using R, version 3.4.1). The following cut off was applied for considering differentially expressed genes:  $P < 0.01$  and  $\log_2$  fold change > 0.4 (options: lfcThreshold = 0.4, altHypothesis = greaterAbs).

Biological interpretations of the list of differentially expressed genes were performed using EnrichR software (Chen et al., 2013; Kuleshov et al., 2016) and the STRING network tool (Szklarczyk et al., 2019).

### Generation of pluristratified epidermis in vitro

For dermo-epidermal substitute production, a mixture of human plasma (a gift from J.-J. Lataillade at the Biomedical Research Institute of French Armies, INSERM U1197, Clamart, France); primary fibroblasts (HDFN, PromoCell, Heidelberg, Germany) (10,000 cells per  $\text{cm}^2$ ); and saline solution composed of sodium chloride, calcium chloride, and Exacyl (Sanofi, Paris, France) was prepared. The mixture was spread in a culture insert, and plasma fibrin was allowed to polymerize for 1 hour at 37 °C. The dermal equivalents were cultured for 6 days with ECM medium (CnT-PR-ECM, CELLnTEC, Bern, Switzerland) in immersion phase. Wild-type keratinocytes and epidermolysis bullosa simplex keratinocytes were seeded on the dermal equivalent at 100,000 cells per  $\text{cm}^2$  and cultured for 48 days in CnT-07.HC medium supplemented with 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Exacyl (Sanofi). For the dermo-epidermal reconstruction, the medium was switched to a reconstruction medium (CnT-PR-FTAL5, CELLnTEC) for 24 hours. Finally, tissues were placed at the air-liquid interface in the same medium for 21 days to allow stratification. Media were renewed every 2 days.

### Immunohistochemistry

For immunohistochemistry and H&E staining, tissues were fixed in 10% formalin (VWR International, Radnor, PA) before paraffin embedding. All immunohistochemistry stainings were made on paraffin sections of 4- $\mu\text{m}$  thickness using Ventana Discovery XT IHC module according to the manufacturer's instructions. The nuclei were counterstained using DAPI (MilliporeSigma, Burlington, MA). H&E images acquisition was performed with EVOS XL Core Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Immunohistochemistry image acquisition was performed with an inverted microscope (Axio Imager, Zeiss, Jena, Germany).

## SUPPLEMENTARY REFERENCES

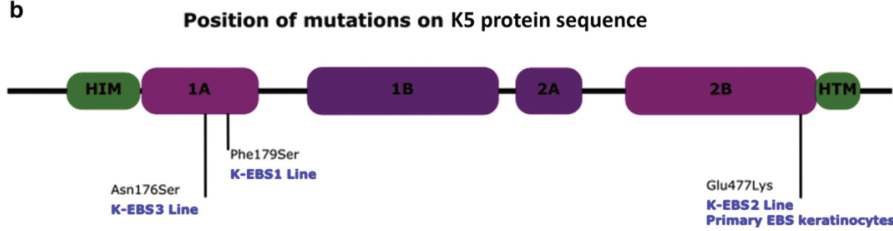
- Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinform* 2013;14:128.
- Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W90-7.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9:357-9.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078-9.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D607-13.

a

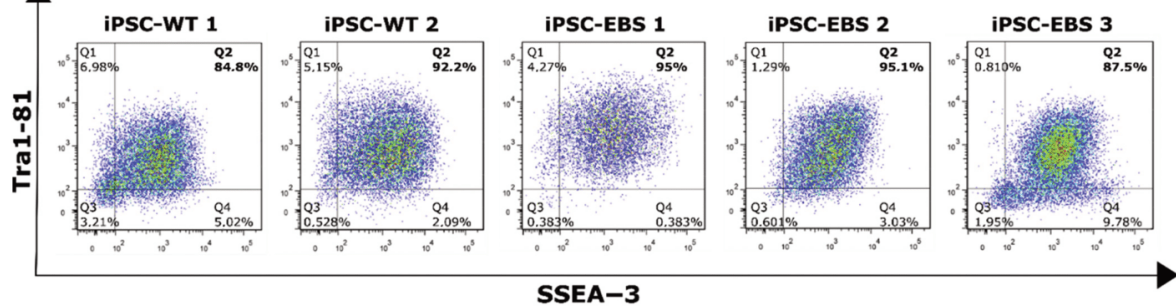
Patients	Age (years)/ Sex	Mutation	Protein mutation	Subtypes
EBS1	7/ Female	c.536T>C	p.Phe179Ser	Localized
EBS2	5/ Male	c.1429G>A	p.Glu477Lys	Generalized
EBS3	2/ Male	c.527A>G	p.Asn176Ser	Generalized

**Supplementary Figure S1. Description of K5 sequence variations and their positions on K5 protein sequence.** (a) Table describing the localization and type of sequence variations in the K5 gene and protein sequence and the subtypes of EBS described by the clinicians. (b) Localization of mutations in the protein sequence, located in both the 1A and 2B domains, essential for keratin folding and interactions. EBS, epidermolysis bullosa simplex; HIM, helix initiation motif; HTM, helix termination motif; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K5, keratin 5.

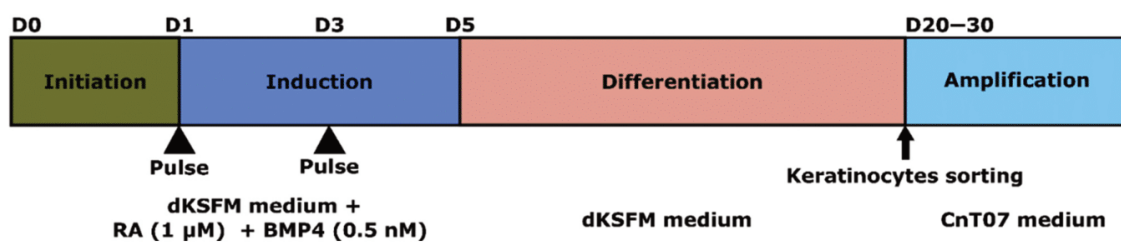
b



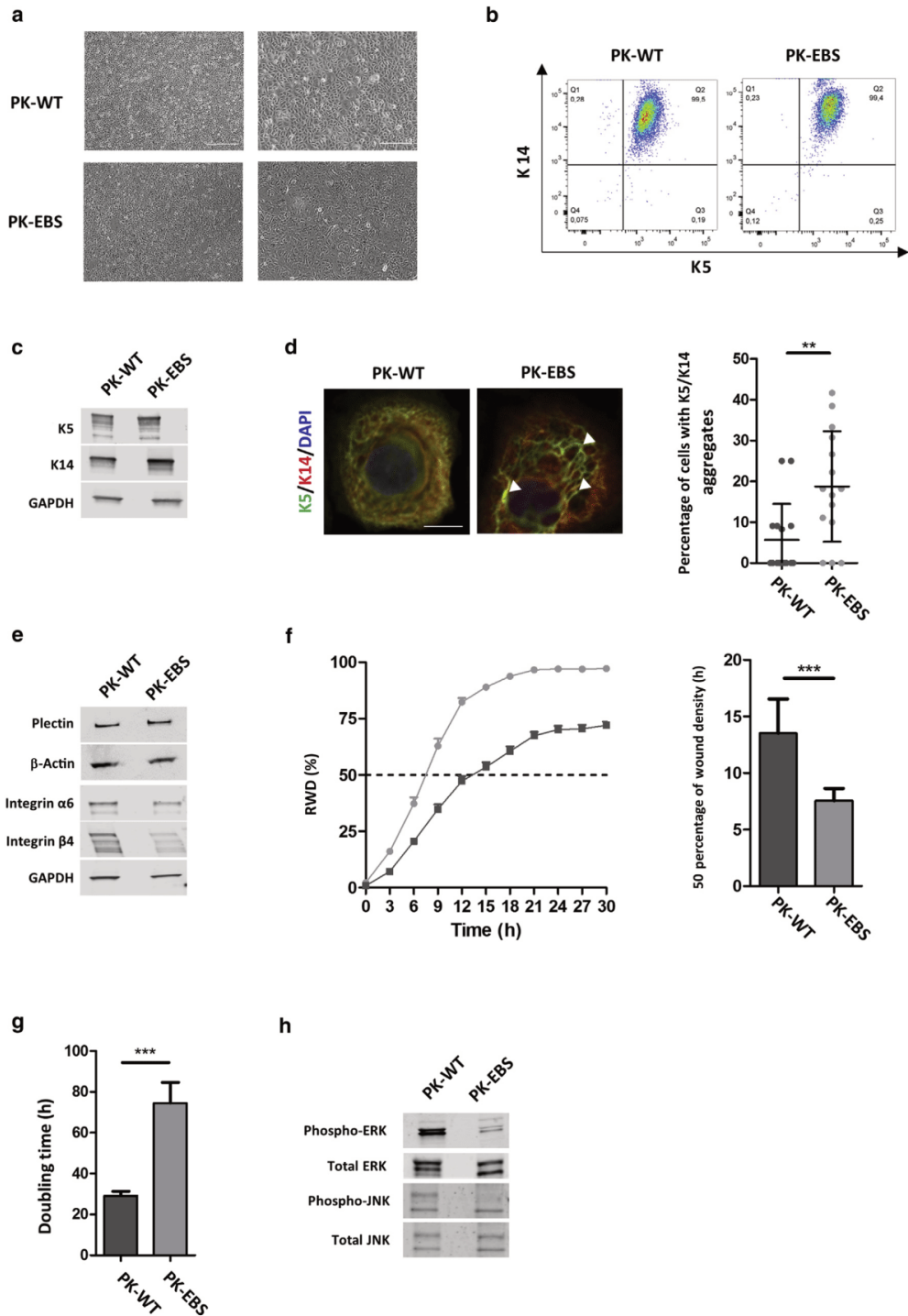
a



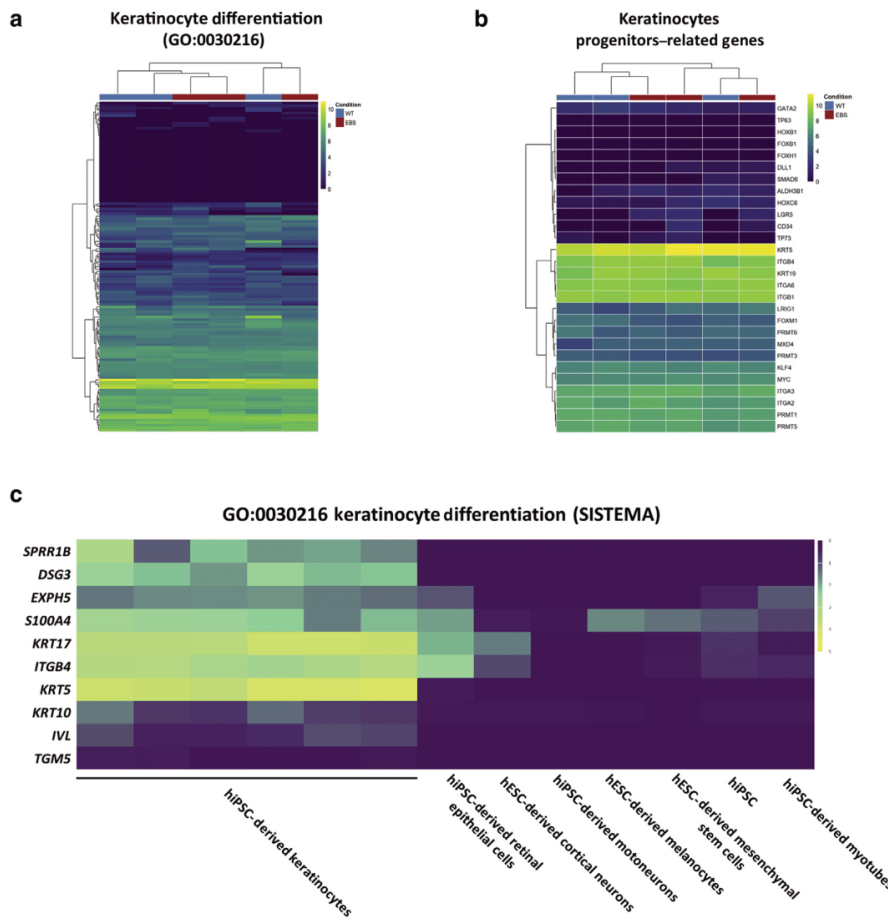
b



**Supplementary Figure S2. Pluripotency characterization and differentiation protocol.** hiPSCs from healthy donors (WT) or patients with EBS (EBS) were characterized before induction of differentiation to keratinocytes. (a) Flow cytometry analysis of pluripotency markers TRA1-81 and SSEA-3 expression in WT hiPSCs and EBS hiPSCs. Staining with isotypic antibody was performed as a control. (b) Protocol of differentiation into keratinocytes adapted from the study by Itoh et al. (2011) using RA and BMP4 pulses to induce differentiation into keratinocyte lineage. D, day; dKSFM, defined keratinocyte serum free medium; EBS, epidermolysis bullosa simplex; hiPSC, human induced pluripotent stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cell; Q, quartile; RA, retinoic acid; WT, wild type.

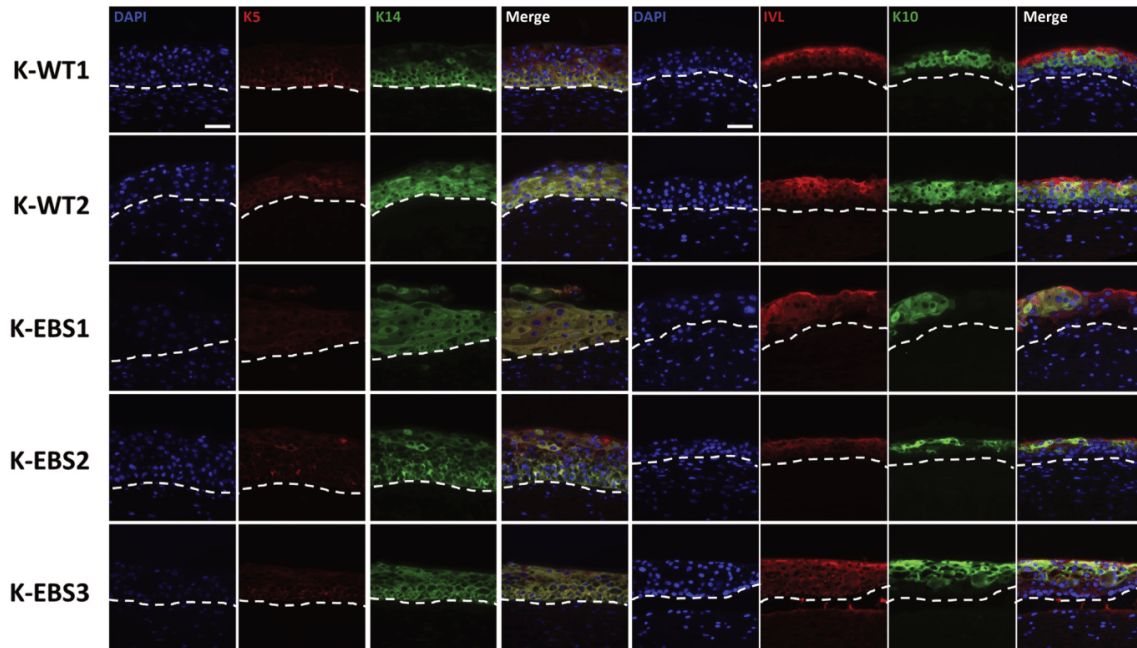


**Supplementary Figure S3. Characterization of the K5 sequence variation's impacts on primary EBS keratinocytes.** (a) Microscopy of WT and EBS primary keratinocytes (PK-WT/PK-EBS) (bar = 500  $\mu$ m for the first column, bar = 200  $\mu$ m for the second column). (b) Flow cytometry quantification of K5 and K14 expression. (c) Western blot of K5, K14, and GAPDH expression. (d) Immunostaining of K5 and K14 expression (bar = 20  $\mu$ m, arrows: aggregates) (left panel). Percentage of keratinocytes presenting at least one aggregate (right panel). (e) Western blot of  $\alpha 6$ - and  $\beta 4$ -integrin, plectin, GAPDH, or  $\beta$ -actin as a loading control. (f) RWD was measured over time (PK-WT: squares, PK-EBS: circles) (left panel); histogram showed the time needed to reach 50% of RWD (right panel).



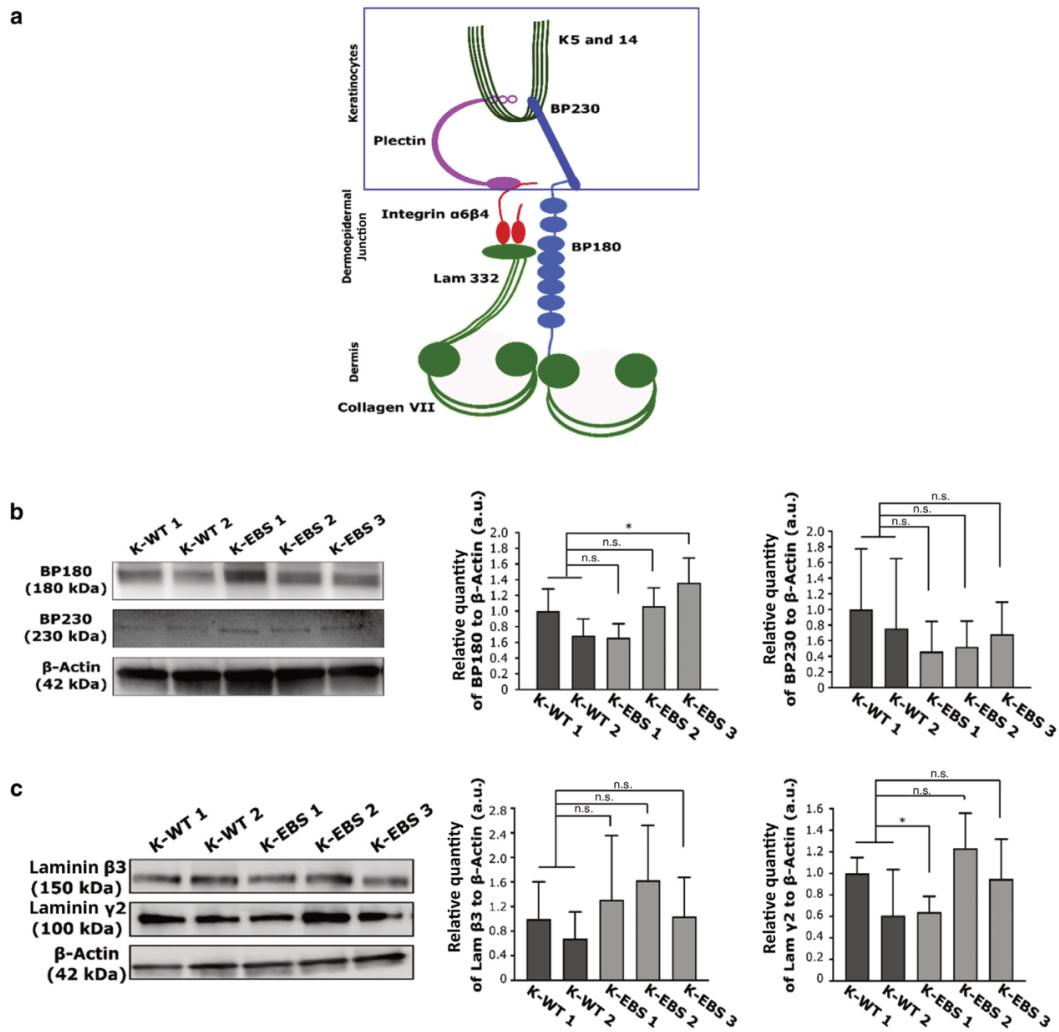
**Supplementary Figure S4. hiPSC-derived keratinocyte identity is homogeneous among WT and EBS-mutant cell lines.** Comparative transcriptomic analysis between K-WT and K-EBS, with a focus on keratinocyte identity. Representation (heatmap) of genes expression (normalized counts [ $\log x + 1$ ]) linked to keratinocyte identity. **(a)** Heatmap of genes involved in keratinocyte differentiation (GO: 0030216). **(b)** Heatmap of custom gene list linked to the keratinocyte progenitor cellular status. **(c)** Expression profile of 10 selected genes from GO:0030216 with the SISTEMA database, compared across multiple cell types. *EXPH5*, *S100A4*, *K17*, and *ITGB4* allowed for epithelial cell clustering, whereas *SPRR1B*, desmoglein-3 gene *DSG3*, *K5*, and *K10* are discriminant for keratinocytes among epithelial cells. EBS, epidermolysis bullosa simplex; GO, Gene Ontology; hESC, human embryonic stem cell; hiPSC, human induced pluripotent stem cell; K, keratin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; WT, wild-type.

(g) Doubling time. (h) Western blot of phospho-ERK1/2/total ERK1/2 and phospho-JNK/total JNK proteins. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney nonparametric *t*-test. \**P* < 0.05 and \*\*\**P* < 0.005. EBS, epidermolysis bullosa simplex; ERK, extracellular signal-regulated kinase; h, hour; JNK, c-Jun N-terminal kinase; K, keratin; phospho-ERK, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase; phospho-JNK, phosphorylated c-Jun N-terminal kinase; PK-EBS, epidermolysis bullosa simplex primary keratinocyte; PK-WT, wild-type primary keratinocyte; RWD, relative wound density; WT, wild type.



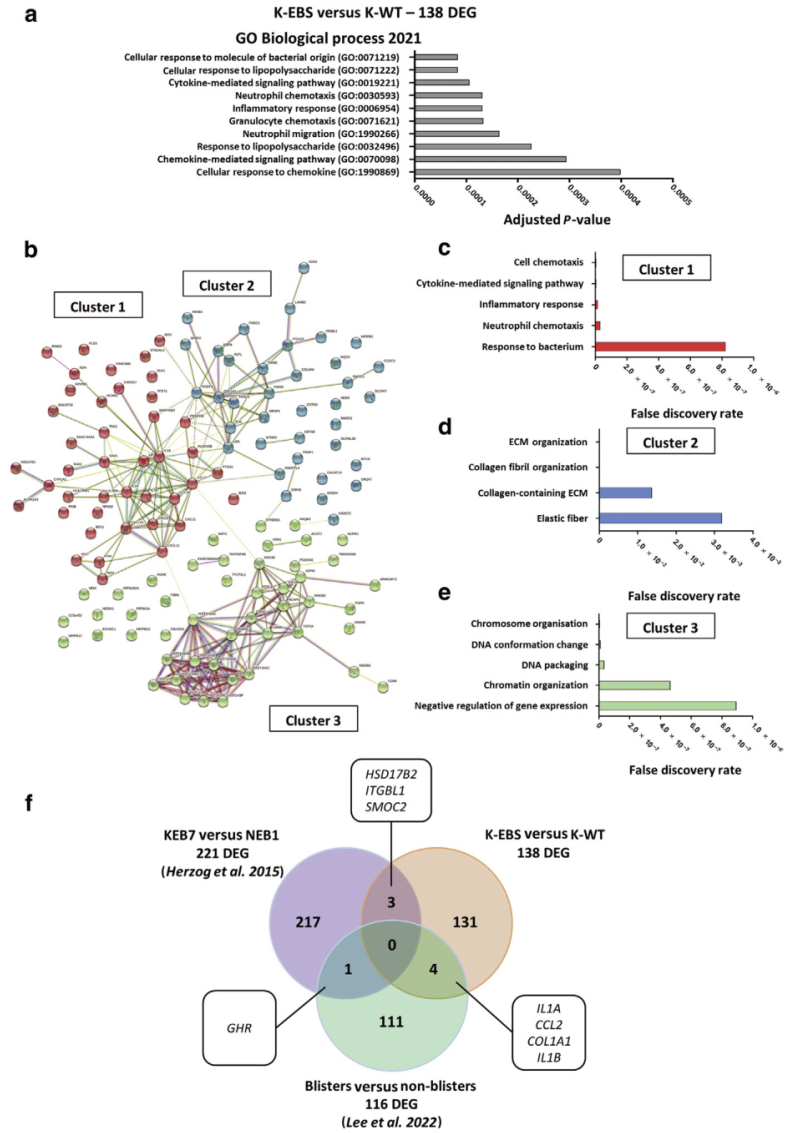
**Supplementary Figure S5. K-WT and K-EBS can reconstruct a pluristratified epidermis *in vitro*.** The capacity of K-WT and K-EBS for *in vitro* three-dimensional epidermis reconstruction is shown. Typical immunostaining images (bar = 30  $\mu$ m) of bioengineered epithelial sheets reconstructed on fibrin gel; stained for K5 (red, the second column), K14 (green, the third column), IVL (red, the sixth column), and K10 (green, the seventh column); and counterstained with DAPI. The dotted line represents the dermo-epidermal junction. IVL, involucrin; K, keratin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte.

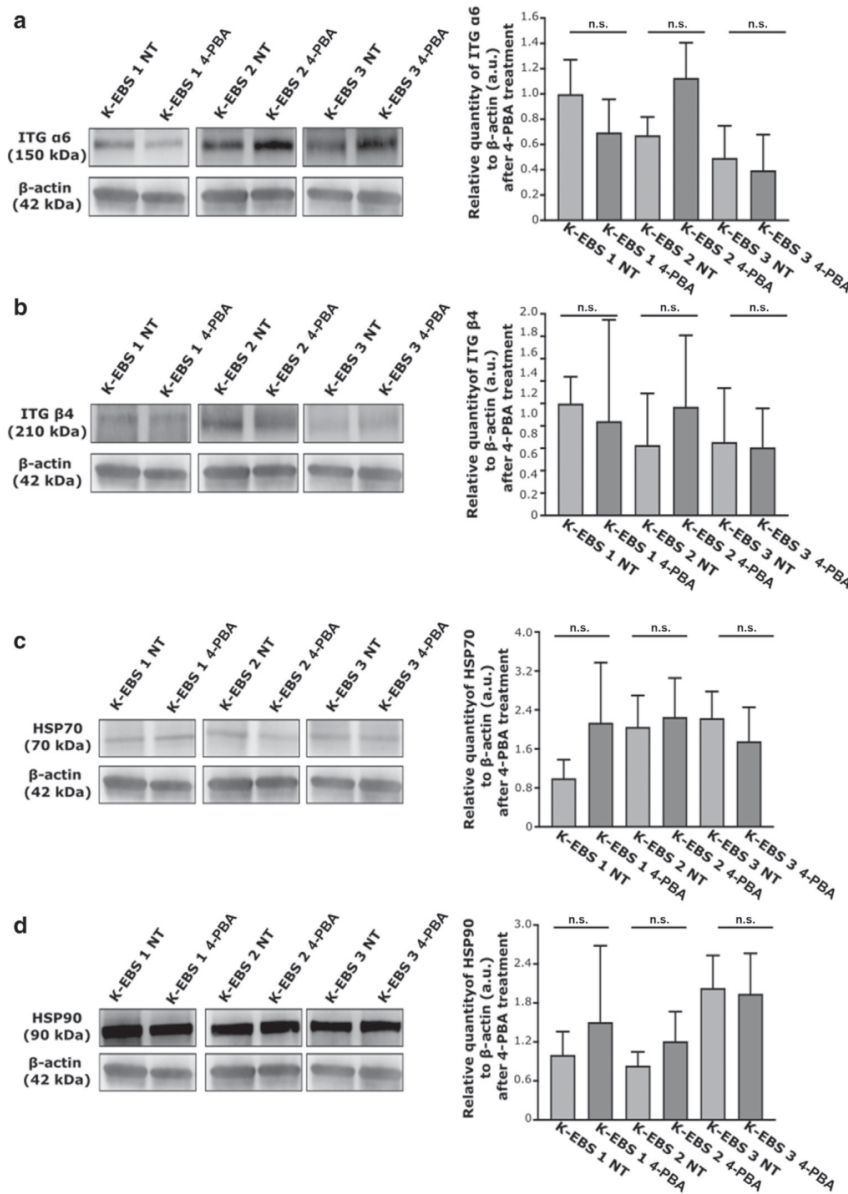




**Supplementary Figure S6. Expression of hemidesmosomal proteins in K-WT and K-EBS.** (a) Schematic representation of the proteins involved in the formation of the hemidesmosome structure. (b) Western blot analysis of BP180 and BP230 expressions and β-actin as a loading control. The left panel shows representative photography. The right panel shows the quantification. (c) Western blot analysis of β3- and γ2-laminin expression and β-actin as a loading control. Left panel shows the representative photography. Right panel shows the quantification. Results are expressed as mean ± SD (n = 3). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney nonparametric t-test for side-by-side comparison. \*P < 0.05. a.u., arbitrary unit; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte; n.s., nonsignificant.

**Supplementary Figure S7. K5 mutations have an impact on gene expression related to inflammation and extracellular matrix.** (a) GO enrichment analysis (Enrichr; GO Biological Process, 2021) of the DEGs between K-WT and K-EBS ( $P < 0.01$  and  $\log_2 FC > 0.4$ ). Enrichment is ranked from the smallest to the highest  $P$ -value. (b) Clusters revealed by STRING analysis of the 138 DEGs. (c) GO enrichment associated with cluster 1 related to an inflammatory response (GO:0006954). (d) GO enrichment associated with cluster 2 related to extracellular matrix (GO:0031012). (e) GO enrichment associated with cluster 3 related to DNA packaging (GO:0006323). (f) Venn diagram comparing the 138 DEG with the 221 DEG identified by microarray comparing KEB7 with NEB1 and the 116 DEG identified by transcriptome comparing blistered with nonblistered EBS epidermis. DEG, differentially expressed gene; EBS, epidermolysis bullosa simplex; ECM, extracellular matrix; FC, fold change; GO, Gene Ontology; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte.





**Supplementary Figure S8. The 4-PBA treatment does not rescue the protein expression of  $\alpha 6$ - and  $\beta 4$ -ITG nor of HSP70/90.** Western blot analysis of (a)  $\alpha 6$ -ITGs, (b)  $\beta 4$ -ITGs, (c) HSP70, and (d) HSP90 proteins expression in K-EBS NT or treated with 4-PBA;  $\beta$ -actin served as a loading control. The left panels show typical photography. The right panels show the quantification. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical analyses were performed using Mann-Whitney nonparametric *t*-test for side-by-side comparison. 4-PBA, 4-phenyl butyric acid; a.u., arbitrary unit; ITG, integrin; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; n.s., nonsignificant; NT, not treated.

**Supplementary Table S1. List of DEG (Alphabetical) in K-EBS compared with those in K-WT ( $P < 0.01$  and  $\log_2 FC > 0.4$ )**

Antibodies	Reference	Provider	Host Species	Antibodies	Reference	Provider	Host Species
Cytokeratin 5 (XM26)	ab17130	Abcam	Mouse monoclonal	mTOR (7C10)	2983	CST	Rabbit monoclonal
Cytokeratin 14 (SPM263)	NBP2-34403	Novus Biological	Mouse monoclonal	Phosphorylated Akt (Ser473)	4060	CST	Rabbit monoclonal
Keratin 5 polyclonal, purified	905501	BioLegend	Rabbit polyclonal	Akt (C67E7)	4691	CST	Rabbit monoclonal
Keratin 14 polyclonal, purified	905304	BioLegend	Rabbit polyclonal	GAPDH (14C10)	2118	CST	Rabbit monoclonal
p4/42 MAPK	9101	CST	Rabbit monoclonal	Vinculin	ab129002	Abcam	Rabbit monoclonal
Phosphorylated p44/42 MAPK	9102	CST	Rabbit monoclonal	b4-Integrin (B-4)	sc-377523	Santa Cruz	Mouse monoclonal
SAPK/JNK	9252	CST	Rabbit polyclonal	BPAG1	NU-01-BP1	Cosmobio	Mouse monoclonal
Phosphorylated SAPK/JNK	4668	CST	Rabbit monoclonal	Collagen XVII	ab184996	Abcam	Rabbit monoclonal
$\alpha$ 6-Integrin	sc-10730	Santa Cruz	Rabbit polyclonal	Keratin 5 (EP1601Y)	ab52635	Abcam	Rabbit monoclonal
$\alpha$ 6-Integrin	3750	CST	Rabbit polyclonal	Keratin 14	905301	BioLegend	Rabbit polyclonal
Plectin-1 (D6A11)	12254	CST	Rabbit monoclonal	Involucrin (SY5)	I9018-.2ML	Sigma-Aldrich	Mouse monoclonal
$\beta$ 4-Integrin	4707	CST	Rabbit monoclonal	Keratin 10	905403	Biolegend	Rabbit polyclonal
Phosphorylated p38 MAPK	4511	CST	Rabbit monoclonal	Goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555	A21424	Invitrogen	
p38 MAPK (D13E1)	8690	CST	Rabbit monoclonal	Goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488	A11008	Invitrogen	
Phosphorylated mTOR (Ser2448)	5536	CST	Rabbit monoclonal				

Abbreviations: Akt, protein kinase B; CST, Cell Signaling Technology; DEG, differentially expressed gene; FC, fold change; JNK, c-Jun N-terminal kinase; K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte.

## Supplementary Table S2. Antibodies References

Gene Symbol	Base Mean	Log <sub>2</sub> Fold Change	P-Value	Differential_Expression in K-EBS Versus in K-WT
ACOT1	26.50	2.74	0.00039336	6.69
ALDH1A3	101.45	3.75	0.000387623	13.43
ALOX15B	29.87	3.13	0.001210046	8.73
ALPL	6.31	5.20	0.002620293	36.70
ANGPTL4	18.73	3.45	0.000354389	10.94
ASPEN	34.77	4.04	8.43E-005	16.46
ATP6V0A4	23.50	2.61	0.004122246	6.10
BEX1	19.53	3.52	0.00510856	11.44
C6orf223	5.57	6.00	0.0011292	63.94
CARD17	9.59	2.97	0.009913719	7.82
CCDC9B	192.04	2.70	0.000106892	6.48
CCL2	19.87	3.48	0.001199757	11.14
CCL20	55.08	3.25	0.000218608	9.52
CD99L2	159.40	1.77	0.001542199	3.42
CNIH3	9.22	5.74	0.000696462	53.59
CNTN3	22.97	2.62	0.005001682	6.14
COL1A1	669.11	1.75	0.008829917	3.35
COL6A6	6.21	6.16	0.006500591	71.61
CRYBB2P1	73.94	1.60	0.008109095	3.02
CXCL10	22.57	4.52	6.28E-005	22.96
CXCL11	10.17	4.38	0.00161888	20.84
CXCL5	21.91	3.35	0.004319782	10.21
CXCL6	28.04	3.56	0.007863901	11.81
CYP1A1	286.96	2.57	0.004600787	5.93
DAAM2	24.27	2.84	7.49E-005	7.17
DLK1	10.57	4.39	0.004952318	20.96
ECHDC1	34.24	1.90	0.00656466	3.73
ELN	94.25	4.23	6.77E-007	18.75
FIBIN	6.39	5.20	0.003685297	36.85
FMOD	11.64	7.06	1.97E-005	133.78
FNDC1	12.99	4.25	0.003510505	19.06
G0S2	7.77	4.59	0.003778547	24.01
GALNT14	55.19	2.79	0.004533745	6.92
GALNT16	4.06	5.54	0.007152906	46.57
HLA-DRB1	10.39	6.91	1.61E-005	120.16
HMGB3	1,096.06	1.59	0.004321477	3.01
HS3ST2	22.85	8.04	9.77E-008	263.23
HSD17B2	8.77	4.70	0.002652047	25.99
IER3	1,063.42	1.64	0.005627688	3.12
IFI27	71.69	3.79	0.001065968	13.81
IFI44	29.96	3.65	0.00048176	12.54
IL1A	2,133.82	1.73	0.005521	3.31
IL1B	972.54	2.35	1.33E-005	5.09
IL7R	95.83	2.15	0.007793701	4.44
INHBA	2,743.20	2.03	0.000343186	4.08
INSYN2B	3.79	5.45	0.006659909	43.65
ITGA10	6.85	4.38	0.007088204	20.78
ITGBL1	11.38	3.41	0.004876717	10.61
KRT6B	1,733.38	1.84	0.005364916	3.59
LAMB3	1,179.09	1.70	6.86E-005	3.26
LIF	78.51	4.70	2.28E-006	26.00
LINC00520	7.56	5.46	0.000928161	43.93
LINC-PINT	31.51	1.92	0.009901339	3.78
LOC100996732	50.59	2.47	0.000341169	5.55
LOX	14.13	2.67	0.009410944	6.39
LSP1P4	50.59	2.47	0.000341169	5.55
LSP1P5	56.83	2.46	0.000496495	5.49

(continued)

**Supplementary Table S2. Continued**

Gene Symbol	Base Mean	Log <sub>2</sub> Fold Change	P-Value	Differential_Expression in K-EBS Versus in K-WT
MANCR	70.51	2.86	0.009767641	7.26
MFAP4	116.95	2.95	0.002598498	7.71
MT1L	160.68	2.30	0.004906368	4.92
MX2	6.98	6.33	0.001846489	80.20
NFIX	39.26	2.03	0.004541165	4.08
NOV	6.55	5.25	0.004096825	38.13
NPAS2	192.74	3.17	9.37E-011	8.98
NPIP12	547.25	1.28	0.00865687	2.42
NPIP13	547.25	1.28	0.00865687	2.42
NPIP3	547.25	1.28	0.00865687	2.42
NPIP5	547.25	1.28	0.00865687	2.42
NUPR1	89.97	2.55	0.009932525	5.87
OLFML2B	8.38	6.59	0.000147919	96.39
PCDHA6	28.34	5.16	0.000892984	35.75
PDGFRB	28.11	3.32	0.000144786	10.00
PLD5	25.67	2.48	0.002719138	5.59
POSTN	555.71	2.88	0.000391402	7.37
PTGS1	14.88	3.95	0.00614677	15.45
RTEL1-TNFRSF6B	78.31	1.76	0.006641418	3.40
SAA1	21.80	4.79	3.71E-005	27.63
SAA2	77.30	3.17	0.000502554	9.03
SAA2-SAA4	79.53	3.22	0.000399266	9.32
SERPINB2	1,391.04	2.19	0.000215893	4.58
SFRP2	23.26	4.80	3.51E-006	27.77
SLC9A7	79.26	1.72	0.007450381	3.30
SMOC1	83.10	3.45	3.84E-005	10.96
SMOC2	47.65	3.03	0.000214267	8.14
ST6GAL2	7.08	4.40	0.004354189	21.12
SYNDIG1	17.96	4.23	0.000212657	18.83
TAC1	10.01	5.86	0.002220972	58.05
TAGLN	1,314.18	1.73	0.000401047	3.32
TFCP2L1	22.37	3.18	0.003917272	9.07
TMEM255B	4.29	5.62	0.004342279	49.25
TNFRSF6B	63.94	2.15	0.000797248	4.43
TNMD	38.08	5.87	3.68E-008	58.56
TPST1	76.25	2.16	0.0043968	4.47
TRNP1	72.96	2.46	0.000665622	5.51
VNN1	11.73	3.22	0.007157639	9.35
WIPI1	290.15	1.43	0.003156565	2.70
XDH	202.22	1.72	0.009346373	3.29

Abbreviations: K-EBS, epidermolysis bullosa simplex keratinocyte; K-WT, wild-type keratinocyte.



## **Partie 2 :**

### **« Génération d'une lignée isogénique de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS, par la technologie CRISPR/Cas9 »**

#### **Contexte :**

La mise en évidence de l'intérêt des hiPSc pour la modélisation de l'EBS, constitue une avancée majeure pour permettre l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de cette pathologie. Cependant, en raison de variabilités du patrimoine génétique entre les individus et de variabilités épigénétiques ou liées à l'âge et au sexe, il est difficile d'étudier précisément les changements moléculaires, cellulaires et phénotypiques résultant d'une mutation. Pour pallier à cette limitation, une alternative consiste à générer une lignée isogénique, conçue à partir d'une lignée pathologique, en corrigeant précisément la mutation causale, et permettre de corréler celle-ci spécifiquement aux phénotypes pathologiques.

L'objectif de ces travaux a donc consisté à utiliser le potentiel de technologies d'édition du génome, pour générer une lignée d'hiPSc isogénique corrigée, afin de permettre des analyses comparatives plus précises et d'établir un lien direct entre la mutation et les phénotypes pathologiques mis en évidence dans notre modèle cellulaire de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS, notamment la composante inflammatoire, qui sera détaillée en « Partie 3 ».

#### **I. Génération de lignée isogénique par technologies d'édition du génome**

Pour permettre la génération d'une lignée isogénique, qui ne diffère génétiquement que par la mutation, nous avons mené deux stratégies de correction génique, basées sur le système d'édition du génome CRISPR-Cas9 ou un dérivé de celui-ci, le Base Editing.

Pour cela nous avons initialement sélectionné la lignée d'hiPSc EBS-1 mutée au sein de l'exon 7 du gène *KRT5* (c.1429 G>A), se traduisant par la modification d'un acide aminé dans la séquence protéique (pGlu477Lys), dont le phénotype clinique du patient est décrit comme étant le plus sévère des lignées à notre disposition (sous type EBS-généralisée sévère) avec une fragilité palmo-plantaire, une atteinte tégumentaire et des extrémités.



## **A. Correction génique de la lignée d'hiPSc EBS-1**

### **1. Base Editing**

Comme décrit dans l'introduction du manuscrit, la technologie de Base Editing, dérivée de la technologie CRISPR-Cas9, a été décrite comme permettant d'éditer très précisément un nucléotide, sans générer de coupure double brin, et sans apport de matrice servant de modèle de réparation (Komor et al. 2016). Cette nouvelle approche consiste à convertir spécifiquement un nucléotide, grâce à l'activité de désamination catalysée par des enzymes appelées « enzymes désaminases » pouvant être de deux types : Cytidine désaminase ( $C \rightarrow T$ ) ou Adénine désaminase ( $A \rightarrow G$ ) ; cette enzyme est fusionnée à une protéine Cas9 mutée (dans le domaine RuvC, un des deux domaines à activité nucléase), enzymatiquement inactive et donc déplétée de sa fonction de clivage double brin. Dans le cas de la désamination médiée par l'Adénine désaminase (ABE), lorsque l'ARN guide va positionner la protéine Cas9 mutée fusionnée à l'ABE (Cas9-ABE) sur la séquence cible, celle-ci va induire une désamination hydrolytique de l'Adénine (A) en Inosine (I), qui sera lue comme une Guanine (G) par les enzymes polymérase, permettant ainsi la conversion du A en G ( $A \rightarrow G$ ) (Schatoff, Zafra, and Dow 2019).

C'est en exploitant ainsi le principe du Base Editing, que l'on a utilisé cette technologie pour permettre la correction de lignée d'hiPSc EBS-1 porteuse de la mutation c.1429 G>A au sein du gène *KRT5* pour convertir l'adénine en guanine.

Cette technologie n'étant pas mise en place au laboratoire à ce moment-là, la 1<sup>ère</sup> partie de mes travaux a consisté à la mise en place des outils nécessaires pour l'édition par Base Editing.

#### **a) Génération du matériel**

Classiquement, dans les hiPSc, l'endonucléase Cas9 et l'ARN guide sont apportés sous forme de ribonucléoprotéine (RNP) formée préalablement *in vitro*, mais cela nécessite l'apport de la Cas9 sous forme de protéine. Cependant, la protéine Cas9 fusionnée à l'ABE (Cas9-ABE) n'avait jamais été produite *in vitro* et purifiée et n'était donc pas accessible sous forme protéique. Une alternative consiste alors à transfecter les hiPSc par de l'ADN plasmidique ou ARNm codant cette protéine Cas9 mutée, afin de conduire à l'expression de celle-ci au sein de la cellule et sa complexation avec l'ARN guide *in vivo* dans la cellule.

Lorsque nous avons initié cette stratégie nous n'avions pas de plasmide pour effectuer cela, j'ai donc généré au laboratoire, grâce à diverses étapes de clonage (non détaillées), un plasmide codant pour cette protéine Cas9-ABE, nommé « pCAG-ABE » (figure 1A). Parallèlement à la génération de celui-ci, nous avons ensuite pu obtenir deux plasmides qui ont été développés par la société Addgene

« xABEmax n°119813 », « NG-ABEmax n°123163 », codant tous deux cette protéine Cas9-ABE. Ces plasmides contiennent différents éléments importants à savoir : (1) un promoteur CAG ou CMV, qui permettra l'expression de la protéine d'intérêt Cas9-ABE dans la cellule (2) un promoteur T7 pour permettre l'initiation de la transcription de l'ARNm (3) une séquence Kozak pour permettre l'initiation de la traduction dans la cellule (4) deux séquences NLS pour permettre l'importation de la protéine dans le noyau après traduction. De plus les 3 versions de plasmides codent chacun pour une variante de la Cas9 reconnaissant chacune un motif PAM spécifique : les plasmides xABE et pCAG-ABE codent pour une protéine Cas9 dont le motif reconnu par la Cas9 est 5'-NGG-3' et le plasmide NG-ABE code pour une protéine Cas9 dont le motif reconnu par la Cas9 est 5'-NG-3' (Anders et al. 2014 ; T. P. Huang et al. 2019).

Cependant, l'apport direct de la protéine Cas9-ABE sous forme de plasmide, se confronte à différentes limitations, notamment en raison de la taille importante du plasmide (supérieure à 9kb) et donc susceptible de rentrer difficilement au sein des hiPSc. De plus, l'apport d'un plasmide, implique la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle une fois le plasmide introduit au sein des hiPSc, pour permettre l'expression de la protéine Cas-ABE.

Pour surmonter ces différentes limitations, une solution s'est portée sur la génération d'ARNm codant pour cette protéine Cas9-ABE, par transcription *in vitro*, à partir des différents plasmides à notre disposition. Cette approche permettra de conduire à l'expression de cette protéine au sein de la cellule cible et la complexation de celle-ci avec l'ARNg *in vivo* dans la cellule.

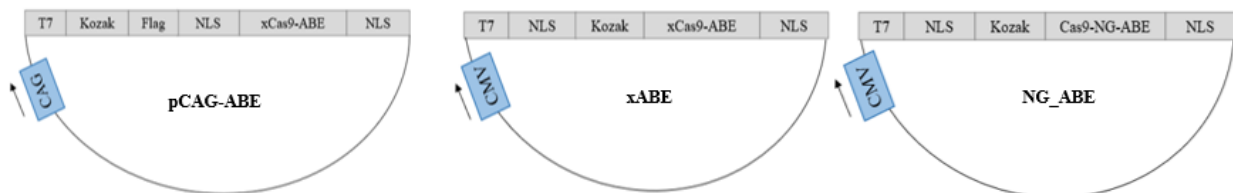
- **Génération d'ARNm codant la protéine Cas9-ABE, à partir d'ADN plasmidique**

Pour ce faire la première partie a été de produire les ARNm à partir de ces plasmides, à partir d'un kit de transcription *in vitro* adapté permettant de synthétiser de grandes quantités d'ARNm coiffés et polyadénylés, mimant les ARNm trouvés *in vivo*. Ce kit utilise l'ARN polymérase T7 pour effectuer la transcription, nécessitant la présence du promoteur T7, qui est présent au sein des 3 plasmides dont on dispose. Les trois plasmides codant pour la protéine Cas9-ABE ont été linéarisés, et transcrits à partir de ce promoteur T7, puis purifiés selon le protocole du kit.

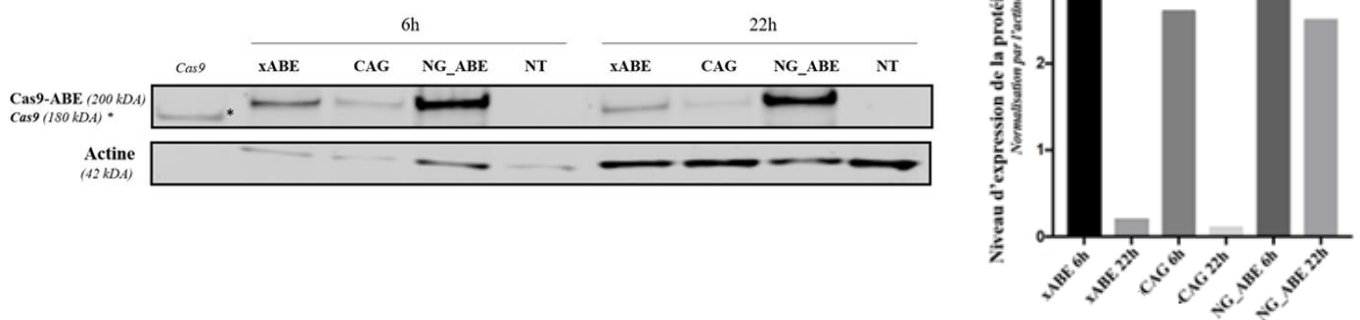
Par la suite, pour évaluer la fonctionnalité de ces ARNm produits *in vitro*, nous avons électroporé les hiPSc EBS-1 avec les ARN transcrits *in vitro* afin de vérifier l'expression de la protéine Cas-ABE au sein de la cellule. Une extraction protéique a été effectuée 6h et 22h après électroporation sans (conditions NT) ou avec ces ARNm (conditions xABE, CAG, NG-ABE), et le niveau d'expression de la protéine Cas9-ABE a été quantifié par Western blot (Figure 1B). Dans les conditions NT, nous n'observons pas d'expression de la protéine Cas9-ABE, comme attendu (figure 1B, partie gauche). De plus, la normalisation de l'expression de la protéine Cas9-ABE par rapport à l'expression de l'actine (figure 1B,

partie droite), nous a permis de montrer que ces 3 ARNm ont conduit à l'expression de la protéine Cas9-ABE dans les hiPSc EBS-1 6h après électroporation. De plus, le maintien de l'expression de la protéine Cas9-ABE n'était observable jusqu'à 22h, uniquement dans les hiPSc EBS-1 électroporées par l'ARNm NG-ABE.

**A)**



**B)**



**Figure 1 : Expression de la protéine Cas9-ABE dans les hiPSc EBS-1**

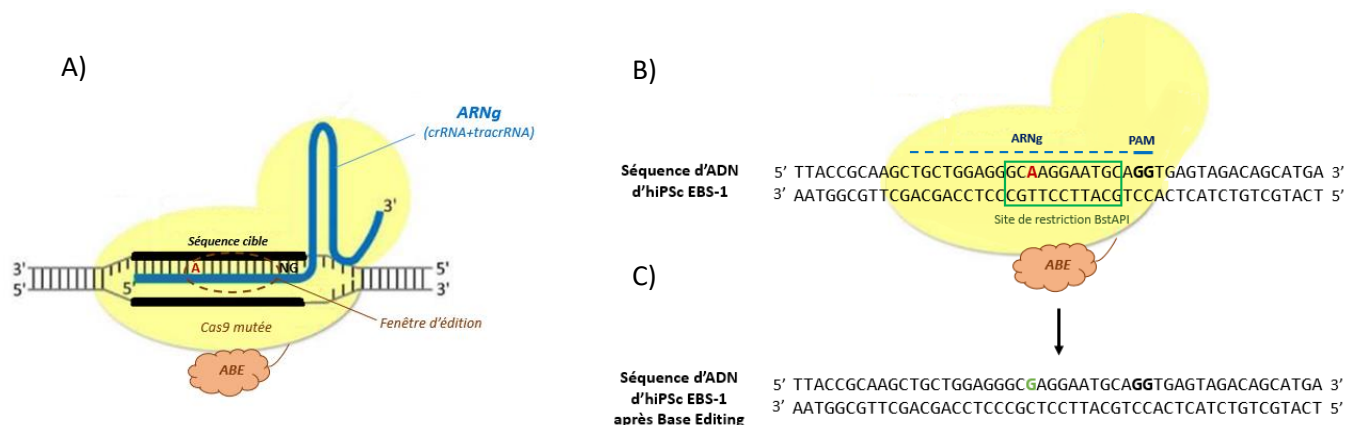
**(A)** Représentation schématique des plasmides utilisés pour la production *in vitro* d'ARNm. Ces plasmides sont constitués d'une séquence codant l'Adénine Désaminase (ABE) fusionnée à la séquence codant la protéine Cas9 (sous différentes formes selon les plasmides), sous le contrôle d'un promoteur CAG ou CMV, qui permettra l'expression de la protéine d'intérêt Cas9-ABE ; d'un promoteur T7 pour permettre la production d'ARNm ; d'une séquence Kozak pour permettre l'initiation de la traduction ; et de deux séquences NLS pour permettre l'importation de la protéine dans le noyau après traduction. La séquence Flag présente sur le plasmide NG-ABE servira d'étiquette à la protéine. **(B)** Analyse par Western blot (partie gauche) de l'expression de la protéine Cas9-ABE, 6h et 22h après électroporation des hiPSc EBS-1 par les ARNm (CAG ; xABE ; NG\_ABE). L'Actine a été utilisée comme contrôle de charge. La protéine Cas9 (\*) recombinante a été déposée comme contrôle. L'analyse densitométrique (partie droite) montre le niveau d'expression de la protéine Cas9-ABE normalisé par rapport à l'expression de l'actine. (n=1 ; sans analyse statistique)

Suite à ces résultats, nous avons fait le choix de sélectionner l'ARNm produit à partir du plasmide NG-ABE, car celui-ci semble permettre une expression plus stable de la protéine dans le temps et nous supposons donc que cela permettra d'augmenter l'efficacité de correction génique

- **Design de l'ARN guide**

Pour permettre l'édition du génome par Base Editing nous avons ensuite designé un ARNg, en prenant en compte : (1) le motif PAM nécessaire à la fixation de la protéine Cas9-ABE codée par l'ARNm NG-ABE : 5'-NG-3' (2) la fenêtre d'édition de la protéine Cas9-ABE (figure 2A).

En effet, pour que la protéine Cas9-ABE désamine précisément le nucléotide muté, celle-ci doit se positionner dans une fenêtre d'édition précise, c'est-à-dire 12 à 16 nucléotides en amont du PAM (Gaudelli et al. 2017 ; Zhang et al. 2020). Grâce au logiciel de conception d'ARNg CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) un seul ARNg ciblant la séquence au plus proche de la mutation a été prédit comme efficace et a donc été designé pour la suite de l'étude.

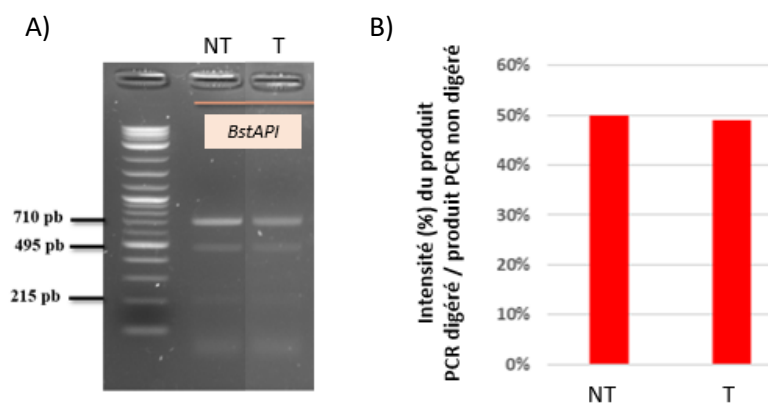


**Figure 2 : Schéma expérimental de la stratégie de Base Editing menée à partir d'hiPSc EBS-1**

**(A)** L'ARNg (en bleu) a été designé pour permettre de positionner la Cas9(mutée)-ABE sur la séquence cible, dans la fenêtre d'édition de l'Adénine désaminase (ABE), pour permettre la conversion du nucléotide cible A, en G. **(B)** Schéma expérimental de la séquence d'ADN d'hiPSc EBS-1, présentant un site de restriction BstAPI (GCANNNTGC, encadré vert) au niveau du site où se trouve la mutation. La séquence reconnue par l'ARNg est représentée en bleu pointillé et le PAM en bleu trait plein. **(C)** Séquence d'ADN d'hiPSc EBS-1 obtenue après Base Editing, où le A a été converti en G, entraînant la disparition du site de restriction.

## b) Correction génique par Base Editing

Les hiPSc EBS-1 ont donc ensuite été électroporées sans (NT) ou avec l'ARN guide et l'ARNm NG-ABE (T). 48h après électroporation, le pool de cellules a été décollé à l'accutase et récupéré, afin d'en extraire l'ADN génomique (ADNg). Une PCR (Polymerase Chain Reaction) a ensuite été effectuée à partir de l'ADNg pour amplifier la zone d'intérêt. L'ADN génomique provenant de lignée d'hiPSc EBS-1 contient, au niveau de la mutation, un site de restriction *BstAPI* qui doit disparaître si l'Adénine est désaminée et convertie en Guanine (Figure 2B, 2C). L'ADNg a donc été digéré par *BstAPI* pour évaluer l'efficacité d'édition (figure 3).



**Figure 3 : Analyse de l'efficacité d'édition génique**

**(A)** Dépôt et migration sur gel d'électrophorèse des produits de digestion obtenus à partir d'hiPSc EBS-1 non électroporées (NT) et électroporées (T) par l'ARNg et l'ARNm NG-ABE. La bande de 710pb correspond à l'allèle WT non digérée, et les bandes de 495pb et 215pb résultent de l'allèle mutée qui a été digérée. **(B)** Histogramme représentant l'intensité des produits de PCR digérés normalisée par rapport à l'intensité du produit de PCR non digéré (n=1).

La lignée d'hiPSc EBS-1 étant hétérozygote, nous avons observé comme attendu, dans la condition non éditée (NT), une bande de 710pb correspondant à l'allèle WT et deux bandes de 495 et 215pb correspondant aux fragments digérés par *BstAPI* et donc à l'allèle mutée (figure 3A). De plus, nous observons le même profil pour la condition éditée (T) (figure 3A). La quantification de la figure 3A (figure 3B) montre un pourcentage de digestion quasiment identique dans les deux conditions, ce qui suggère une absence de correction du nucléotide muté dans le pool de cellules éditées.

Cette expérience a par la suite été reproduite, mais les résultats n'étaient toujours pas concluants. L'hypothèse la plus probable à l'absence d'édition, serait que l'ARNg ne permette pas de positionner la Cas9-ABE au niveau de la région cible dans la bonne fenêtre d'édition et donc de convertir le nucléotide cible.

Etant donné qu'aucun autre ARN guide n'ait pu être désigné pour permettre de se positionner dans la fenêtre d'édition de la Cas-ABE, nous avons pris la décision d'arrêter cette stratégie et de nous concentrer sur la méthode CRISPR-Cas9 plus classique, pour laquelle le choix d'ARN guide est moins restreint.

## **2. CRISPR/Cas9 médié par HDR**

La stratégie d'édition du génome par la technologie CRISPR-Cas9 classique, utilisant le mécanisme de recombinaison homologue a donc été menée à partir de cette même lignée d'hiPSc EBS-1, mutée au sein de l'exon 7 du gène *KRT5* (c.1429 G>A). Cette approche permet d'induire une cassure double brin dans la région où se situe la mutation pour mener à l'édition de celle-ci, activant alors le mécanisme de recombinaison homologue et à l'insertion de la matrice contenant le nucléotide à corriger.

La première étape implique le design d'un ARN guide, dont la zone pour le choix de celui-ci est moins restreinte que dans le cadre du Base Editing. De plus, celui-ci nécessite seulement la présence du motif PAM (5'-NGG-3') et peut être plus éloigné de la mutation, bien qu'il ait été décrit que l'édition par HDR est plus efficace lorsque l'ARNg s'hybride au plus proche de la mutation, (Schubert et al. 2021). De ce fait, nous avons utilisé le logiciel de conception d'ARN guide CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), qui localise les séquences PAM proches de la cible (où se trouve la mutation), tout en prenant en compte l'activité hors cible de celui-ci. Selon ces critères, le logiciel a ainsi pu prédire 5 ARNg (figure 3A) comme étant spécifiques de la région cible. Par contre, l'efficacité prédite pour ces guides n'était pas décrite comme optimale.

Dans les hiPSc, il a été montré que la méthode la plus efficace pour permettre une édition génique élevée sans effet hors cible, est de transfecter les hiPSc avec une ribonucléoprotéine (RNP) formée *in vitro* par la complexation de l'ARNg et de la Cas9 (Sojung Kim et al. 2014).

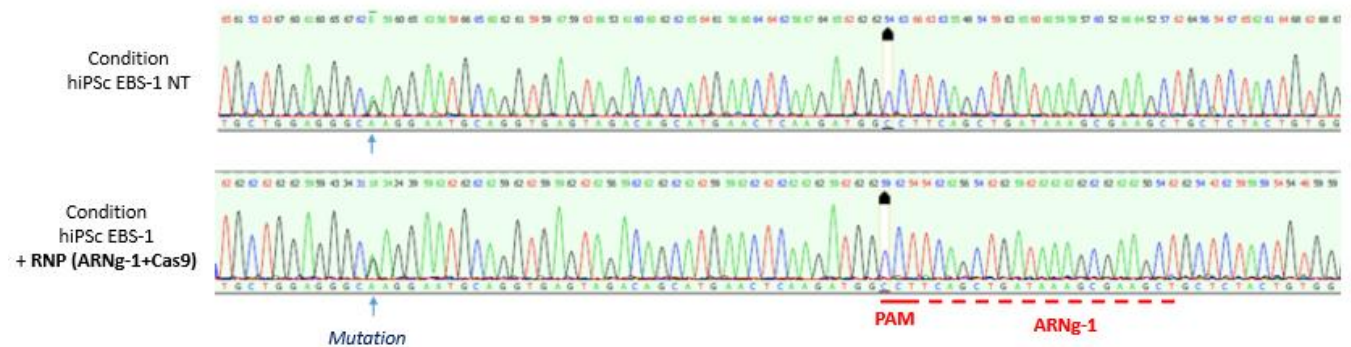
La première étape a été d'évaluer l'efficacité de la ribonucléoprotéine formée *in vitro* à générer une coupure double brin. Pour cela, les hiPSc EBS-1 ont été électroporées indépendamment avec la RNP formée *in vitro* avec chacun des ARNg. 48h après électroporation les ADNg ont été extraits des pools de cellules puis la région d'intérêt, où a en théorie été générée la cassure double brin, a été amplifiée par PCR et séquencée (Figure 3B). L'efficacité de cassure double brin est reflétée par le taux d'indels (insertions ou délétions) au niveau du site de coupure. Cependant pour les 5 ARN guides testés, les

chromatogrammes pour les d'hiPSc EBS-1 électroporées par les différentes RNP formées (résultat montré que pour l'ARNg-1) et la Cas9, sont identiques au chromatogramme obtenu pour les hiPSc EBS-1 non électroporées, ce qui montre l'absence d'indels au niveau du site de coupure et donc l'absence de coupure double brin (figure 3B).

A)



B)



**Figure 3 : Efficacité des Ribonucléoprotéines (Cas9 + différents ARN guide)**

**(A)** Représentation schématique de la position et des séquences des ARNg testées. **(B)** Chromatogrammes obtenus à partir du produit PCR généré à partir d'ADNg extrait d'hiPSc EBS-1 électroporés sans (condition NT) ou avec la RNP (Cas9+ARNg-1). La mutation est indiquée par une flèche bleue ; la séquence reconnue par le guide est représentée par un trait rouge pointillé. (Les chromatogrammes obtenus suite à l'électroporation avec les autres ARNg ne sont pas montrés).

De nombreuses optimisations ont été testées : (1) l'électroporation avec deux appareils nucléofector différents (Amaxa™ Nucleofector™ – Lonza ; Neon® Transfection System – Thermofisher) (2) l'utilisation de différents programmes d'électroporation, en modifiant les paramètres comme le voltage et les pulses lors de l'électroporation (3) la forme de l'ARN guide utilisé, soit complexée *in vitro* par nous-même, par l'hybridation du crRNA et du tracrRNA, soit un ARNg guide comprenant déjà les séquences du crRNA et du tracrRNA (décrit comme étant plus efficace) (Konstantakos et al. 2022). Malgré ces optimisations, l'efficacité de coupure médiée par les RNP composées des différents ARNg était toujours faible ou absente. Etant donné que le logiciel CRISPOR prédit ces 5 ARNg comme moyennement efficaces, mais également en raison de l'absence d'édition par Base Editing, la région cible pour cette mutation semble être particulière et ne pas pouvoir être éditée facilement.

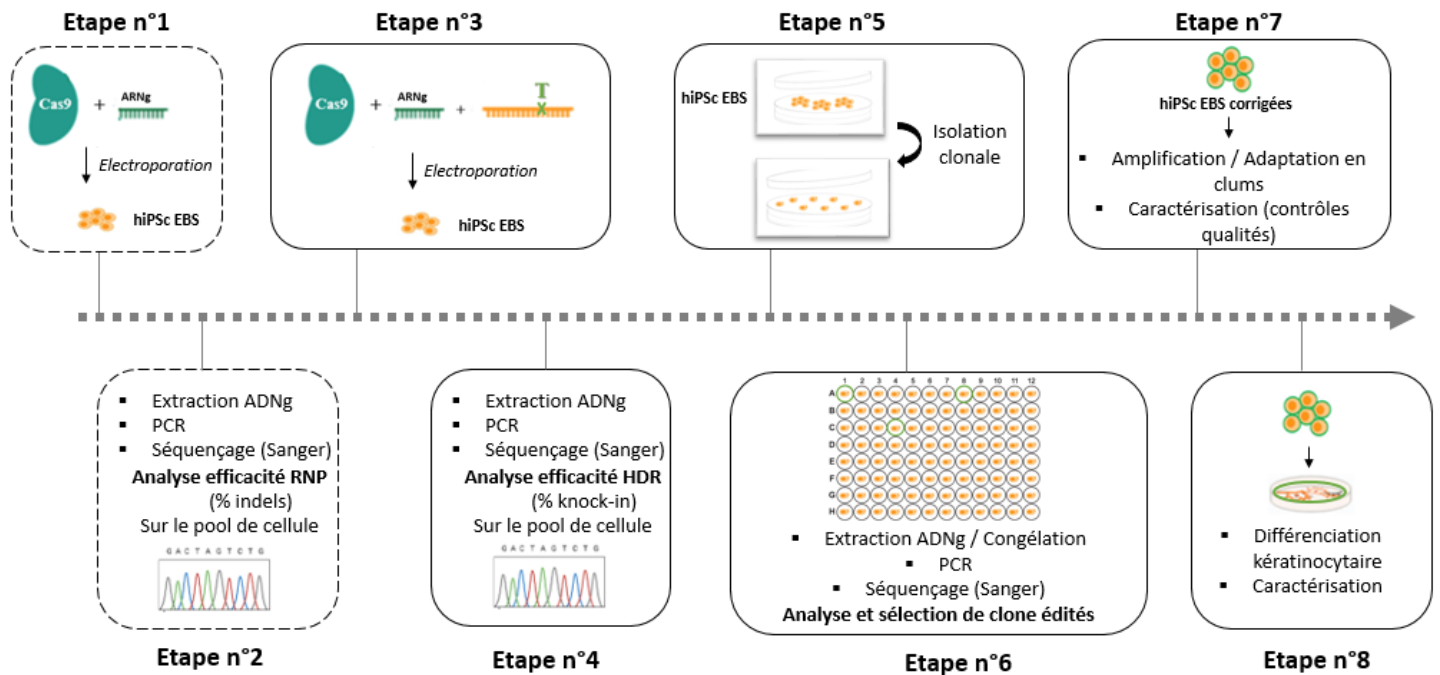
De ce fait, pour la suite de notre étude, nous avons donc sélectionné une autre lignée d'hiPSc EBS porteuse d'une mutation différente et donc dans une région différente du gène *KRT5*, que la lignée utilisée jusqu'ici.



## B. Génération de la lignée isogénique, à partir de la lignée d'hiPSc EBS-2

Afin de générer une lignée isogénique, nous avons sélectionné par la suite, la lignée d'hiPSc EBS-2 porteuse de la mutation c.536T>C au sein de l'exon 1 du gène *KRT5*.

Pour ce faire, cela a nécessité différentes étapes qui sont schématisées dans la figure 4.



**Figure 4** : Schéma expérimental des différentes étapes de la stratégie CRISPR/Cas9 médiée par recombinaison homologue, menant à l'obtention d'hiPSc EBS-2 corrigées

**Etape n°1** : L'ARNg est complexé *in vitro* à la protéine Cas9, formant la RNP qui est électroporée dans les hiPSc EBS-2. **Etape n°2** : L'ADNg génomique est extrait du pool de cellules électroporées, puis la région d'intérêt est amplifiée par PCR et séquencée pour analyser l'efficacité de la RNP à générer des cassures double brin (reflétée par la présence d'indels au niveau du site de coupure). **Etape n°3** : Si la RNP a permis d'obtenir une bonne efficacité de cassure double brin à l'issue de l'étape n°2, les hiPSc sont maintenant électroporées avec la RNP et la matrice de réparation contenant le nucléotide à modifier. **Etape n°4** : Après extraction d'ADNg du pool de cellules, une PCR de la zone d'intérêt et un séquençage sont effectués, afin d'évaluer l'efficacité globale d'édition génique médiée par recombinaison homologue. **Etape n°5** : Le pool de cellules est ensemencé en dilution limite pour permettre l'isolation de clones. **Etape n°6** : Pour chaque clone obtenu, l'ADNg est extrait, afin d'effectuer une PCR et une analyse par séquençage afin de sélectionner les clones édité. **Etape n°7** : Les clones d'hiPSc EBS-2 édité sont amplifiés et caractérisés. **Etape n°8** : Les clones d'hiPSc EBS-2 édité sont différenciés en kératinocytes et la population cellulaire obtenue est caractérisée.

## 1. Test de l'efficacité de la RNP

Comme décrit précédemment (I.A.2) la première étape a consisté à désigner un ARNg prédit comme efficace et spécifique de la région du gène *KRT5* où est localisée la mutation, à l'aide de l'outil CRISPOR, et d'évaluer l'efficacité de la RNP formée par celui-ci et la protéine Cas9 à générer une cassure double brin. Pour cela les hiPSc-EBS-2 ont été électroporées avec la RNP (Cas9 + ARNg) formée préalablement *in vitro* (figure 4, étape n°1). 48h après, l'ADNg a été extrait du pool de cellules électroporées, et une PCR a été effectuée pour amplifier la zone d'intérêt, qui a ensuite été séquencée (figure 4, étape n°2). La comparaison des chromatogrammes obtenus à partir des hiPSc EBS-2 non électroporées ou électroporées avec la RNP montre au niveau du site de coupure une succession de pics suggérant de nombreuses séquences différentes témoignant de la présence d'indels, montrant donc une efficacité d'édition importante due à une cassure double brin. A l'aide d'outil d'analyse de données CRISPR « Synthego » (<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis>), le pourcentage de cellules éditées dans le pool de cellules a été estimé à 56% (figure 5).



**Figure 5 : Analyse du taux d'efficacité de cassures double brin (% indels) sur le pool d'hiPSc EBS-2 électroporées par la RNP**

Les chromatogrammes correspondant à la séquence d'intérêt amplifiée par PCR, à partir d'ADNg d'hiPSc EBS-2 non électroporées avec la RNP (condition hiPSc EBS-2 NT) ou avec (Condition hiPSc EBS-2 + RNP (ARNg+Cas9)) ont été alignés. La séquence de l'ARNg est indiquée en noir et le PAM en rouge. Le pourcentage d'indels est de 56% dans le pool d'hiPSc EBS-2 électroporées.

## 2. Edition génique

Pour effectuer l'édition du génome, l'apport d'une matrice d'ADN d'intérêt (matrice de réparation) est nécessaire en plus de la RNP pour permettre le mécanisme de réparation dirigée par homologie (HDR). Cette matrice de réparation contient la séquence corrigée à introduire, et est bordée de séquences homologues (bras d'homologie) à la séquence cible et plus précisément aux régions entourant la coupure double double brin qui a été générée. Après électroporation de la matrice de réparation et la RNP dans les hiPSc EBS, une cassure double brin est générée puis une réparation par recombinaison homologue a lieu, ce qui permet ainsi un échange entre l'ADN cible et la matrice de réparation, conduisant à l'intégration de la séquence d'intérêt au niveau du site de coupure et donc à la correction de la mutation (figure 6A).

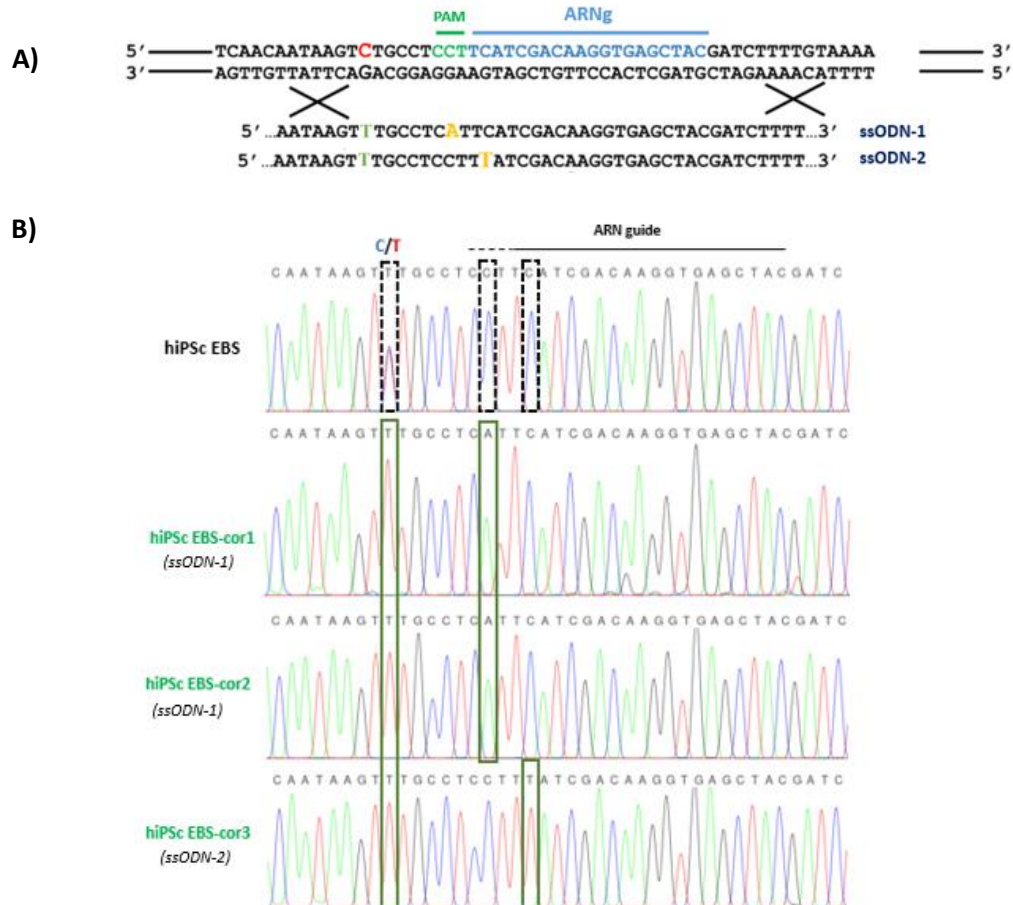
L'utilisation de matrice de réparation d'ADN simple brin a été décrite comme permettant une édition plus fiable, avec moins d'intégrations non spécifiques et une toxicité inférieure comparée aux modèles donateurs d'ADN double brin (Okamoto et al. 2019). De plus la taille des bras d'homologie a été décrite comme étant un critère jouant sur l'efficacité d'édition par HDR (Schubert et al. 2021 ; Y. Yu et al. 2020). De ce fait, nous avons généré deux modèles de réparation simple brin (ssODN) (figure 6A), contenant le nucléotide T pour la correction de la mutation c.536 T>C, qui possèdent des bras d'homologies de 90 nucléotides à droite et 40 nucléotides à gauche. De plus une mutation silencieuse a été introduite au sein de ces ssODN, (en position 2 du PAM pour la matrice ssODN-1 et deux nucléotide en amont du PAM (dans la séquence reconnue par l'ARNg) pour la matrice ssODN-2) (figure 6A), afin d'éviter une coupure double brin ultérieure qui serait médiée par la RNP persistante au sein de la cellule après correction génique par HDR.

Les hiPSc EBS-2 ont été électroporées avec la RNP (Cas9+ARNg) et la matrice ssODN-1 ou ssODN-2 (figure 4, étape n°3). L'analyse par séquençage de la région d'intérêt (figure 4, étape n°4) a permis de montrer une efficacité d'édition par recombinaison homologue, qui a été estimée par l'outil « Synthego » (<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis>), à 7% et 25% dans les pools de cellules électroporées avec les matrices ssODN1 et ssODN2 respectivement (données non montrées).

Ces 2 pools de cellules ont ensuite été ensemencés en dilution limite à différentes densités dans le but d'obtenir un nombre important de clones isolés et non chevauchants (figure 4, étape n°5). Plus d'une centaine de clones provenant de chacun des pools de cellules ont été obtenus et analysés par séquençage au niveau de la zone d'intérêt (figure 4, étape n°6), nous permettant d'obtenir trois clones d'hiPSc EBS-2 édités (présence de la correction de la mutation mais également de la mutation

silencieuse) (figure 4B) : deux provenant du pool de cellules électroporées avec ssODN-1 et un provenant du pool de cellules électroporées avec ssODN-2.

Ces trois clones d'hiPSc EBS corrigées ont ensuite subi des passages successifs en culture, pour être amplifiés afin d'obtenir une banque suffisante d'hiPSc EBS corrigées pour la suite de l'étude (figure 4, étape n°7).



**Figure 4 : Génération d'une lignée d'hiPSc isogénique à partir de hiPSc de patients EBS-2 (*KRT5*) en utilisant la technologie CRISPR/Cas9**

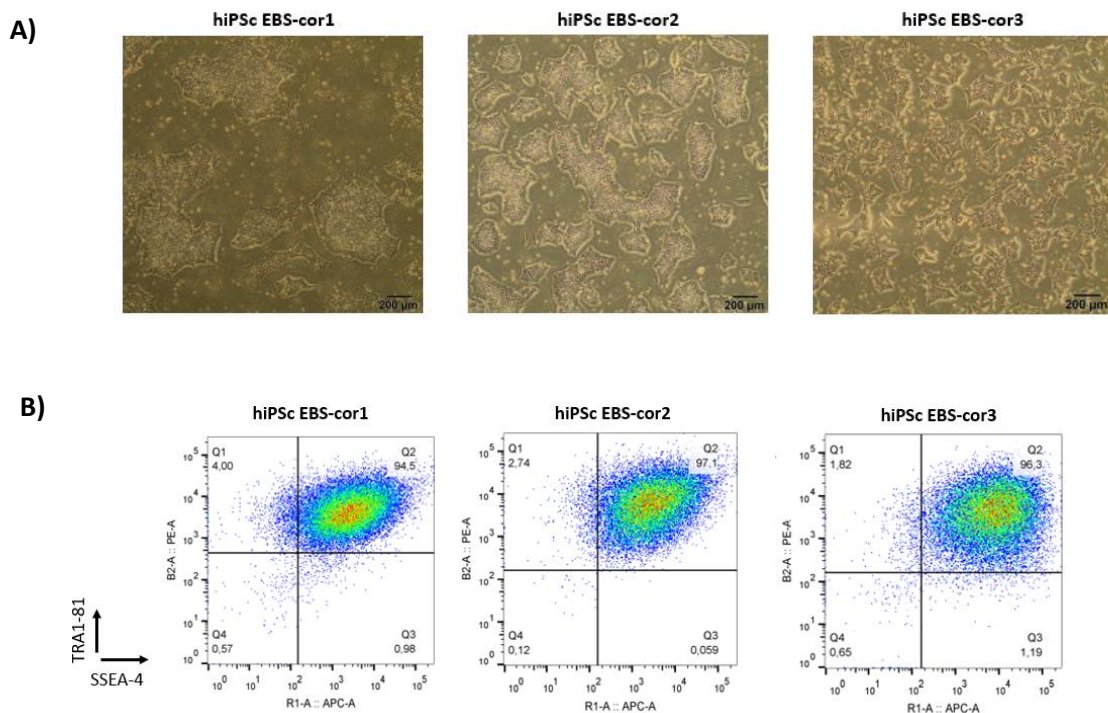
**(A)** Stratégie de correction des cellules hiPSc dérivées de patients EBS-2 *KRT5* (c.536 T>C). La mutation c.536T>C est représentée en rouge. La séquence cible de l'ARN guide et le motif adjacent au protospacer (PAM) sont représentés respectivement en bleu et en vert. Les matrices de réparation ssODN-1 et ssODN-2 contiennent le nucléotide "T" corrigé entouré des bras d'homologie gauche et droit et une mutation silencieuse (représentée en jaune) au niveau du PAM pour éviter une coupure double brin ultérieure qui serait médiée par la RNP persistante au sein de la cellule après correction génique par HDR. **(B)** Chromatogrammes de séquençage de l'ADN génomique extrait de la lignée hiPSc EBS-2 utilisée pour l'édition du génome et de trois clones édités (hiPSc EBS-Cor1, hiPSc EBS-Cor2, hiPSc EBS-Cor3) dans lesquels la mutation c.536T>C a été corrigée. (ssODN : oligodéoxynucléotide simple brin)

### 3. Caractérisation des clones édités

A l'issue de l'obtention de ces lignées d'hiPSc EBS corrigées, et en raison de l'édition du génome et des différents passages qu'ont subi ces cellules, différents contrôles qualités ont été effectués (figure 4, étape n°7), notamment pour vérifier l'intégrité génomique et le maintien de la pluripotence.

Ces hiPSc EBS corrigées ont été observées au microscope à contraste de phase. Leur morphologie s'est révélée être normale (figure 5A), avec des clones de cellules compactes et la présence de bords clairs, typique des cultures d'hiPSc observées habituellement.

Par la suite, les cellules ont été décollées à l'accutase, fixées et les marqueurs de pluripotence (TRA1-81 et SSEA-4) ont été analysés par cytométrie en flux. Plus de 90% des cellules étaient positives pour TRA1-81 et SSEA-4, signifiant que les hiPSc EBS corrigées ont conservé leur propriété de pluripotence (figure 5B).



**Figure 5 : Caractérisation des lignées d'hiPSc EBS corrigées**

**(A)** Images représentatives à contraste de phase des lignées hiPSc EBS corrigées. (Barre d'échelle 200µm). **(B)** Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs de pluripotence TRA1-81 et SSEA-4 dans les 3 clones d'hiPSc EBS corrigées.

De plus, l'intégrité génomique a été vérifiée par génotypage des polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphisms, SNP) à partir d'ADNg de chacun de ces hiPSc EBS-2 corrigées indiquant aucune anomalie (figure 6).



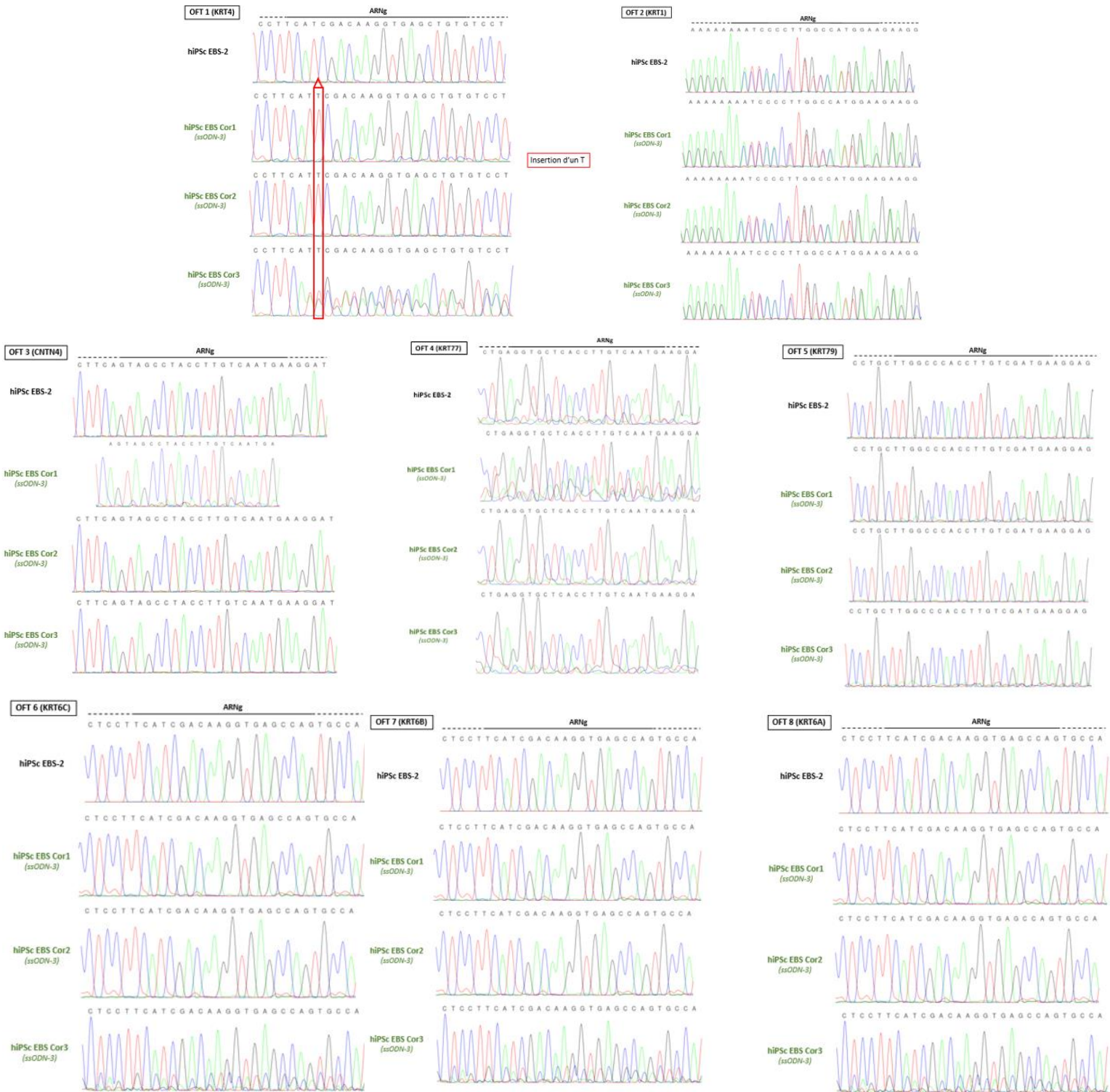
**Figure 6 : Analyse du caryotype et du génotypage des SNP**

L'analyse du génotypage de SNP a été effectuée à partir d'ADNg des 3 lignées d'hiPSc EBS corrigées (EBS-cor1, EBS-cor2, EBS-cor3).

Enfin, lors de l'utilisation de l'approche d'édition génique par la technologie CRISPR/Cas9, l'ARNg reconnaît spécifiquement la région d'intérêt. Cependant, celui-ci peut également avoir de fortes homologies pour d'autres régions génomiques non ciblées, pouvant conduire à des événements d'édition de ces régions hors cibles. En effet, l'hybridation de l'ARNg sur ces régions homologues et donc par défaut le positionnement de la RNP (Cas9+ARNg), peut induire une coupure double brin et activer le mécanisme de réparation NHEJ conduisant à l'apparition d'indels et donc la génération de mutations non désirées dans le génome. De ce fait, il a donc été nécessaire de vérifier l'absence de coupure hors cibles (off-target : OFT), dans les régions homologues à la séquence reconnue par l'ARNg utilisé pour corriger la mutation au sein du gène *KRT5* dans les hiPSc EBS-2. Pour ce faire, le site CRISPOR qui nous a permis de prédire et désigner l'ARNg, a évalué les huit OFT les plus probables selon le score CFD (Cutting Frequency Determination), un score qui prend en compte le nombre de mismatches, ainsi que leur position dans la séquence et la nature des nucléotides qui diffèrent.

Nous avons donc conçu des amorces permettant d'amplifier par PCR ces régions au sein de l'ADNg de chacun des clones d'hiPSc EBS-2 corrigées et d'hiPSc EBS-2 non corrigées (lignée parentale), puis un séquençage a été réalisé. Les séquences obtenues pour les clones édités ont été comparées aux séquences obtenues pour la lignée parentale, afin de s'assurer qu'aucune édition hors cible n'ait eu lieu.

L'alignement des séquences obtenues pour le OFT « *KRT4* » pour les 3 clones corrigés à la séquence obtenue pour la lignée parentale, a montré l'insertion d'une thymine au niveau du site de coupure pour les 3 clones (figure 7). La présence de cette mutation dans le gène *KRT4* signifie qu'il y a eu édition génique sur ce locus *KRT4* non ciblé. Cette modification génique survient à la fin du premier exon et conduit ainsi à un codon stop prématuré 452 nucléotides après l'ATG et donc à une protéine tronquée. Les alignements de séquences, pour les 7 autres régions OFT, respectivement *KRT1*, *CNTN4*, *KRT77*, *KRT79*, *KRT6C*, *KRT6B* et *KRT6A*, n'ont pas mis en évidence d'édition génique au sein des 3 clones d'hiPSc EBS-2 corrigées obtenus (figure 7).



**Figure 7 : Analyse des Off-targets induits par la technologie CRISPR/Cas9, dans les hiPsc EBS corrigées**

Séquençage des 8 régions hors cibles les plus probables à partir de la lignée d’hiPsc EBS parentale (hiPsc EBS-2) et des 3 lignées d’hiPsc EBS corrigées (hiPsc EBS-2 Cor1, Cor2 et Cor3). L’encadré en rouge sur le OFT1 indique l’insertion d’un T dans les 3 lignées d’hiPsc EBS corrigées.



A l'issue de l'analyse de OFT, nous avons fait le choix de re décongeler les pools de cellules d'hiPSc EBS-2 éditées, afin de mettre en évidence un ou plusieurs clones corrigés mais sans édition hors cible au sein du gène *KRT4*. Suite à l'obtention d'une centaine de clones de nouveau, après analyse par séquençage de ceux-ci, nous avons obtenu 8 nouveaux clones pour lesquels la mutation a été corrigée. Cependant, après analyse, nous avons observé que tous les clones étaient édités au sein du gène *KRT4* (données non montrées).

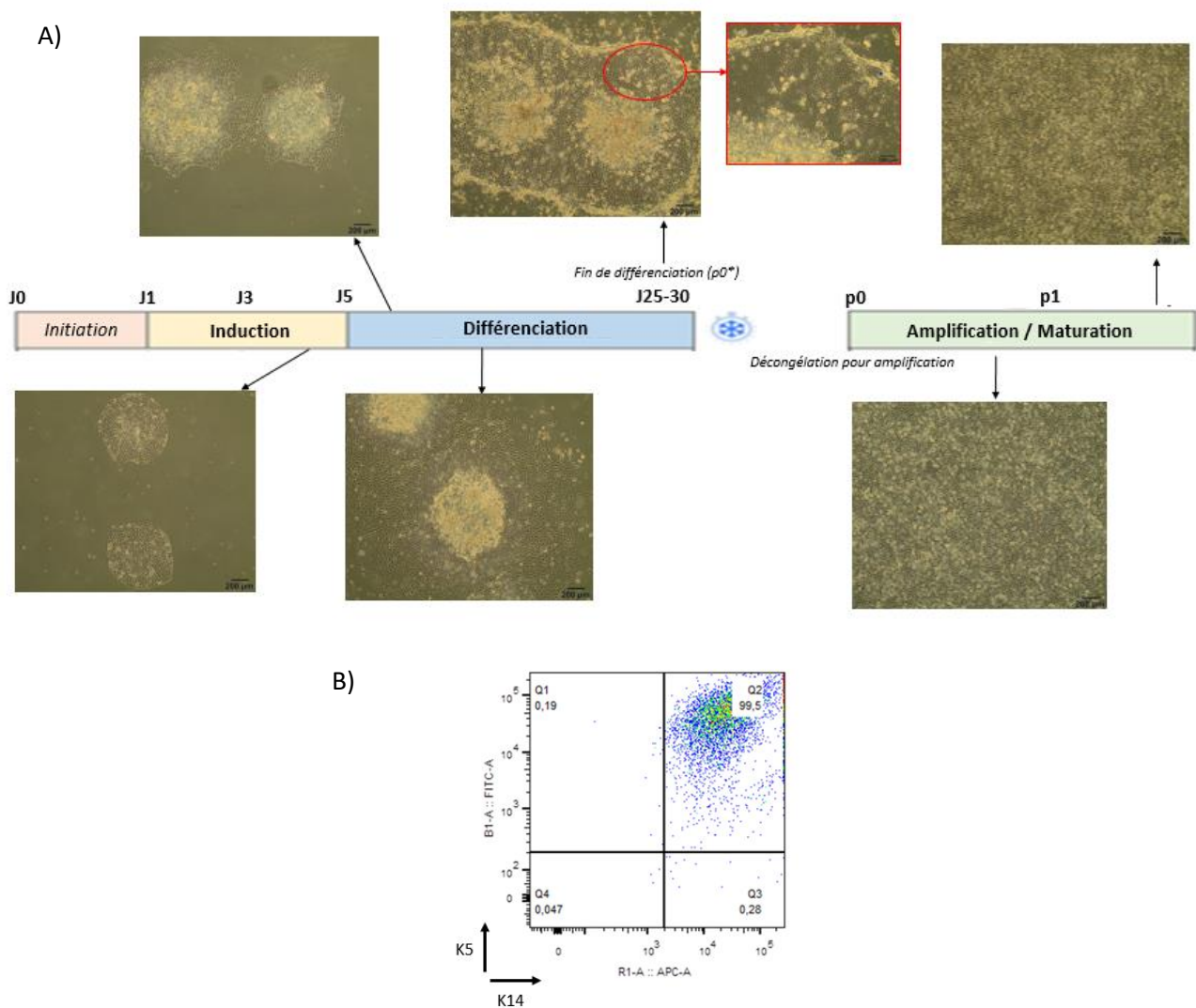
Néanmoins, la kératine 4 codée par le gène *KRT4*, majoritairement exprimée dans l'œsophage et le tube digestif proximal, n'est pas exprimée dans les cellules de l'épiderme basal (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3851>). De plus, des résultats d'analyses transcriptomiques et protéomiques effectués en interne nous ont permis de vérifier que la kératine 4 n'est pas exprimée dans les kératinocytes basaux, type cellulaire utilisé dans notre étude. Par conséquent, il a été décidé de poursuivre le projet avec cette lignée malgré la présence de ce OFT.

#### 4. Différenciation kératinocytaire à partir des lignées d'hiPSc EBS corrigées

Initialement, les lignées d'hiPSc EBS-2 corrigées qui ont été obtenues, et caractérisées, sont cultivées et amplifiées en cellules uniques, via différents passages à l'acutase. Cependant, afin de pouvoir différencier ces cellules en kératinocytes selon le protocole décrit par l'équipe d'Itoh (Itoh et al. 2011) et utilisé dans notre équipe au laboratoire (Coutier et al. 2022), les hiPSc doivent être passées manuellement sous forme de clumps (morceaux de colonies) qui sont obtenus par découpage des colonies à l'aiguille. Les hiPSc ont donc dû être adaptées pour être cultivées en clumps, puis caractérisées. Il a ainsi été montré que les hiPSc EBS corrigées présentaient une morphologie normale, qu'elles exprimaient à plus de 90% les marqueurs de pluripotence TRA1-81 et SSEA-4 ; de plus la stérilité et l'analyse du génotypage se sont également avérées correctes (données non montrées).

Ces 3 lignées d'hiPSc EBS corrigées ont donc été lancées en différenciation kératinocytaire (figure 4, étape n°8), selon le protocole qui consiste en (1) une **étape de différenciation** de 20-30 jours (avec l'ajout aux jours 1 et 3 d'acide rétinoïque (RA) permettant d'induire le tissu ectodermique et de la protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) qui inhibe la spécification neuronale) à l'issue de laquelle les cellules obtenues sont récupérées et congelées (stade p0\*) afin de permettre d'éliminer des contaminants cellulaires autres que des kératinocytes lors de la décongélation (2) puis **une étape d'amplification**, où les kératinocytes obtenus sont décongelés (stade p0) puis passés pour être amplifiés (stade p1) dans un milieu permettant la maturation des kératinocytes dérivés d'hiPSc.

Seule une des lignées d'hiPSc EBS-cor (cor1) parmi les trois, a montré au cours de l'étape de différenciation ce qui est observé habituellement avec l'utilisation de lignées d'hiPSc EBS ou d'hiPSc WT, c'est-à-dire un grossissement des colonies et l'apparition de cellules sortant de celles-ci, ayant une apparence pavimenteuse avec l'apparition de noyaux blancs, quelques jours avant la sortie de différenciation (figure 8A). Les deux autres lignées, hiPSc EBS-cor2 et cor3 ne se sont pas différenciées correctement et n'ont donc pas été utilisées pour la suite.



**Figure 8** : Evaluation de la différenciation kératinocytaire à partir d'hiPSc-EBScor

(A) Images représentatives à contraste de phase de la lignée d'hiPSc-EBScor à différents temps au cours de la différenciation kératinocytaire (Barre d'échelle 200µm). L'apparition de noyaux blancs a lieu en fin de différenciation, et sont observables dans l'image encadrée en rouge (Barre d'échelle 100µm). (B) Analyse par cytométrie en flux de l'expression des protéines K5 et K14 dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc-EBScor, après le premier passage au cours de l'étape d'amplification (p1) (n=1).

Au cours de l'étape d'amplification les hiPSc EBS-cor1 obtenues présentaient une morphologie de type pavimenteuse, similaire à celle observée dans des cultures de kératinocytes primaires. De plus l'expression des marqueurs des kératinocytes basaux épidermiques (K5 et K14) a été analysée par cytométrie en flux, après un passage en culture (p1), montrant un pourcentage K5/K14 supérieur à 90% (figure 8B).

Par souci de clarté, la lignée d'hiPSc EBS corrigée 1 sera nommée hiPsc-EBScor par la suite ; de plus, la lignée de kératinocytes obtenue à partir de ces hiPSc-EBScor1 sera nommée « K-EBS corrigée ».

En conclusion, cette lignée corrigée constitue une population homogène de kératinocytes matures et sera donc utilisée pour la suite du projet, en plus des lignées K-WT et K-EBS (déjà utilisées dans l'étude qui a été publiée et décrite précédemment), afin d'analyser si la correction de la mutation permet une restauration des phénotypes pathologiques, notamment de la composante inflammatoire qui sera détaillée en « Partie 3 » des résultats de ce manuscrit.

## **Partie 3 :**

### **« Etude du phénotype cytokinique pro-inflammatoire dans l'EBS »**

#### **Contexte :**

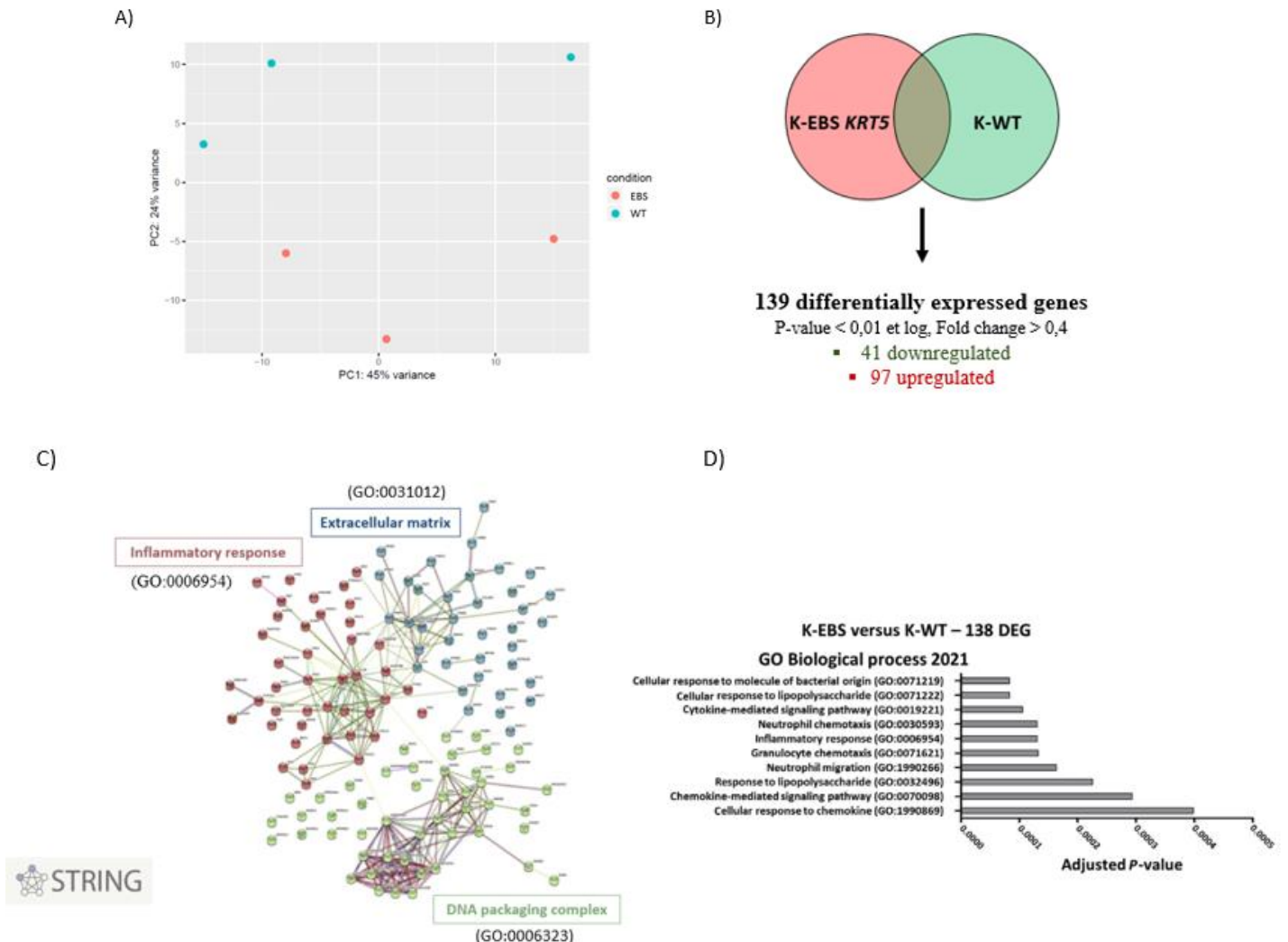
Pour approfondir la caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents aux mutations au sein du gène *KRT5* dans l'EBS, nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative par RNA-seq à partir de trois lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc WT (K-WT) et de trois lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS mutées au sein du gène *KRT5* (K-EBS).

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (PCA) a été effectuée pour évaluer les similitudes ou différences entre les profils d'expression génique globale (figure 1A). La PCA-1 a révélé une forte hétérogénéité au sein des échantillons, sans montrer de regroupement spécifique des échantillons EBS ou WT entre eux. Cette variabilité peut être partiellement expliquée par le fond génétique différent de chaque lignée cellulaire. Cependant, la PCA-2, qui représente environ 24% de la variabilité des données, a permis d'identifier deux groupes distincts selon leur profil transcriptomique : un groupe contenant les échantillons EBS et un autre contenant les échantillons WT.

Afin d'identifier les gènes modulés dans le contexte d'EBS, nous avons comparé le profil transcriptionnel des lignées d'hiPSc EBS mutées à celui des lignées d'hiPSc WT (témoins) ( $P$  value < 0,01 et  $\log_2$  Fold change > 0,4). Cette analyse a révélé 138 gènes différentiellement exprimés (DEGs) dans les K-EBS par rapport aux K-WT, dont 41 étaient régulés à la baisse et 97 à la hausse (figure 1B) ; toutes les données relatives aux DEGs répertoriées dans l'étude Coutier et al. 2022 (Coutier et al. 2022). Par la suite, nous avons étudié les interactions protéiques parmi les gènes enrichis dans un contexte pathologique en utilisant l'outil STRING (<https://string-db.org/>) permettant une représentation des interactions protéiques connues et prédites. Cela nous a permis de révéler trois clusters hautement liés (figure 1C) contenant des gènes impliqués dans : (1) la réponse inflammatoire, avec des marqueurs tels que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et CXCL10 (cluster 1 ; GO : 0006954), (2) l'organisation de la matrice extracellulaire, avec des gènes tels que l'ELN, SMOC1 et SMOC2 (cluster 2 ; GO : 0031012) et (3) l'organisation des chromosomes et du packaging de l'ADN tels que HS3ST2 et HMGB3 (cluster 3 ; GO : 0006323).

Enfin, l'ensemble des gènes différentiellement exprimés a été soumis à une analyse d'enrichissement d'ontologie à l'aide de l'outil d'analyse informatique « EnrichR » (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)

(figure 1D). Cette analyse nous a permis de montrer un enrichissement majeur de la voie de signalisation médiée par les cytokines (GO : 0019221) ( $P$  ajusté =  $1,05E-4$ ) et également de la réponse inflammatoire (GO : 0006954) ( $P$  ajusté =  $1,31E-4$ ).



**Figure 1 : Analyse des données transcriptomiques obtenues par RNA-Seq comparant les kératinocytes EBS aux kératinocytes WT**

**(A)** Analyse en composante principale (PCA) des données transcriptomiques. Les échantillons EBS et WT sont colorés respectivement en rouge et bleu. **(B)** Diagramme de Venn mettant en évidence 138 gènes différentiellement exprimés, dans les K-EBS par rapport aux K-WT, dont 41 régulés à la baisse et 97 régulés à la hausse ( $P$  value < 0,01 et  $\log_2$  Fold change > 0,4). **(C)** Un regroupement fonctionnel à partir de l'ensemble des gènes différentiellement dérégulés à l'aide de l'outil STRING, a permis de mettre en évidence une implication de ceux-ci dans : la réponse inflammatoire (cluster 1 ; GO : 0006954), l'organisation de la matrice extracellulaire (cluster 2 ; GO : 0031012) et l'organisation des chromosomes et du packaging de l'ADN (cluster 3 ; GO : 0006323). **(D)** Analyse

de l'enrichissement GO (EnrichR ; GO Biological Process, 2021) des DEGs entre K-WT et K-EBS ( $P < 0,01$  et  $\log_2 FC > 0,4$ ). L'enrichissement est classé de la P value la plus faible à la plus élevée. *Adapté de (Coutier et al. 2022)*

En conclusion, ces analyses mettant en évidence la présence d'une composante inflammatoire dans l'EBS, sont en accord avec ce qui est observé chez les patients, à savoir des vésicules cutanées présentant un érythème distinct et des bords migrateurs. De plus, ils sont également cohérents avec plusieurs études ayant rapporté un niveau accru de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum ou dans les fluides de bulles de patients atteints de différents types d'EB (Alexeev et al. 2017 ; Castela et al. 2019). Cela suggère que l'EB pourrait être classée comme une maladie inflammatoire systémique plutôt que comme un trouble limité à la peau. Cette dernière hypothèse est également soutenue par une équipe, qui suggère que les protéines des filaments intermédiaires de kératines sont des régulateurs de l'inflammation et de l'immunité dans la peau (Hobbs, Lessard, and Coulombe 2012). En outre, des résultats encourageants ont été obtenus avec des traitements anti-inflammatoires topiques qui ont montré que la diacéréine, un inhibiteur de l'IL-1 $\beta$ , ou l'apremilast, un inhibiteur de l'AMP cyclique phosphodiesterase-4 et de l'activation Th1/Th17 (traitement approuvé utilisé dans le psoriasis) induisaient une diminution relative du nombre d'ampoules par rapport au placebo ; cependant ces traitements démontrent une efficacité partielle et des limites. Pour l'apremilast, seuls trois patients ont été traités et seuls deux ont montré une diminution de la formation de bulles. Pour la diacéréine, un essai clinique a été mené sur 17 patients ; seuls 60% des patients traités à la diacéréine ont obtenu une réduction de plus de 40% du nombre de vésicules. Ces deux études restent également limitées par l'absence d'une évaluation standardisée de la gravité des lésions.

Ainsi, l'existence d'une composante inflammatoire dans l'EBS est claire. Néanmoins, l'origine de cette inflammation et les conséquences sur la pathologie restent à étudier.

C'est dans ce contexte que s'inclut la dernière partie de mon doctorat, qui va consister à utiliser le nouveau modèle cellulaire que l'on a généré, de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS, pour, dans un premier temps, valider les données transcriptomiques préliminaires publiées dans le papier (Coutier et al. 2022), puis, par la suite, étudier l'implication des cytokines pro-inflammatoires identifiées, dans l'EBS. Enfin, la lignée isogénique générée à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 sera également utilisée afin de confirmer le lien direct entre la mutation au sein du gène *KRT5* et la composante inflammatoire identifiée.

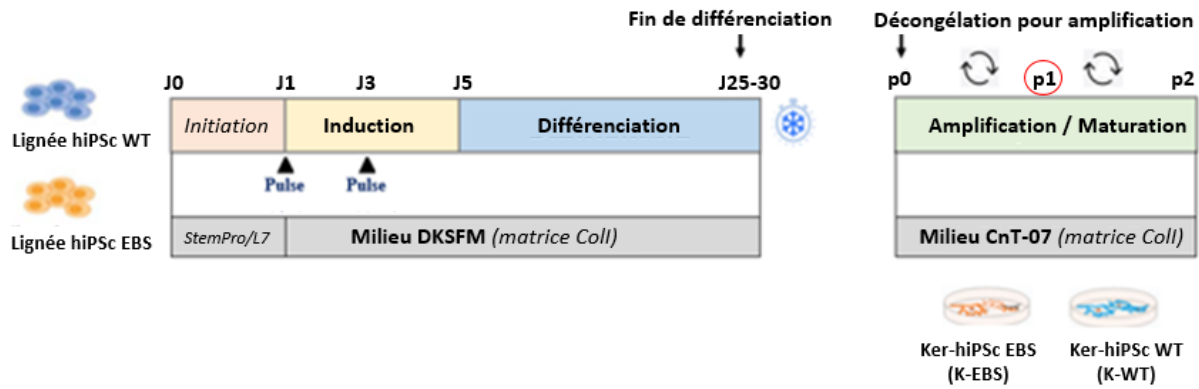
I. **Validation de la dérégulation de l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc cultivés en milieu CnT-07**

Avant d'étudier le rôle des cytokines et chimiokines ayant été décrites comme up-régulées dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS, le premier objectif a été de confirmer l'ensemble des données transcriptomiques obtenues dans notre étude (Coutier et al. 2022), au niveau ARN.

Pour ce faire, nous avons utilisé 4 lignées d'hiPSc parmi celles qui ont été utilisées dans le papier décrit en « partie 1 » du chapitre résultats de ce manuscrit (Coutier et al. 2022), à savoir : deux lignées d'hiPSc WT (WT1 et WT2) et deux lignées d'hiPSc EBS (porteuses de mutations au sein du gène *KRT5*, c.1429G>A ou c.536T>C, qui seront nommées respectivement pour la suite de l'étude EBS-1 et EBS-2).

Ces lignées d'hiPSc WT et EBS ont été différenciées en kératinocytes selon le protocole décrit par Itoh et al. 2011 et utilisé par l'équipe (Coutier et al. 2022) dont les étapes sont les suivantes (figure 2) :

- **Une étape d'initiation**, où les hiPSc sontensemencées en clumps, dans un milieu de culture propice à la prolifération des cellules souches « milieu StemPro »
- Une **étape de différenciation** de 20-30 jours avec l'ajout aux jours 1 et 3 d'acide rétinoïque (RA) et de (BMP4),  dans un milieu de différenciation DKSFM (Defined Keratinocyte-SFM) après laquelle les cellules obtenues sont congelées (stade p0\*) pour permettre d'éliminer les contaminants cellulaires au moment de la décongélation.
- **Une étape d'amplification et de maturation**, où les kératinocytes obtenus sont décongelés (stade p0) puis amplifiés  dans un milieu de culture maturant, le milieu CnT-07, permettant ainsi d'obtenir à l'issue du premier passage (stade p1) des populations de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS WT (K-WT) et EBS (K-EBS) matures et homogènes. Les kératinocytes sont caractérisés et montrent un pourcentage de marqueurs de différenciation de kératinocytes basaux (K5 et K14) supérieur à 70% (données non montrées), suggérant l'obtention de kératinocytes matures.

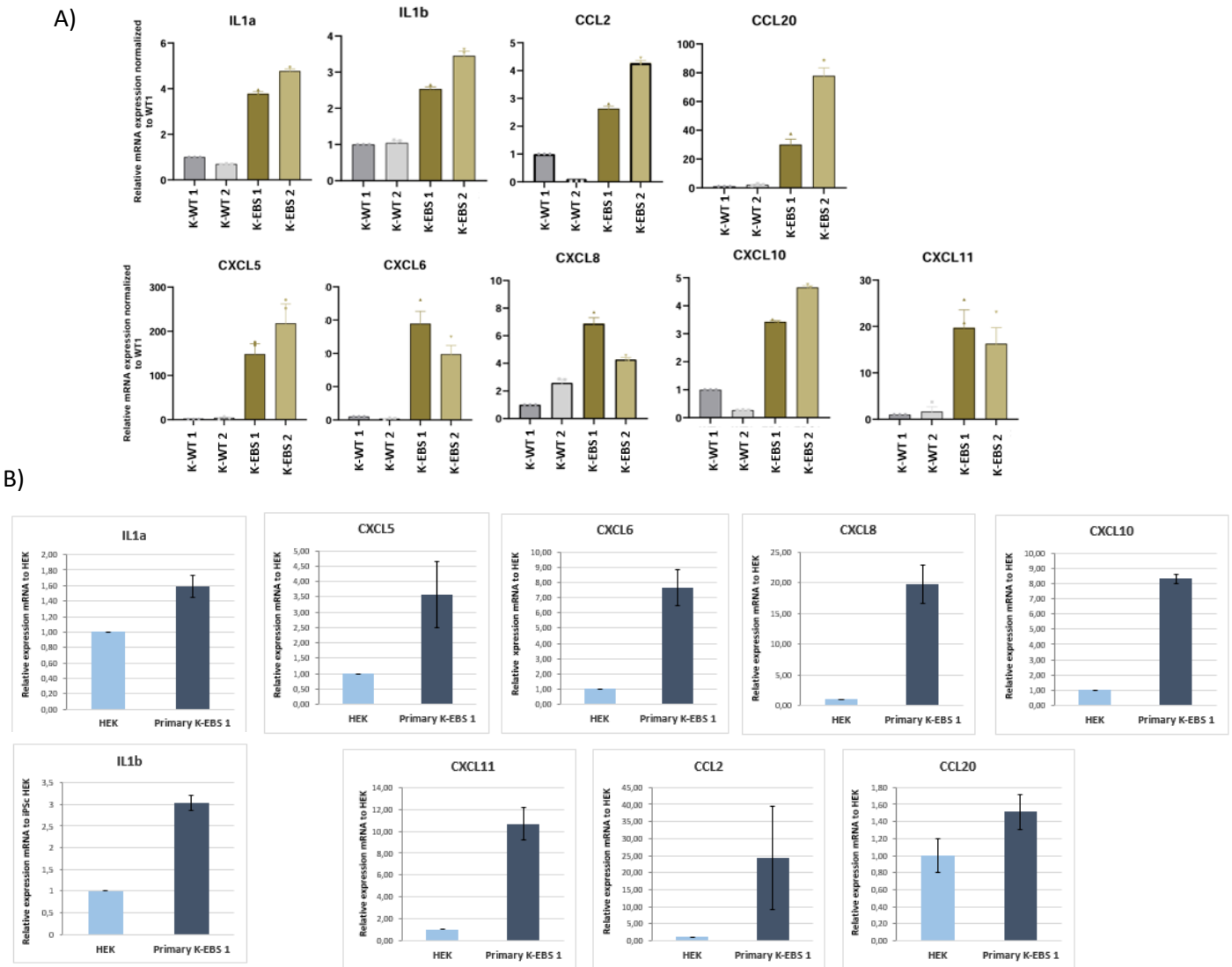


**Figure 2 : Schéma expérimental du protocole de différenciation de kératinocytes à partir d'hiPSc WT et EBS et de leur amplification/maturation**

Les hiPSc WT et EBS sont ensemencées (J0) dans un milieu propice à la culture des cellules souches puis cultivées dans un milieu de différenciation kératinocytaire « DKSFM » de J1 à J25-30 ; un pulse avec l'ajout d'acide rétinol (RA) et de BMP4 est effectué à J1 et J3. Les kératinocytes obtenus sont ensuite congelés puis décongelés dans un milieu de culture kératinocytaire maturant « CnT-07 » pour permettre leur amplification et leur maturation. C'est à l'issue du 1<sup>er</sup> passage (p1) que les K-EBS et K-WT sont utilisés pour les différents tests effectués.

A l'issue du premier passage d'amplification (p1), les populations cellulaires obtenues étant matures, les ARN ont été extraits des K-WT et K-EBS. Ces ARN ont ensuite été analysés par une expérience de RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction), pour étudier l'expression des transcrits mis en évidence dans l'analyse transcriptomique, au sein du cluster lié à la réponse inflammatoire. Une première expérience nous a permis de confirmer une augmentation des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  IL-1 $\beta$ , CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10, CXCL11, CCL2 et CCL20 dans les K-EBS par rapport aux K-WT (figure 3A). La même expérience a également été effectuée en utilisant des kératinocytes primaires humains de patient sain (HEK) et de patient EBS (Primary K-EBS1, qui avaient été utilisés pour générer les hiPSc EBS-1), et nous a également permis de montrer une augmentation de l'expression de ces mêmes transcrits dans la lignée de kératinocytes primaires EBS (figure 3B).





**Figure 3 : Dérégulation de l'expression des transcrits codant les cytokines/chimiokines pro-inflammatoires dans les K-EBS et kératinocytes primaires EBS, en milieu CnT-07**

**(A)** Détection par RT-qPCR de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines dans deux lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc témoins (K-WT 1, K-WT 2) et deux lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS 1 et K-EBS 2). Les niveaux relatifs d'ARNm de CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL8), CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL20, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont normalisés par rapport à l'expression de l'ARN 18S et exprimés par rapport à la valeur obtenue avec les kératinocytes WT1 (n=2). **(B)** Détection par RT-qPCR de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines dans une lignée de kératinocytes primaires sains (HEK) et de kératinocytes primaires EBS (Primary K-EBS1). Les niveaux relatifs d'ARNm de CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL8), CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL20, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont normalisés par rapport à l'expression de l'ARN 18S et exprimés par rapport à la valeur des HEK (n=1).

Ces premiers résultats qui restent préliminaires (non statistiques car réalisés seulement une fois), nous ont tout de même permis de confirmer une up-régulation des transcrits liés à la réponse inflammatoire, identifiés dans l'analyse transcriptomique, dans les K-EBS comparés aux K-WT.

Cependant en raison de problème de milieux de culture, l'expérience précédente n'a pas pu être reproduite. En effet, à cette étape du projet, nous avons été confrontés à un changement de lot du milieu de culture kératinocytaire maturant, le CnT-07, qui a entraîné lors de la culture des K-EBS et K-WT un problème de survie cellulaire, d'amplification et de maturation de ceux-ci (données non montrées).

Il a donc été nécessaire de tester d'autres références de milieux de culture au cours de la phase d'amplification et de maturation des kératinocytes dérivés d'hiPSc.

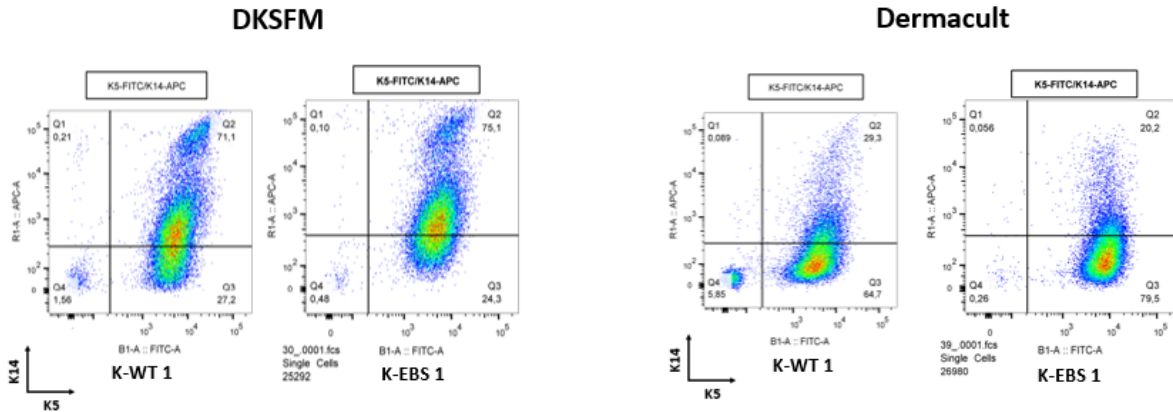
## **II. Problèmes de milieu de culture kératinocytaire**

Afin de permettre la survie cellulaire, l'amplification et la maturation des kératinocytes dérivés d'hiPSc, et de pouvoir ainsi continuer notre étude, nous avons sélectionné huit milieux chez différents fournisseurs étant décrits pour permettre la culture de kératinocytes et ont été testés au cours de **l'étape d'amplification et de maturation : DKSFM et Dermacult**, ainsi qu'Epigro, Epivita Adult, Epivita Neo, Dermalife et KGM-gold et KGM-2. La validation des milieux était basée sur 2 critères : (1) l'évaluation de la maturation des kératinocytes, par analyse de l'expression des marqueurs de kératinocytes basaux la kératine 5 et la kératine 14, par cytométrie en flux (2) la reproduction de phénotypes pathologiques, tels que les défauts de prolifération et de migration cellulaire.

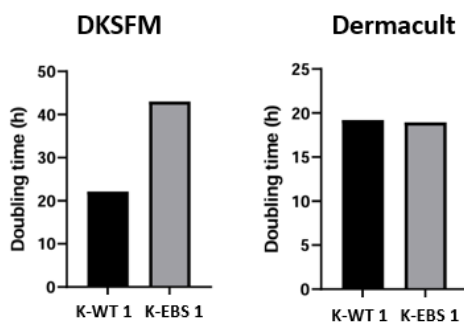
Dans ce but, une lignée de K-WT p0\* (K-WT 1) et une lignée de K-EBS p0\* (K-EBS 1) ont été décongelées, cultivées et amplifiées dans chacun de ces huit milieux jusqu'à p1. A ce stade d'amplification (p1), nous avons observé que les K-WT 1 et K-EBS 1 cultivés en milieu DKSFM exprimaient les marqueurs de kératinocytes basaux K5 et K14 à plus de 70% (figure 3), ce qui était comparable avec ce que l'on obtenait en milieu CnT-07 ; de plus les phénotypes pathologiques étaient reproduits, à savoir une diminution de la prolifération cellulaire et augmentation de la migration cellulaire dans les K-EBS (figure 3). Par contre, en Dermacult, l'expression de ces kératines était inférieure à 30% et les phénotypes pathologiques n'étaient pas reproduits (figure 4). De même, les 6 autres milieux testés ne permettaient pas d'obtenir une population de kératinocytes matures et/ou de reproduire les phénotypes pathologiques (données non montrées). Néanmoins, les K-WT et K-EBS cultivés en milieu DKSFM montrent une prolifération plus lente que ces mêmes kératinocytes cultivés en milieu CnT-07, probablement dû à la différence de composition de milieu (mais qui n'est pas connue).

Enfin, l'ensemble de ces tests ont tout de même montré que le DKSFM est la meilleure alternative pour l'amplification de la maturation des kératinocytes dérivés d'hiPSc, et sera donc utilisé pour la suite de notre projet.

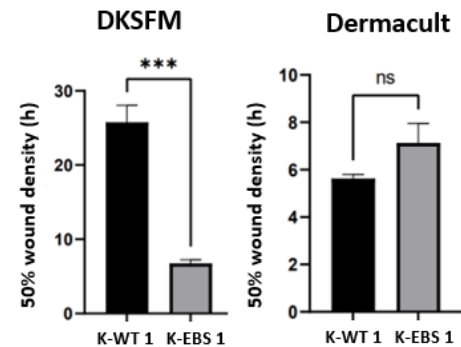
A)



C)



D)



**Figure 4 : Validation d'un nouveau milieu de culture kératinocytaire**

(A) Expression des protéines K5 et K14, analysée par cytométrie en flux, dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc WT (K-WT1) et EBS (K-EBS 1), au passage p1 (n=1) en milieu DKSFM (A) et milieu Dermacult (B) Analyse du temps de doublement (en heures) dans les K-WT et K-EBS (n=1), en milieu DKSFM (à gauche) et en milieu Dermacult (à droite) (n=1). (C) Histogrammes montrant le temps nécessaire pour atteindre 50% de recolonisation de la plaie, suite à un test de plaie (scratch wound) par égratignure réalisé lorsque les cellules étaient à confluence, en milieu DKSFM (à droite) et en milieu Dermacult (à gauche) (n=6). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t non paramétrique de Mann-Whitney ; \*\*\*P < 0,005.

➤ **Expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc cultivés en milieu DKSFM**

L'étape suivante a donc consisté à cultiver une lignée de kératinocytes dérivés d'hiPSc WT (K-WT1) et deux lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS 1 et K-EBS 2) dans le milieu DKSFM jusqu'à p1, pour vérifier l'up-régulation des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires précédemment identifiées. A ce stade les ARN ont été extraits et analysés par RT-qPCR. Cependant, malgré de nombreux tests et optimisations de culture, notamment en jouant sur la confluence des cellules au moment de l'étape de récupération des cellules pour l'extraction de l'ARN, nous n'avons pas ou peu observé d'augmentation de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines identifiées précédemment dans les K-EBS (données non montrées).

Bien que la composition du milieu CnT-07 n'est pas disponible et que nous ne pouvons pas faire de comparaison en terme de composition, il est probable que le milieu DKSFM soit moins riche en terme de molécules diverses, notamment en petites molécules telles que des cytokines ou quelques médiateurs de l'inflammation permettant la mise en évidence de la composante inflammatoire dans nos cellules.

De ce fait, étant donné que des cytokines pro-inflammatoires ont été décrites pour mimer la présence de cellules immunitaires et donc induire des signaux inflammatoires et ainsi la sécrétion de cytokines et chimiokines par les kératinocytes (J. E. Park et al. 2023) nous avons décidé de stimuler les K-WT et K-EBS cultivés en milieu DKSFM avec des cytokines inflammatoires IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ .

➤ **Expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc cultivés en milieu DKSFM et stimulés à l'IFN $\gamma$  ou TNF $\alpha$**

Les mêmes lignées qu'utilisées précédemment, sont alors cultivées en milieu DKSFM. Lorsque les cellules arrivent à confluence, les cellules sont stimulées ou non (NT), avec de l'IFN $\gamma$  (25 ng/ $\mu$ l) ou TNF $\alpha$  (10 ng/ $\mu$ l). 2h et 8h après stimulation, les cellules ont été récupérées afin d'en extraire les ARN et d'effectuer l'analyse par RT-qPCR.

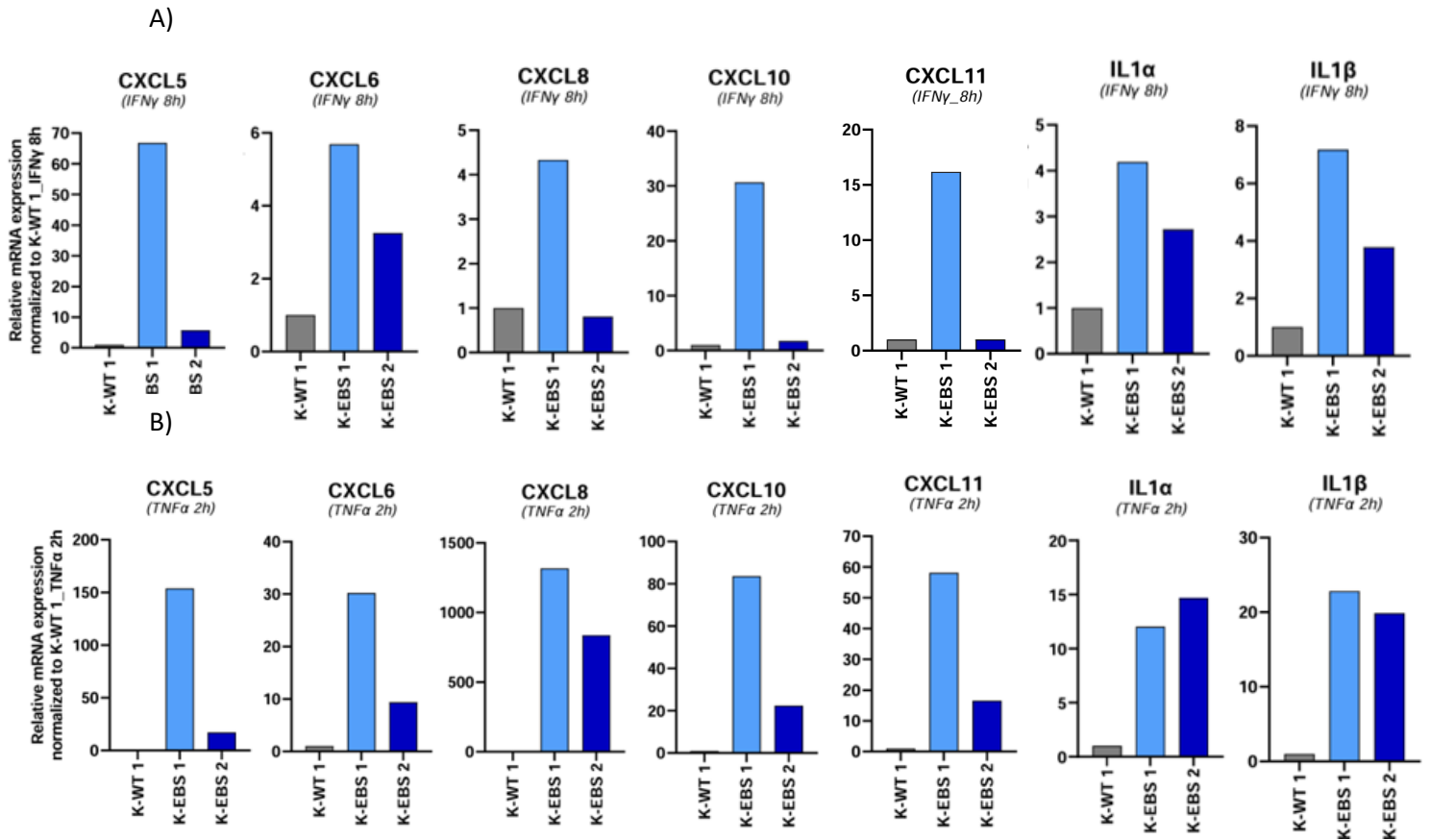
Tout d'abord, les données obtenues à 2h et 8h sont normalisées par rapport aux données obtenues sans stimulations. Les résultats montrent que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  permettent d'induire une augmentation de l'expression des transcrits codant l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 (CXCL8), CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, dans chacune des lignées, indiquant que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  stimulent l'expression de ces cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Par contre, 2h et 8h après stimulation aucune différence n'était

observée pour CCL2 et CCL20 (données non montrées) suggérant que l'expression de celles-ci ne semble pas induite par l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ .

Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous avons vérifié si la stimulation à l'IFN $\gamma$  et au TNF $\alpha$  permettait de mettre en évidence le différentiel d'expression entre la lignée K-WT et les lignées K-EBS.

Pour cela les niveaux d'expression obtenus pour les K-EBS 1 et K-EBS 2 ont été normalisés par rapport à ceux obtenus pour la lignée de K-WT. Concernant la condition où les cellules ont été stimulées à l'IFN $\gamma$  nous observons une augmentation de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires citées précédemment, 8h après stimulation, dans les K-EBS 1 et K-EBS 2 (moins pour cette lignée) comparés aux K-WT (figure 5A). Des résultats similaires sont observés 2h après stimulation, mais la surexpression est moins importante qu'à 8h (non montrés). Lorsque les cellules ont été stimulées au TNF $\alpha$ , nous observons également une augmentation de l'expression de ces transcrits dans les K-EBS (toujours moins pour les K-EBS 2 pour certains des transcrits), avec un pic de surexpression plus tôt, c'est-à-dire 2h après stimulation (figure 5B). Enfin, on peut également observer que la surexpression des différents transcrits est plus importante pour les K-EBS 1 par rapport aux K-EBS 2.

Enfin bien que globalement, la surexpression est plus importante pour les K-EBS 1 par rapport aux K-EBS 2, la stimulation par l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  met en évidence une surexpression des transcrits codant ces cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les K-EBS.



**Figure 5 : Dérégulation de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires en milieu DKFSM après stimulation**

(A) et (B) Détection par RT-qPCR des transcrits des cytokines et chimiokines dans une lignée de kératinocytes dérivés d'hiPSc témoins (K-WT 1) et deux lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS 1 et K-EBS 2), cultivées en milieu DKFSM et stimulées à l'IFN $\gamma$  pendant 8h (A) ou au TNF $\alpha$  pendant 2h (B). Les niveaux relatifs d'ARNm de CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL8), CXCL10, CXCL11, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont normalisés par rapport à l'expression de l'ARN 18S et exprimés par rapport à la valeur des K-WT1 (n=1).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en place des conditions de culture des kératinocytes dérivés d'hiPSc cultivés en milieu DKFSM, nous permettant de confirmer le différentiel d'expressions des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, entre les K-WT et les K-EBS.

Ces résultats préliminaires étaient encourageants, cependant un problème d'approvisionnement de ce milieu DKFSM, durant plusieurs mois, nous a contraint de nouveau à changer de milieu pour la culture des kératinocytes dérivés d'hiPSc au cours de la phase d'amplification et de maturation.

### **III. Validation de la dérégulation de l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc, en milieu CnT-07 bis**

Après différents échanges avec le fournisseur (CeLLnTECH) du milieu de culture kératinocytaire « CnT-07 » initialement utilisé pour l'étape d'amplification et de maturation de nos lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc, nous avons pu, vers la fin de la thèse, obtenir un autre milieu dérivé du CnT-07, dans lequel certaines modifications confidentielles ont été effectuées par le fournisseur suite au problème initial rencontré avec le milieu CnT-07. Celui-ci, nommé « CnT-07 bis » a donc été utilisé pour la suite de l'étude.

#### **A. Au niveau ARN**

Trois lignées de K-WT et trois lignées de K-EBS (deux lignées utilisées jusqu'à maintenant, mutées au sein du gène *KRT5* : K-WT 1 et K-WT 2 ; et une lignée mutée au sein du gène *KRT14* nommée K-EBS 4 *K14*) ont donc été cultivées à l'état basal dans le milieu CnT-07 bis ou après stimulation à l'IFN $\gamma$ . Le niveau d'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires a ensuite été évalué par RT-qPCR.

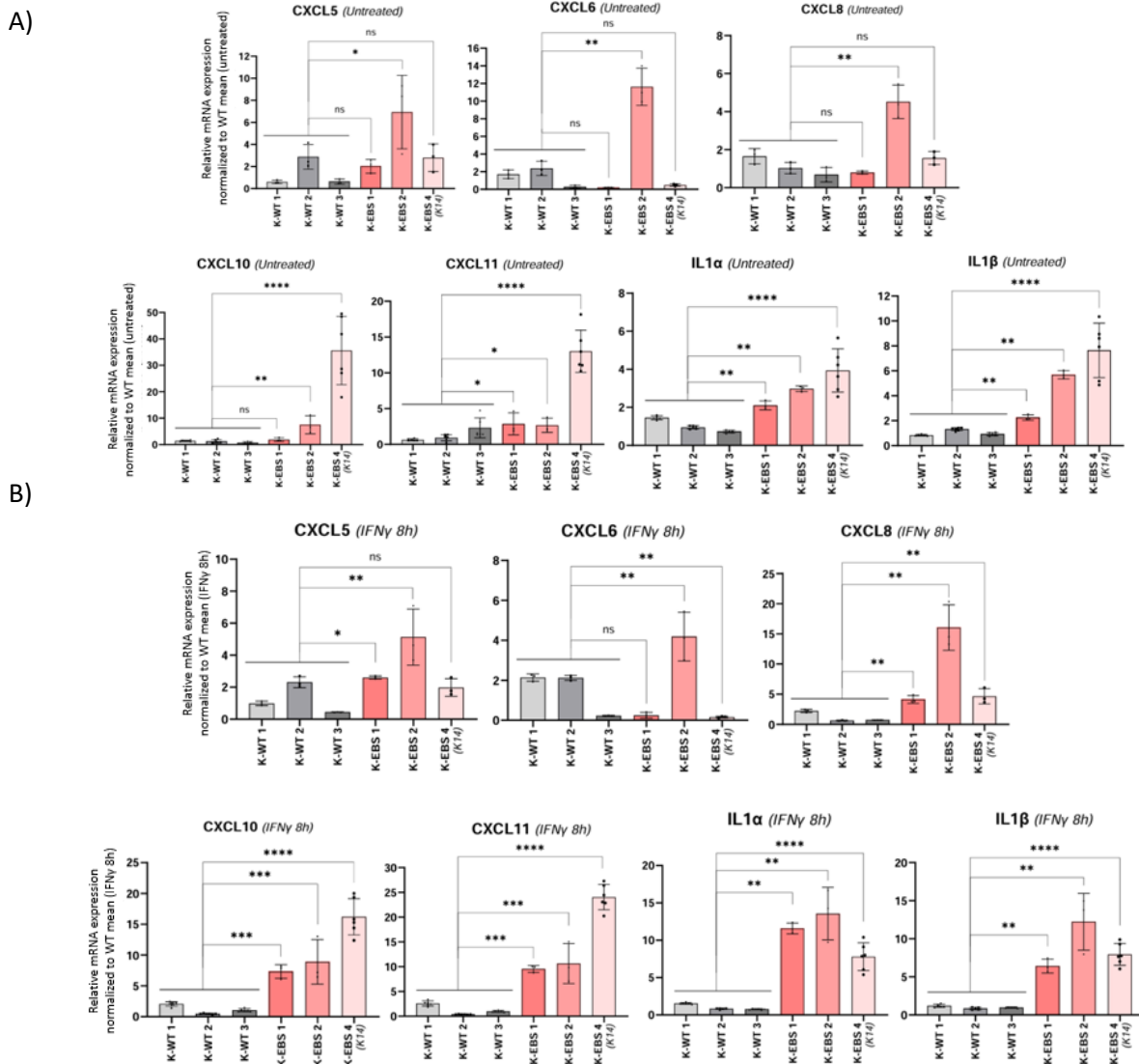
##### **1. A l'état basal**

Dans cette expérience les données obtenues pour les K-EBS ont été normalisées par rapport à la moyenne des 3 lignées de K-WT. Nous avons ainsi pu montrer une augmentation de l'expression des transcrits codant l'IL-1 $\alpha$ , IL-1B, CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10, CXCL11, dans les K-EBS par rapport aux K-WT (figure 6A). Aucune différence n'était observée pour CCL2 et CCL20 (données non montrées). L'utilisation du milieu « CnT-07 bis » nous permet donc de reproduire la surexpression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires à l'état basal, comme initialement en milieu CnT-07.

##### **2. En condition stimulée (à l'IFN $\gamma$ )**

En parallèle, les cellules ont également été cultivées en présence d'IFN $\gamma$  à 25 ng/ $\mu$ l durant 8h pour mimer *in vitro* une composante inflammatoire la plus proche de celle observée chez le patient. Le choix de se concentrer sur l'IFN $\gamma$  par rapport TNF $\alpha$  s'est fait en raison d'études faisant état de taux systémiques importants d'IFN $\gamma$  dans des échantillons de sérums de patients EBS (Annicchiarico et al. 2015). L'analyse par RT-qPCR, dont la normalisation a été effectuée de la même façon que décrite dans l'expérience à l'état basal, nous a permis de montrer une augmentation significative de

l'expression des transcrits codant l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10 et CXCL11 dans les K-EBS par rapport au K-WT (figure 6B), confirmant les résultats obtenus précédemment.



**Figure 6 : Dérégulation de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, en milieu CnT-07-Bis en condition basale et après stimulation**

**(A) et (B)** Détection par RT-qPCR des transcrits des cytokines et chimiokines dans trois lignées de kératinocytes dérivés d'hiPsc témoins (K-WT 1, K-WT 2 et K-WT 3) et deux lignées de kératinocytes dérivés d'hiPsc EBS (K-EBS 1, K-EBS 2 et K-EBS 4 K14), cultivées en milieu CnT-07-Bis, en condition basale (A) et stimulées à l'IFN $\gamma$  (B). Les niveaux relatifs d'ARNm de CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL8), CXCL10, CXCL11, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont normalisés par rapport à l'expression de l'ARN 18S et exprimés par rapport à la moyenne des K-WT (n=3). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t non paramétrique de Mann-Whitney. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,005 et \*\*\*\*P < 0,001 ; ns : non statistique.



En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus « CnT-07 bis », ont permis de confirmer au niveau ARN les données de l'analyse transcriptomique qui avaient été effectuées en milieu CnT-07 à l'état basal, mais également de montrer que le différentiel d'expression de ces cytokines et chimiokines pro-inflammatoires était observable en condition stimulée à l'IFN $\gamma$ . De plus nous avons également pu montrer que cette différence d'expression était également retrouvée dans des cellules mutées au sein du gène *KRT14*.

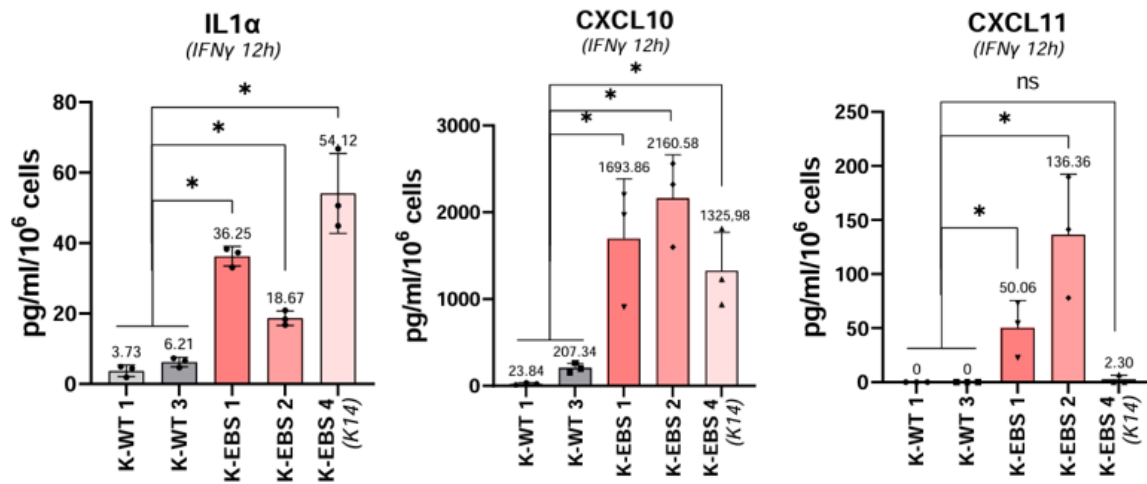
De manière générale, en « CnT-07 bis » les tests statistiques avec un seuil de significativité le plus important entre les K-WT et les K-EBS concernent l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines suivantes : IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL10 et CXCL11 (figure 6).

Sachant que l'implication de l'IL-1 $\beta$  a été démontrée dans de nombreuses études (Lu et al. 2007 ; Wally, Lettner, et al. 2013 ; Annicchiarico et al. 2015 ; Spörrer et al. 2019), mais qu'à contrario, la dérégulation et le rôle de l'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 dans l'EBS sont peu ou pas décrits à ce jour, nous avons fait le choix de s'intéresser préférentiellement à la dérégulation de celles-ci afin d'étudier leur implication dans la pathologie. De plus, les chimiokines CXCL10 et CXCL11 sont directement activées via la voie de l'IFN $\gamma$  ; cela pourrait ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ciblant spécifiquement cette voie afin de restaurer un niveau d'expression de ces chimiokines.

## **B. Au niveau protéique**

L'expérience a donc été reproduite afin de démontrer une surexpression de l'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 au niveau protéique, en condition de stimulation.

Pour ce faire, les surnageants des cultures de deux lignées K-WT (K-WT1 et K-WT3) et de trois lignées K-EBS (K-EBS 1, K-EBS 2, K-EBS 4 *K14*) ayant été cultivées en milieu « Cnt-07-Bis » et stimulées à l'IFN $\gamma$  (25ng/ $\mu$ l), ont été récupérées 12h après stimulation. L'analyse a été effectuée par test ELISA, nous a permis d'observer une augmentation de la sécrétion de l'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 par les K-EBS par rapport aux K-WT (figure 7).



**Figure 7 : Augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 dans les K-EBS après stimulation**

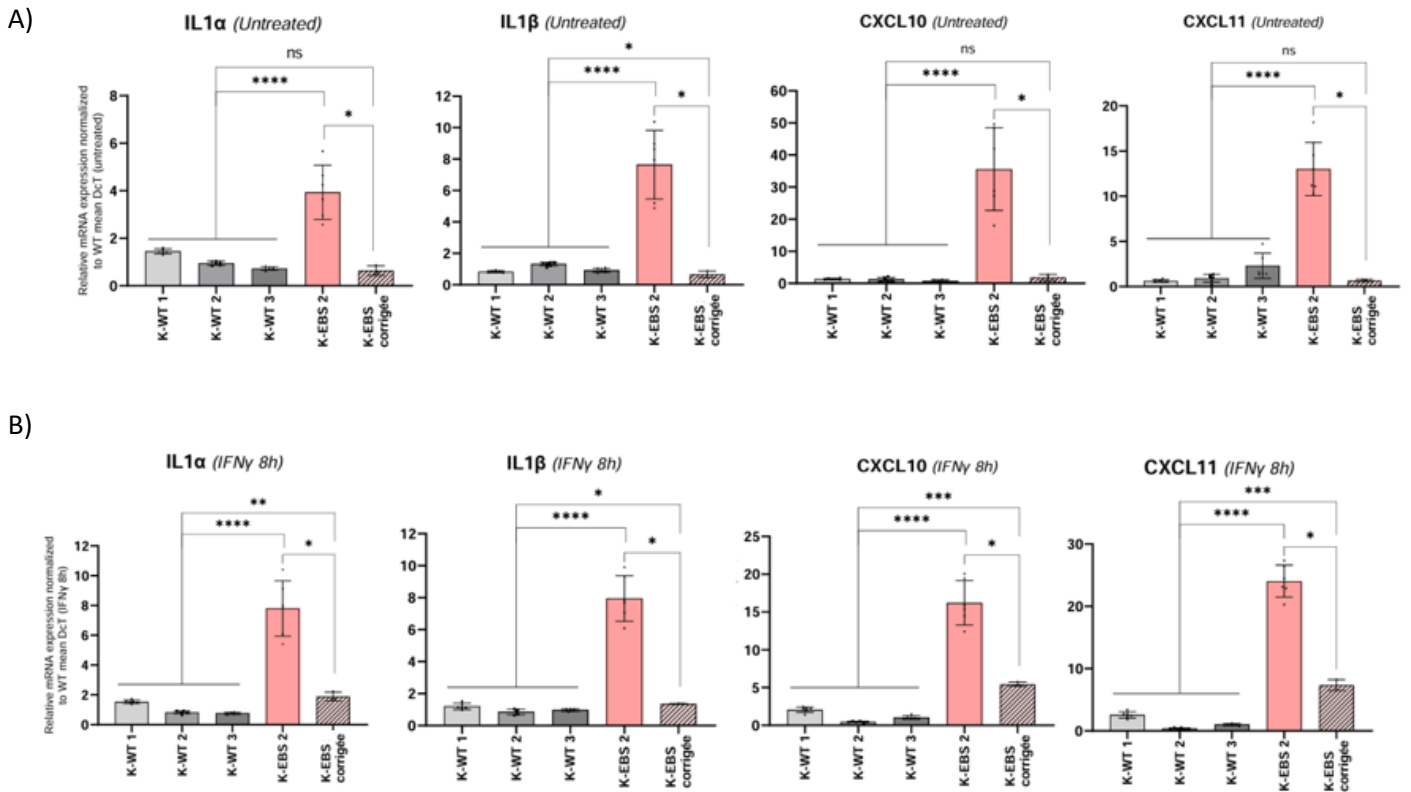
Différence de sécrétion d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10, CXCL11 par les K-WT et K-EBS, mesurée par ELISA. Les surnageant des cultures cellulaires ont été récupérées 12h après stimulation à l'IFN $\gamma$  en milieu CnT-07 bis. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport aux nombre de cellules (pg/ml/10<sup>6</sup> cellules) pour chacune des conditions. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t non paramétrique de Mann-Whitney \*P < 0,05 ; ns : non significatif.

Ces résultats, nous ont donc permis de montrer que les K-EBS sécrètent plus d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 que les K-WT, confirmant ainsi un phénotype inflammatoire dans l'EBS.

#### **IV. Corrélation entre la composante inflammatoire et les mutations au sein du gène *KRT5***

Suite à la validation des données du transcriptome et plus précisément de la dérégulation significative des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL10 et CXCL11 au niveau ARN et protéique, dans les K-EBS, nous avons ensuite utilisé la lignée « K-EBS corrigée » qui a été générée grâce à la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9, afin de corréler spécifiquement la composante inflammatoire mise en évidence, à la mutation au sein du gène *KRT5*.

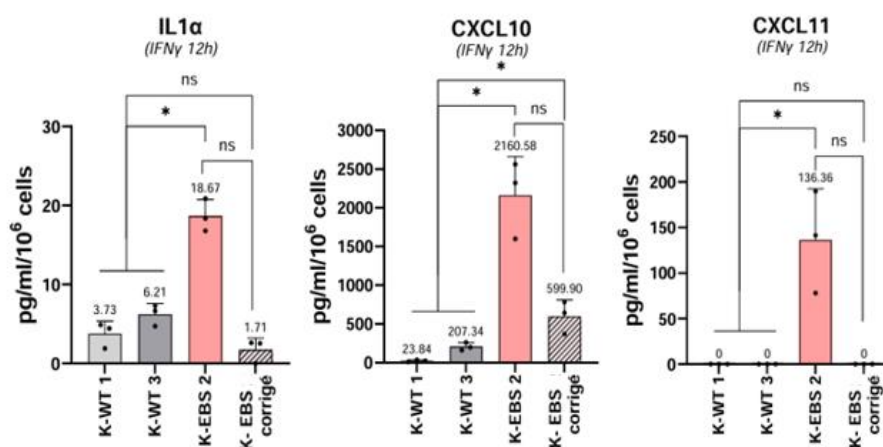
Pour ce faire, trois lignées de K-WT, la lignée K-EBS 2 et la lignée « K-EBS corrigée » ont été cultivées en milieu « CnT-07-Bis », en condition basale ou en condition stimulée à l'IFN $\gamma$  comme décrit précédemment, puis les ARN ont été extraits et l'expression des transcrits a été évaluée par RT-qPCR. Nous observons qu'en condition basale et en condition stimulée (8h après stimulation), les niveaux d'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL10 et CXCL11 étaient significativement diminués dans la lignée « K-EBS corrigée » comparée aux K-EBS 2, et que ces niveaux d'expression se rapprochaient des niveaux d'expression observés dans les trois lignées de K-WT (figure 8).



**Figure 8 : Diminution de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les K-EBS corrigés**

**(A)** et **(B)** Détection par RT-qPCR des transcrits des cytokines et chimiokines dans trois lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc témoins (K-WT 1, K-WT 2 et K-WT 3), d'une lignée de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS-2 (K-EBS 2) et de la lignée de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS cor (K-EBS corrigée), cultivées en milieu CnT-07-Bis, en condition basale (A) ou stimulées à l'IFN $\gamma$  (B). Les niveaux relatifs d'ARNm d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , CXCL10 et CXCL11 sont normalisés par rapport à l'expression de l'ARN 18S et exprimés par rapport à la moyenne des K-WT (n=3). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t non paramétrique de Mann-Whitney pour les comparaisons deux à deux. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,005 et \*\*\*\*P < 0,001.

Les surnageants des cultures cellulaires utilisées pour l'expérience décrite ci-dessus ont également été récupérés et le niveau de sécrétion d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 a été évalué par ELISA (à l'exception de la lignée K-EBS 2 pour laquelle le surnageant n'a pu être récupéré). Nous avons ainsi pu observer un niveau d'expression des cytokines et chimiokines IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 significativement diminué dans la lignée « K-EBS corrigée » comparée aux K-EBS 2, et que ce niveau d'expression se rapprochait des niveaux d'expression observés dans les deux lignées de K-WT (figure 9). Cela nous a permis de montrer que la correction génique permettait de restaurer un niveau d'expression de ces cytokines et chimiokines pro-inflammatoires au niveau protéique.



**Figure 9 : Diminution de la sécrétion d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 dans les K-EBS corrigés après stimulation**

Différence de sécrétion d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10, CXCL11 par les K-WT et K-EBS-2 et « K-EBS corrigé », mesurée par tests ELISA. Les surnageants des cultures cellulaires ont été récupérés 12h après stimulation à l'IFN $\gamma$  en milieu CnT-07 bis. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t non paramétrique de Mann-Whitney pour les comparaisons deux à deux. \*P < 0,05 ; ns : non significatif.

Ces résultats nous ont permis de montrer que la correction génique de la mutation c.536T>C au sein du gène *KRT5* permettait de corriger le niveau d'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires au niveau ARN et protéique.

Cela démontre ainsi clairement un lien entre la mutation au sein du gène *KRT5* et la composante inflammatoire dans l'EBS.

# Matériels et méthodes

- **Cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSc)**

Les fibroblastes dérivés de patients porteurs de mutations au sein du gène *KRT5* ou *KRT14* (mutations listées dans le tableau ci-dessous) ont été achetés à Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ) et les PBMCs EBS et les biopsies cutanées (du patient EBS-1 uniquement) ont été obtenus auprès du Centre de référence des maladies rares de la peau et des muqueuses d'origine génétique (Hôpital Necker, Paris, France) après approbation du comité d'éthique local d'Ile de France (institutional review board 00001072) (CPP2015-03-03/DC2014-2272). Les patients ont donné leur consentement éclairé par écrit (déclaration AC-2013-1973). Les lignées cellulaires ont été reprogrammées en hiPSCs par Phenocell (Grasse, France).

Trois lignées d'hiPSC de contrôle (WT1, WT2 et WT3) ont été fournies par Phenocell.

Patients	Gène affecté	Mutation	
EBS-1	<i>KRT5</i>	c.1429G>A	p.Glu477Lys
EBS-2	<i>KRT5</i>	c.536T>C	p.Phe179Ser
EBS-3	<i>KRT5</i>	c.608T>C	p.Leu203Pro
EBS-4	<i>KRT14</i>	c.373C>T	p.Arg125Cys

- **Culture des hiPSc**

Les hiPSc ont été cultivées en cellules uniques (single cell) dans un milieu StemMACS™ iPS-Brew-XF avec ajout de 10 µM de Rock Inhibitor (Y27632, StemMACS™), sur matrigel (Corning® Matrigel® hESCqualified Matrix), selon les instructions du fournisseur. Le milieu est changé tous les 2 jours et à confluence, les hiPSc sont passées avec de l'acutase (selon les instructions du fournisseur) (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent, ThermoFisher) et réensemencées.

Ces mêmes hiPSc sont cultivées en clumps, avant le lancement de différenciation en kératinocytes, dans un milieu StemPro® (Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec du FGF2 stabilisé à 10 ng/mL (Miltenyi Biotec), sur une matrice L7 à 10 µg/mL (Lonza Bioscience) et passées manuellement (à l'aiguille) toutes les semaines.

Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> à +37 °C.

- **Différenciation kératinocytaire à partir d'hiPSc**

Les hiPSc en clumps sontensemencées en milieu StemPro® supplémenté en FGF2 stabilisé, à 10 ng/mL (Miltenyi Biotec) pendant un jour (J0). Du jour 1 au jour 3, le milieu a été remplacé par du D-KSFM® (defined Keratinocytes Serum-Free Medium, Invitrogen,) supplémenté avec 0,273 nM de BMP-4 (Peprotech, et 1 µM d'acide rétinoïque (Sigma Aldrich). Au jour 6 et jusqu'à la fin de la différenciation, les cellules sont cultivées en milieu D-KSFM® seul. Les cellules différenciées ont été triées par trypsinisation différentielle (0,05% v/v ; Invitrogen) et congelées.

- **Cultures des kératinocytes dérivés d'hiPSc**

- A l'état basal :

Les kératinocytes dérivés d'hiPSc p0\* ont été décongelés dans un milieu CnT-07 (CellnTech) et cultivés sur une matrice de Collagen I, à 10µg/ml (Pepsin Soluble Collagen in 0.01M HCl, Collagen Solutions). Les cellules sont ensuite amplifiées dans ce même milieu, pour atteindre le stade de maturation (les passages sont effectués par trypsinisation des cellules puis celles-ci sont réensemencées). Les tests de milieux au cours de l'étape d'amplification et de maturation ont été effectués dans ces différents milieux : CnT-07 (CellnTech), CnT-07 bis (CellnTech), Defined Keratinocytes SFM (DKSFM) (ThermoFisher), Dermacult (Stemcell), Epigro (Millipore), Epivita Adult (Cell applications), Epivita Neo (Cell applications), Dermalife (Cell systems), KGM-Gold (Lonza), Keratinocyte Growth medium 2 (Promocell).

- En condition stimulée :

Les cellules arrivées à 80% de confluence, cultivées dans les mêmes conditions que citées précédemment, ont ensuite été starvées durant 8h, dans un milieu DMEM/F12 + GlutaMAX™ (1X) (ThermoFischer), puis le milieu a été changé et supplémenté ou non en IFNγ à 25ng/µl (Peprotech-Recombinant Human-IFN-γ \_ 300-02) ou TNFα 10ng/µl (Human TNFα, Peprotech).

- **Prolifération cellulaire**

Les kératinocytes dérivés d'hiPSc ont étéensemencés à 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> et comptés à la lame de Malassez le lendemain de l'ensemencement (J1), puis cinq jours après l'ensemencement (J5). Pour cela les cellules sont marquées au bleu de Trypan (Invitrogen, 15250061). Le temps de doublement est alors déterminé selon la formule suivante :  $T=120/(\log(J5/J1)/\log(2))$ . « T » étant le temps de doublement ; « J5 » étant le nombre de cellules finales ; et « J1 » étant le nombre de cellulesensemencées.

- **Migration cellulaire (Scratch wound)**

Les kératinocytes dérivés d’hiPSc ont étéensemencés à raison de 75 000 cellules/puits dans une plaque ImageLock™ à 96 puits. Après 24 heures, des égratignures ont été faites à l’aide du WoundMaker. Des images des puits entiers ont été prises toutes les 30 minutes pendant 24 heures à l’aide du système d’imagerie des cellules vivantes IncuCyte ZOOM. La densité relative de la plaie a été calculée comme suit : pourcentage de la densité relative de la plaie (t)  $\frac{1}{4} 100 (w[t] - w[0]) / (c[t] - w[0])$ , w(t) étant la densité de la région de la plaie au moment (t) et c(t) étant la densité de la région des cellules au moment (t).

- **Cytométrie en flux**

Un total de 30 000 cellules (hiPSC ou kératinocytes dérivés d’hiPSc) a été analysé avec un appareil MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) et le logiciel Flowjo. Les paramètres d’acquisition ont été établis sur une lignée cellulaire de contrôle et conservés par la suite. Les hiPSC et les kératinocytes dérivés d’hiPSc ont été décollés grâce à de l’acutase (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent, 2310200) et de la TRYPISINE-EDTA (LIFE TECHNOLOGIE), respectivement, fixées et perméabilisées (Biosciences, BD Cytofix). Les cellules sont culottées dans une solution de PBS (Sigma) + BD cytofix 2%, puis incubées avec les anticorps ou leurs isotypes (listés dans le tableau ci-dessous) pendant 30 minutes, à l’abri de la lumière. Le marquage est lavé au PBS seul, puis les cellules sont ensuite analysées au cytomètre.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
Anti-Cytokeratin 5 antibody [EP1601Y] (AF488)	ABCAM	ab193894	1/1000e
Rabbit IgG, monoclonal [EPR25A] - Isotype Control (Alexa Fluor 488)	ABCAM	ab1999091	1/1000e
Anti-Cytokeratin 14 antibody [EP1612Y] (AF647)	ABCAM	ab192056	1/1000e
Rabbit IgG, monoclonal Isotype Control [RbNP15] (Alexa Fluor 647)	eBioscience	51-4616-82	1/400e
TRA1-81 PE-conjugated Antibody [BLE330706] (AF647)	R&D Systems	FAB8495P	1/25e
Isotype Control AF647 IgM k8	Biolegend	401618	1/25e
SSEA-4 Antibody, anti-human, APC, REAfinityPE	Miltenyi Biotec	130-098-347	1/500e
Isotype Control PE Mouse IgG1	Miltenyi Biotec	130-113-462	1/50e



- **Extraction d'ARN et RT-qPCR**

L'ARN a été extrait des cultures cellulaires à l'aide du kit d'extraction RNeasy Mini kit (Qiagen) en utilisant l'appareil QIAcube, selon les recommandations du fournisseur. La concentration d'ARN a été estimée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000™, ThermoFisher Scientific) et la pureté a été mesurée à l'aide des rapports d'absorption 260/280 nm et 260/230 nm. L'ADNc a été synthétisé à l'aide du kit de transcription inverse SuperScript III (Invitrogen) sur le thermocycleur nexus GSX1, selon les recommandations du fournisseur (Eppendorf). L'analyse quantitative par réaction en chaîne de la polymérase (qPCR) a été réalisée à l'aide d'un système QuantStudio 12 K Flex realtime PCR (Applied biosystem) et du Luminaris Probe qPCR Master Mix (ThermoScientific), en suivant les instructions des fabricants. Les données d'expression ont été normalisées par rapport aux gènes de ménage 18S et la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  a été utilisée pour déterminer le niveau d'expression relatif de chaque gène. Les séquences d'amorces sont détaillées dans le tableau suivant :

Primers	Séquences
<b>CXCL5 (Forward)</b>	AGAACGGGAAGGAAATTTGTCTTGAT
<b>CXCL5 (Reverse)</b>	CAGAAAACCTTCTCTGCTGAAGACTG
<b>CXCL6 (Forward)</b>	ACAGAGCTGCGTTGCACT
<b>CXCL6 (Reverse)</b>	CGGGTCCAGACAACTTGCTT
<b>CXCL8 (Forward)</b>	CTCTGGCAGCCTTCCTGAT
<b>CXCL8 (Reverse)</b>	TCCACTCTCAATCACTCTCAGTTCT
<b>CXCL10 (Forward)</b>	AGGAACCTCCAGTCTCAGCA
<b>CXCL10 (Reverse)</b>	TGATGCAGGTACAGCGTACAG
<b>CXCL11 (Forward)</b>	CCTGGGGTAAAAGCAGTGAA
<b>CXCL11 (Reverse)</b>	TGGGATTTAGGCATCGTTGT
<b>CCL2 (Forward)</b>	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC
<b>CCL2 (Reverse)</b>	AGGTGACTGGGGCATTGAT
<b>CCL20 (Forward)</b>	CTGGCTGCTTTGATGTCAGT
<b>CCL20 (Reverse)</b>	CGTGTGAAGCCCACAATAAA
<b>IL-1a (Forward)</b>	TCACGGCTGCTGCATTACAT
<b>IL-1a (Reverse)</b>	GGTCTTCATCTTGGGCAGTCA
<b>IL-1b (Forward)</b>	TGAGCTCGCCAGTGAAATGA
<b>IL-1b (Reverse)</b>	GGTCGGAGATTCGTAGCTGG

- **Tests ELISA**

Les surnageants de culture cellulaire ont été recueillis 12h après stimulation à l'IFN $\gamma$  et les concentrations d'IL-1 $\alpha$ , CXCL10 et CXCL11 ont été estimées par les kit ELISA duo set conformément aux instructions du fabricant R&D Systems (Humain CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA ; Human CXCL11/I-TAC DuoSet ELISA ; Human IL-1 alpha/IL-1F1 DuoSet ELISA). L'absorbance a été lue à 450nm et 540nm, puis une correction a été effectuée par soustraction de la valeur obtenue à 540nm à la valeur obtenue à 450nm. La concentration de chaque échantillon a été calculée selon une courbe standard en réduisant les données à l'aide d'un logiciel informatique capable de générer un ajustement de courbe logistique à quatre paramètres (4-PL).

- **Extraction protéique**

Les hiPSc ont été lysées avec un tampon de lyse RIPA Sigma auquel a été ajoutées des anti-phosphatases (Roche) et des anti-protéases (aminoethyl benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Pepstatine, Leupeptine hemisulfate, Bestatine Hydrochloride, aprotinine), 6h et 22h après électroporation. Les échantillons lysés sont vortexés puis centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm, à 4°C. Le dosage protéique est réalisé à partir des surnageants récoltés, avec le kit Pierce® BCA Protein Assay Kit selon les indications du fournisseur (Thermo-Scientific). L'absorbance des échantillons protéiques à été mesurée à 560 nm avec le lecteur de plaque CLARIOstar® et les données ont été récupérées grâce au logiciel d'analyse MARS (BMG LabTech). La concentration des échantillons protéiques a ensuite été calculée à partir de l'équation de droite de régression qui a été déterminée à partir des données obtenues pour la gamme BSA.

- **PCR**

Les réactions PCR effectuées à partir d'ADN génomique ont été réalisées avec un Mastercycler® nexus (Eppendorf). Celles-ci ont été effectuées dans un volume final de 25 µL contenant 10 ng d'ADN génomique, 0,5 µM d'amorces, 0,2 mM de dNTPs, du tampon réactionnel Q5 Buffer (1X), et 0,5 U de Q5 polymérase high fidelity (New England Biolabs), et de l'H2O. Pour l'amplification de la région d'intérêt Le programme PCR a été réalisé comme suit : dénaturation initiale à 98°C pendant 2 minutes ; suivi de 35 cycles : 98°C pendant 10 secondes, étape d'hybridation (température différentes selon les amorces utilisées) pendant 20 secondes, 72°C pendant 2 minutes ; et extension finale à 72°C pendant 2 minutes. Les produits d'amplification ont été révélés sous UV après migration sur gel d'agarose 1,2% contenant du GelRed™ 1X, dans du tampon TAE 1X.

Pour PCR à partir d'ADNg hiPSc EBS-1	
<i>Forward</i>	TAGTGCGCCAATCTGCAGAA
<i>Reverse</i>	CTCAGGTGCTTGGAGGACAG
Pour PCR à partir d'ADNg hiPSc EBS-2	
<i>Forward</i>	CAACCCACTAGTGCCTGGTT
<i>Reverse</i>	CCGTCCCTCTAAAGCTTTTCT

Les produits de PCR ont ensuite été analysé par séquençage Sanger, par la société Genewiz.

- **Western Blot**

Les échantillons protéiques ont été dénaturés avec du DTT 1M (Sigma) pendant 10 minutes à 70°C, supplémentés avec du tampon de charge NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen). Les échantillons protéiques et le marqueur de poids moléculaire HiMark™ Pre-stained Protein Standard (Invitrogen) ont été déposés sur un gel 3–8% Criterion™ XT Tris-Acetate Protein Gel (Biorad) dans un tampon de migration Tris-Acetate SDS Running Buffer (Biorad). La migration des échantillons a été effectuée durant 1 heure et 15 minutes à 120V ; puis le transfert sur membrane a été réalisé sur une membrane « Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm Nitrocellulose » (Biorad), pendant 7 minutes à 25V, avec l'appareil de transfert Trans-Blot Turbo (Biorad). L'étape de saturation est réalisée dans du PBS supplémenté avec une solution de blocking (Intercept Blocking Buffer) pendant 1 heure, sous agitation. Les anticorps primaires Anti-Cas9 (Clone TF8C1, dilué au 1/1000<sup>e</sup>) et β-actine (LI-COR, dilué au 1/1000<sup>e</sup>) sont incubés à 4°C pendant une nuit, sous agitation. Les anticorps secondaires : Anti-Rabbit (LI-COR, IRDye 680RD, dilué au 1/10 000<sup>e</sup>) couplé à un fluorochrome rouge, et Anti-Mouse (LI-COR, IRDye 800CW, dilué au 1/10 000<sup>e</sup>) couplé à un fluorochrome vert sont incubés pendant 1 heure à température ambiante. La révélation a été réalisée avec le système d'imagerie Odyssey CLx et au logiciel Image Quant Studio. Pour la quantification des données, la normalisation a été effectuée par rapport à l'Actine.

- **Extraction ADN génomique**

L'ADN génomique des hiPSc nucléofectées ou électroporées a été extrait en utilisant le kit dans du QuickExtract™ DNA Extraction Solution selon les recommandations du fournisseur (Qiagen).

- **Genotypage SNP**

L'hybridation de l'ADN génomique (extrait comme décrit ci-dessus) a été réalisée sur Infinium Core-24v1-2 BeadChip (Illumina). Les données ont été analysées avec le logiciel GenomeStudio v2.0.5.

- **Transcription in vitro (ARNm)**

Les plasmides xABEmax (xABE) (Addgene plasmide n° 119813) et pCAG-ABE-xCas9 (pCAG) (produit au laboratoire) ont été linéarisés par l'enzyme de restriction NotI ; le plasmide NG-ABEmax (NG-ABE) (Addgene plasmide n° 123163) a été linéarisé par Pme. Les plasmides linéarisés ont ensuite été transcrits *in vitro* en utilisant le kit mMMESSAGE mMACHINE T7, selon le protocole du fabricant. L'ARNm obtenu a été purifié avec le Kit MEGAclean™ (ThermoFischer) selon les recommandations du fournisseur.

- **Digestion enzymatique**

Les produits d'amplification ont été digérés par BstAPI selon les recommandations du fournisseur. Les résultats ont été révélés sous UV après migration sur gel d'agarose au 2% contenant du GelRed™ 1X en utilisant le colorant de dépôt Gel Loading Purple 1X, dans du tampon TAE 1X.

- **Sélection et design d'ARN guide**

Les différents ARN guide utilisés ont été sélectionnés grâce à au programme CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) sur la séquence du gène *KRT5* où est localisée la mutation. Celui-ci a ensuite été synthétisé par la société Eurofins Genomic. Les séquences des ARNg utilisées sont les suivantes :

	Séquences des ARNg utilisés
Pour Base Editing hiPSc EBS-1	GCTGGAGGGCAAGGAATGCAGGT
Pour Knock-in hiPSc EBS-1	ARNg-1 AGCTTCGCTTTATCAGCTGA
	ARNg-2 GGAGCTCATGAACACCAAGC
	ARNg-3 GCTTGGTGTTTCATGAGCTCC
	ARNg-4 TGCTGGAGGGCAAGGAATGC
	ARNg-5 AAGCGAAGCTGCTCTACTGT
Pour Knock-in hiPSc EBS-2	GTAGCTCACCTTGTCGATGA

- **Electroporation d'hiPSc EBS-1**

- Pour Base Editing : Les hiPSc EBS-1 ont été décollées à l'accutase (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent). Successivement des culots d'1.106 de cellules sont resuspendus dans 100 µL de « Resuspension Buffer R », avec 5 µg d'ARNm (pCAG, NG\_ABE ou xABE) et avec ou sans ARNg avant la nucléofection avec le Neon® Transfection System en utilisant le programme 1200V/30m/s/1 pulse. Les cellules nucléofectées ont été réensemencées en plaque 6 puits dans un milieu StemMACS™ iPS-BrewXF avec ajout de RevitaCell™ 1X.
- Dans le cadre de la technologie CRISPR/Cas9 classique : Les hiPSc EBS-1 ont été décollées à l'accutase (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent). Celles-ci ont ensuite été électroporées avec l'Amaza™ Nucleofector™ (Lonza) en utilisant le programme hESH9 (CD118). La ribonucléoprotéine composée de la protéine Cas9 purifiée (obtenue par le laboratoire JP Condorcet) a été complexée *in vitro*, à l'ARN guide, préalablement. Puis, 2.10<sup>5</sup> d'hiPSc EBS-1 ont été électroporées dans un volume final de 30µL avec 150pmol d'ARNg, 125pmol d'Alt-R Cas9 Enzyme (Ribonucléoprotéine qui a été préparée préalablement *in vitro*), 4µM d'Alt-R-Cas9 Electroporation Enhancer et du IDT Duplex Buffer. Les hiPSc électroporées ont ensuite été ensemencées dans un milieu StemMACS™ iPSBrew-XF, avec 30µM d'Alt-R-HDR Electroporation Enhancer et ajout de CloneR™ (Stem Cell) 1X.

- **Correction de la lignée hiPSc EBS-2 par CRISPR/Cas9 (Knock-in)**

Les hiPSc EBS-2 ont été décollées à l'acutase (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent). Celles-ci ont ensuite été électroporées avec l'Amaxa™ Nucleofector™ (Lonza) en utilisant le programme hESH9 (CD118). La ribonucléoprotéine composée de la protéine Cas9 purifiée (obtenue par le laboratoire JP Condorcet) a été complexée *in vitro*, à l'ARN guide, préalablement. 2.105 d'hiPSc EBS ont été électroporées dans un volume final de 30µL avec 150pmol d'ARNg, 125pmol de Ribonucléoprotéine, 8µM de matrice donneuse ssODN (ssODN-1 ou ssODN-2), 4µM d'Alt-R-Cas9 Electroporation Enhancer et du IDT Duplex Buffer. Les hiPSc EBS-2 électroporées ont ensuite étéensemencées dans un milieu StemMACS™ iPSBrew-XF, avec (ou sans) 30µM d'Alt-R-HDR Electroporation Enhancer et ajout de CloneR™ (Stem Cell) 1X, sur coating matrigel.

- **Design des matrices de réparation (ssODN)**

Les matrices de réparation d'ADN simple brin (ssODN-1 et ssODN-2) ont été designé par nous-même et synthétisé par la société Integrated DNA Technologies (IDT).

ssODN-1	5' -TCAACCTGCAAATCGACCCAGCATCCAGAGGGTGAGGACCGAGGAGCGGAGCAGATCAAGACCCCTCAACAATAAGTTTGCCTCATTTCATCGACAAGGTGAGCTACGATCTTTGTAAAAAATCACTGT-3'
ssODN-2	5' -TCAACCTGCAAATCGACCCAGCATCCAGAGGGTGAGGACCGAGGAGCGGAGCAGATCAAGACCCCTCAACAATAAGTTTGCCTCCTTTATCGACAAGGTGAGCTACGATCTTTGTAAAAAATCACTGT-3'

- **Isolation clonale**

Les pools de cellules qui ont été électroporés ont étéensemencé en dilution limite (250 cellules/cm2 et 500 cellules/cm2, dans des boîtes de culture B10), dans un milieu StemMACS™ iPSBrew-XF, avec ajout de 10 µM de Rock Inhibitor (Y27632, StemMACS™), sur coating Matrigel. Les clones uniques ont ensuite été récupérés manuellement et réensemencés (dans le même milieu et coating) en plaque p96. Arrivés à confluence les clones isolés ont été passés à l'acutase et amplifiés.

- **Analyse des Off-Target**

Les réactions PCR ont été effectuées à partir d'ADN génomique et réalisées avec un Mastercycler® nexus (Eppendorf). Les couples d'amorces ont été designés grâce à l'outil fourni par le site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) ou l'outil primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Les PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µL contenant 10 ng d'ADN génomique, 0,5 µM du mix d'amorces Forward et Reverse (Eurofins), 0,2 mM de dNTPs (Thermo Scientific), du tampon réactionnel Q5 Buffer (1X) (Biolabs England), et 0,5 U de Q5 polymérase high fidelity (Biolabs). Le programme de PCR utilisé était le suivant : dénaturation initiale à 98°C pendant 2 minutes ; suivi de 30 à 35 cycles : 98°C pendant 10 secondes, hybridation de 66° à 72° (en fonction du couple d'amorce utilisé) pendant 20 secondes, élongation à 72°C pendant 2 minutes ; et extension finale à 72°C pendant 2 minutes. Les produits d'amplification obtenus ont été révélés sous UV après migration sur gel d'agarose 1,5% contenant du GelRed™ 1X (Biotium), dans du tampon TAE 1X (Invitrogen), puis purifiés à l'aide du kit Monarch DNA & PCR Cleanup (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur et enfin, envoyés à séquencer (séquençage SANGER) à la société GENEWIZ (domiciliée en Allemagne) avec l'une des 2 amorces.

<b>Primers</b>	<b>Séquences</b>
<b>KRT4 (Forward)</b>	ACCCAGGACTCAGGACCCC
<b>KRT4 (Reverse)</b>	CAGCTCGCTCTCTGCAGCCA
<b>KRT1 (Forward)</b>	GAGTCCCAATTCCGCTCAAG
<b>KRT1 (Reverse)</b>	AGGTCTGGGTACCGAAGTGG
<b>CNTN4 (Forward)</b>	TGACCAGCCTTGAACCAGGTGA
<b>CNTN4 (Reverse)</b>	AGCGCCTGAGGGTCTCTGGG
<b>KRT77 (Forward)</b>	AGCACGATGTGGTGAGAGGTGGT
<b>KRT77 (Reverse)</b>	CTGCCTCCTTCTGCCAGGCT
<b>KRT79 (Forward)</b>	CTGAAGGCCGCCTCCAGCCA
<b>KRT79 (Reverse)</b>	AAGCCCACAGTGGCCAGCA
<b>KRT6C (Forward)</b>	TGCACCGAGAGCCACCTGCA
<b>KRT6C (Reverse)</b>	AGCCTCCAACGCTCGCCACA
<b>KRT6B (Forward)</b>	TGCACCGAGAGCCACCTGCA
<b>KRT6B (Reverse)</b>	AGCCTCCAACGCTCGCCACA
<b>KRT6A (Forward)</b>	TGCACCGAGAGCCACCTGCA
<b>KRT6A (Reverse)</b>	AGCCTCCAACGCTCGCCACA



## Discussion et perspectives

Le développement de modèles cellulaires pertinents et robustes est un enjeu majeur pour la compréhension des processus pathologiques cellulaires et moléculaires de l'Épidermolyse Bulleuse Simple, ainsi que pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. La découverte des cellules souches pluripotentes humaines et plus particulièrement la génération de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSc), combinée à l'émergence des technologies d'édition du génome, a permis d'apporter des perspectives innovantes et prometteuses dans le cadre de la modélisation pathologique de l'EBS. C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont porté.

- 1) Dans un premier temps, mon projet a consisté à participer au développement d'un nouveau modèle cellulaire pour l'étude de l'EBS, à partir d'hiPSc.
- 2) En parallèle, j'ai pu générer une lignée d'hiPSc EBS isogénique, grâce à l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9.
- 3) Dans un second temps, en se basant sur une analyse transcriptomique que l'on a effectuée, j'ai pu axer la fin de mon projet de thèse sur l'étude du profil cytokinique pro-inflammatoire à partir des modèles cellulaires générés.

- **Approche de modélisation pathologique**

La première étape d'une approche de modélisation pathologique consiste à développer un modèle d'étude pertinent, capable de récapituler les mécanismes pathologiques de la maladie.

Jusqu'à présent différents modèles cellulaires et animaux ont permis de mettre en évidence certains phénotypes pathologiques de l'EBS, cependant ceux-ci présentent certaines limites. Les modèles animaux concernent majoritairement des modèles de souris transgéniques knock-out (Lloyd et al. 1995; Peters et al. 2001) ou conditionnels (Cao et al. 2001). Les phénotypes cliniques observés dans ces modèles se rapprochent de ceux observés chez les patients avec une fragilité cutanée et la présence de bulles généralisées sur la peau. Néanmoins, ces souris présentent un niveau de gravité plus élevé se traduisant par une létalité post-natale immédiate ou prématurée. Cela pourrait s'expliquer par des différences entre la souris et l'homme, au niveau de l'architecture cutanée ainsi que dans les mécanismes de cicatrisation des plaies (Wong et al. 2011; Zomer and Trentin 2018).



Par conséquent, pour pallier à ces limites des modèles cellulaires humains ont été développés, reposant sur l'utilisation de kératinocytes basaux primaires ou immortalisés. En raison du faible potentiel prolifératif des kératinocytes primaires EBS, cela constitue un obstacle à des essais fonctionnels plus poussés (Deyrieux and Wilson 2007) ; certaines équipes ont donc surmonté cette limitation en les immortalisant. Cependant, le processus d'immortalisation de ces kératinocytes primaires peut altérer certains mécanismes biologiques tels que le cycle cellulaire, le processus apoptotique ou encore l'intégrité génomique (Lehman et al. 1993; Choi and Lee 2015). Ainsi les phénotypes associés à l'EBS, démontrés à partir de kératinocytes EBS immortalisés, tel que la modification de voie de signalisation associée à la prolifération cellulaire pourrait s'éloigner d'un contexte physiopathologique (Jean Christopher Chamcheu et al. 2009b; J.C. Chamcheu et al. 2010; D'Alessandro et al. 2002). De manière générale l'obtention de ces lignées nécessite de passer par une étape de biopsie cutanée, qui reste une approche invasive pour des patients présentant des plaies chroniques et des problèmes de cicatrisation. De plus, l'obtention de cellules provenant de nombreux patients différents reste limitée. En effet, jusqu'à présent, les études portant sur l'utilisation de kératinocytes primaires immortalisés de patients EBS, utilisent majoritairement les mêmes lignées cellulaires, KEB-1 (EBS-DM K5 : E475G), KEB-7 (EBS-DM K14 : R125P), et NEB1 (lignée témoin) (S. M. Morley et al. 2003; Liovic et al. 2009; Wally, Lettner, et al. 2013). De plus, comme discuté dans l'introduction de ce manuscrit, il existe une grande variabilité de mutations au sein des gènes *KRT5* et *KRT14*, dont la localisation va refléter des formes plus ou moins graves d'EBS. De ce fait les quelques lignées utilisées, citées ci-dessus, ne sont pas totalement représentatives de l'ensemble des patients.

Dans ce contexte, une approche permettant de contourner les inconvénients liés à l'utilisation de modèles animaux ou de lignées cellulaires primaires ou immortalisées, porte sur l'utilisation des cellules souches humaines induites à la pluripotente (hiPSc).

Ces dernières années, les hiPSc sont devenues un outil biologique pertinent pour la modélisation pathologique pour différentes raisons : (1) la facilité d'obtention à partir de cellules sanguines ou de sources de cellules somatiques de patients (tel que les fibroblastes cutanés), permettant d'obtenir des lignées d'hiPSc de patients, avec d'avantage de mutations différentes ; (2) leur propriété d'auto-renouvellement, permettant d'obtenir facilement et rapidement une source illimitée de cellules ; (3) leur capacité de différenciation dans tous les types cellulaires de l'organisme, permettant la mise en place d'un modèle cellulaire d'intérêt *in vitro* (Oceguera-Yanez, Avila-Robinson, and Woltjen 2022).

Grâce aux avantages et propriétés des hiPSc, les cellules obtenues à l'issue de leur différenciation, sont largement utilisées ces dernières années pour modéliser un nombre important de pathologies. En effet, ces modèles cellulaires *in vitro* permettent de générer de grosses quantités de cellules d'intérêts

pertinentes pour l'étude de la pathologie. Ces cellules provenant d'hiPSc d'individus sains et d'individus malades, sont comparées, afin d'évaluer les mécanismes sous-jacents à la pathologie, d'un point de vue cellulaire et moléculaire, ouvrant ainsi la voie à une meilleure compréhension de la physiopathologie.

Dans le cadre des maladie cutanées, l'utilisation d'hiPSc et la génération de types cellulaires d'intérêts à partir de celles-ci, tel que les kératinocytes, ont permis de modéliser différentes génodermatoses, dont des sous-types d'Epidermolyses Bulleuses, telles que l'Epidermolyse bulleuse Dystrophique Récessive (Matsumura et al. 2018) et l'Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle (Tolar et al. 2013), mais également d'autres génodermatoses comme le psoriasis (Ali et al. 2020) et la dermatite atopique (Devito et al. 2018).

- **Elaboration d'un nouveau modèle cellulaire pour l'étude de l'EBS**

A ce jour, concernant l'EBS, trois études récentes ont seulement permis de montrer la faisabilité de générer des lignées d'hiPSc dérivées de biopsies cutanées de patients atteints d'EBS porteurs de mutation au sein du gène *KRT5* (Kolundzic et al. 2019) ou *KRT14* (Bchetnia et al. 2020; Bchetnia, Martineau, et al. 2022). Ces études se sont limitées à la caractérisation des hiPSc indifférenciées, notamment en analysant la pluripotence de ces cellules via la formation de corps embryonnaires *in vitro* et le test de tératome conventionnel *in vivo*, et en s'assurant de l'intégrité génomique à l'issue de la reprogrammation, par une analyse caryotypique. Dans ces études, les hiPSc EBS n'ont pas été différenciées en kératinocytes basaux, cellules d'intérêts pour étudier la physiopathologie de l'EBS.

Ainsi la première partie de mon travail de thèse a consisté à participer au développement d'un nouveau modèle d'étude, basé sur l'utilisation de kératinocytes basaux dérivés d'hiPSc provenant de patients atteints d'EBS (K-EBS) porteurs de mutations au sein du gène *KRT5* (c.1429 G>A ; c.536 T>C ; c.608 T>C). Ce modèle a pour objectif de vérifier si les principaux phénotypes de l'EBS déjà décrits dans d'autres modèles d'études sont reproduits. Le protocole de différenciation utilisé dans notre étude nous a permis d'obtenir des populations homogènes et matures de K-EBS dans lesquelles plus de 98% des cellules co exprimaient les deux principaux marqueurs des kératinocytes basaux de l'épiderme à savoir la kératine 5 (K5) et la kératine 14 (K14). Pour valider la pertinence des résultats obtenus avec les K-EBS, des kératinocytes primaires d'un patient EBS (obtenus à partir de prépuce) ont aussi été utilisés dans notre étude.

Dans cette étude, nous avons pu montrer les principaux phénotypes pathologiques déjà mis en évidence dans des modèles cellulaires de l'EBS à savoir une diminution de la prolifération cellulaire,

une augmentation de la migration cellulaire, une altération de la voie de signalisation ERK, et la présence d'agrégats de kératines.

Ainsi, les K-EBS présentaient une prolifération cellulaire réduite, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de ERK, comme observé également dans la lignée de kératinocytes primaires EBS utilisée. Le défaut de prolifération dans les cellules EBS est concordant avec ce qu'il a été décrit dans la littérature par l'équipe de Chamcheu et al (Jean Christopher Chamcheu et al. 2009b). En effet, elle avait mis en évidence un défaut prolifératif des kératinocytes primaires EBS par rapport à des kératinocytes primaires WT considérant donc ce défaut comme étant un phénotype pathologique. Néanmoins, comme discuté précédemment quant aux limitations de l'utilisation de kératinocytes primaires en culture, cette même équipe a immortalisé ces kératinocytes EBS. Dans une étude ultérieure, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la phosphorylation de ERK dans les kératinocytes EBS immortalisés contrairement aux kératinocytes immortalisés sauvages (Jean Christopher Chamcheu, Navsaria, et al. 2011b). Ce résultat, contraire à ce que l'on a observé dans notre modèle cellulaire, pourrait s'expliquer par le processus d'immortalisation qui est principalement réalisé pour augmenter le potentiel prolifératif des kératinocytes. De plus, de nombreuses observations et de preuves dans la littérature font état de la nécessité d'une activation de ERK pour la progression du cycle cellulaire et ainsi favoriser la prolifération cellulaire (Yamamoto et al. 2006; Chambard et al. 2007).

L'augmentation de la migration cellulaire dans les K-EBS est corrélée avec ce qui a notamment été mis en évidence dans des kératinocytes EBS immortalisés, suite à une évaluation de cicatrisation après blessure *in vitro* (S. M. Morley et al. 2003).

Enfin, l'observation d'agrégats de kératines dans le cytoplasme des kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS) concorde avec ce qui a été observé dans des biopsies cutanées (Pierre A. Coulombe, Kerns, and Fuchs 2009) de patients mais également avec les différentes études menées sur d'autres modèles d'études cellulaires, tel que des kératinocytes EBS immortalisés (D'Alessandro et al. 2002) ou de souris transgéniques (Vassar et al. 1991 ; Lloyd et al. 1995). En effet, la présence d'agrégats de kératines dans les kératinocytes basaux de patients avait été mise en évidence dès 1982, par l'équipe d'Anton-Lamprecht (Anton-Lamprecht and Schnyder 1982). De plus, la sensibilité accrue des K-EBS à un choc osmotique induit par l'urée montrée dans notre étude, est similaire à ce qui a déjà démontré dans des kératinocytes immortalisés générés à partir de biopsies cutanées d'EBS qui étaient également très sensibles à divers stress, tel qu'à l'issue d'un choc thermique (Morley et al. 1995 ; Jean Christopher Chamcheu et al. 2011), d'un étirement mécanique (Russell et al. 2004) ou d'une variation osmotique (D'Alessandro et al. 2002).

Ainsi, notre nouveau modèle cellulaire récapitule les principaux stigmates pathologiques associés à l'EBS déjà démontrés dans la littérature, et représente donc un outil pertinent pour la modélisation de l'EBS et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Néanmoins, bien que l'élaboration de modèles cellulaires 2D à partir d'hiPSc ait contribué à l'étude et la découverte d'un grand nombre de processus biologiques et pathologiques, il serait intéressant de complexifier notre modèle cellulaire. Dans notre étude nous avons pu montrer la capacité des kératinocytes dérivés d'hiPSc à reconstruire un épiderme pluristratifié *in vitro*, néanmoins il serait intéressant de complexifier ce modèle cellulaire afin de se placer dans un contexte physiopathologique plus pertinent.

Tout d'abord, comme déjà décrit dans une étude menée sur l'Epidermolyse Bulleuse Dystrophique Récessive (RDEB), nous pourrions générer des équivalents cutanés 3D, en générant cette fois-ci des kératinocytes mais également des fibroblastes à partir d'hiPSc pathologiques (Itoh et al. 2011). De plus, la génération de ces deux types cellulaires à partir d'hiPSc et la génération de substituts cutanés 3D composés de ceux-ci, associés avec une matrice de fibrine à partir de plasma, est maîtrisée au sein de l'équipe (Domingues et al. 2022).

Pour aller plus loin dans la caractérisation des mécanismes moléculaires de l'EBS mais également pour se rapprocher d'un modèle plus physiologique, nous pourrions générer des organoïdes cutanés (J. Lee et al. 2022). La faisabilité a d'ailleurs été montrée à partir d'hiPSc dans une étude sur l'Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle, dans laquelle les auteurs ont pu effectuer une caractérisation plus approfondie de la jonction dermo-épidermique (Ramovs et al. 2022). De plus, une étude a démontré la faisabilité de générer des greffons cutanés organotypiques autologues dérivés d'iPSc de qualité clinique (iSC), pour traiter des plaies dans le cadre d'Epidermolyse Bulleuse Dystrophique (Neumayer et al. 2023). Les auteurs ont permis de montrer que des greffes de ces iSC sur des souris immunodéprimées permettaient une stratification stable avec une restauration fonctionnelle du *COL7A1*.

- **hiPSc et édition du génome**

Dans le cadre d'approche de modélisation il est également important de tenir compte de la variabilité des lignées d'hiPSc qui résulte de fonds génétiques différents mais également de variabilités épigénétiques ou liées à l'âge et au sexe des individus. Combinées à l'utilisation d'hiPSc comme outil cellulaire biologique, les approches d'éditions du génome permettent la génération de lignées isogéniques grâce à la correction d'une mutation précise permettant de comparer des cellules où seule la présence de la mutation diffère ; cela permet ainsi de fournir de nombreuses informations sur les

mécanismes pathologiques et corrélés spécifiquement des défauts moléculaires ou cellulaires à la mutation causale de la pathologie.

Une étude menée sur des hiPSc EBDR (Epidermolyse Bulleuse Dystrophique Récessive) a montré la faisabilité de corriger la mutation au sein du gène *COL7A1* dans des hiPSc par la technologie CRISPR/Cas9, et de différencier ces hiPSc corrigées en kératinocytes, montrant que la correction de la mutation causale permettait de restaurer une fonction protéique du collagène 7 et la capacité des cellules à former des filaments d'ancrage (Jacków et al. 2019). D'autres études sur l'EBDR ont également permis de corriger des mutations au sein du gène *COL7A1*, montrant la réversion de divers phénotypes (Webber et al. 2016; Bonafont et al. 2021; Berthault et al. 2023).

En 2007, une équipe a également permis de montrer la possibilité de corriger une mutation causale de l'EBS au sein du gène *KRT14*, dans des kératinocytes primaires de patients, via une stratégie de recombinaison homologue avec l'approche d'édition du génome CRISPR/Cas9, permettant la diminution du nombre d'agrégats de kératines dans le cytoplasme des cellules (Kocher et al. 2017). Plus récemment une étude a permis de décrire une approche d'édition génique CRISPR/Cas9 permettant d'induire spécifiquement une cassure double brin sur l'allèle mutant, dans l'exon 1 du gène *KRT14* (sans éditer l'allèle sauvage) et de promouvoir le processus de réparation par NHEJ (Jonction d'extrémité non homologue). Cela a permis d'induire un nombre important d'insertions ou de délétions (indels) et donc un décalage du cadre de lecture (Cattaneo et al. 2024). Cette approche qui a ainsi permis d'abolir l'expression de l'allèle mutante *KRT14* a permis d'induire une diminution d'agrégats de kératines ; de plus la formation d'équivalents cutanés à partir de ces cellules corrigées ont permis de montrer une disparition de bulles intra épidermiques. Ces deux études ont ainsi permis de montrer un lien direct entre les mutations au sein du gène *KRT14* et la présence d'agrégats de kératines.

Dans le cadre de l'EBS, la combinaison de l'utilisation d'hiPSc et de la technologie CRISPR/Cas9 n'a cependant été réalisée qu'une seule fois, pour corriger une mutation au sein du gène *KLHL24*, mutation causale de l'EBS peu fréquente (Ramovs et al. 2021). Dans cette étude, les auteurs ont seulement caractérisé la lignée cellulaire obtenue, aucune étude phénotypique n'a été effectuée.

A ce jour, la possibilité de générer une lignée corrigée à partir d'hiPSc EBS mutée au sein du gène *KRT5* n'a donc jamais été démontrée. De plus, dans notre étude nous avons observé une forte hétérogénéité au sein des échantillons, notamment grâce à l'analyse en composante principale suite au RNA-seq qui avait été effectué, sans montrer de regroupement spécifique des échantillons EBS ou WT entre eux ; cette variabilité peut-être partiellement expliquée par le fond génétique de chaque lignée.

De ce fait, c'est dans ce contexte qu'une partie de mon travail de thèse a consisté à utiliser les hiPSc EBS et outils d'édition du génome pour générer une lignée isogénique qui ne diffère de la lignée parentale que par la mutation, permettant ainsi d'étudier les conséquences directes associées à la mutation au sein du gène *KRT5*, et d'exclure les variations inter-individus pouvant être causées par le fond génétique ou l'épigénétique, le sexe ou l'âge (De Masi et al. 2020). En utilisant le système CRISPR/Cas9 via le mécanisme de réparation dirigée par homologie (HDR), nous avons généré avec succès une lignée d'hiPSc isogénique à partir de la lignée porteuse de la mutation c.536T>C au sein du gène *KRT5*.

La première stratégie que nous avons menée avait consisté à corriger la lignée d'hiPSc EBS porteuse de la mutation c.1429 G>A au sein du gène *KRT5*, par Base Editing, dont la faisabilité et l'efficacité dans les hiPSc n'étaient que peu décrites au début de mon projet de thèse. Depuis de nombreuses études ont été publiées, notamment dans le cadre de l'Epidermolyse Bulleuse Dystrophique Récessive (EBDR), dans lesquelles la faisabilité du Base Editing a été montrée dans les hiPSc EBDR (Osborn et al. 2020; Naso et al. 2023). La correction génique par Base Editing de la mutation (c. 1429 G>A) au sein du gène *KRT5*, n'a cependant pas été concluante. L'hypothèse la plus probable à l'absence d'édition, serait que l'ARN guide n'ait pas permis de positionner la Cas9-ABE au niveau de la région cible dans la bonne fenêtre d'édition et donc de convertir le nucléotide cible. Nous avons donc mené à partir de cette même lignée, une stratégie d'édition du génome par la technologie CRISPR-Cas9 classique, utilisant le mécanisme de recombinaison homologue. Cependant malgré de nombreuses optimisations, l'efficacité de correction génique était toujours faible ou absente. L'hypothèse la plus probable à ce manque d'efficacité reposait sur le problème de la région cible, où se trouve la mutation, qui semble très homologue à d'autres kératines, et donc le design d'un ARNg spécifique n'était pas possible pour permettre une édition efficace. C'est à l'issue de ces différentes expériences non concluantes que nous avons donc sélectionné une autre lignée d'hiPSc EBS porteuse d'une mutation différente et donc dans une région différente du gène *KRT5*, que la lignée utilisée jusqu'ici.

Suite à l'obtention de cette lignée, celle-ci a été caractérisée via différents contrôles qualités, permettant de montrer que les cellules éditées avaient conservé leurs propriétés de pluripotence. De plus l'intégrité génomique qui a été vérifiée par génotypage des SNP n'a indiqué aucune anomalie. Enfin, l'analyse des coupures hors cibles (OFT) a été effectuée ; en effet bien que la spécificité de clivage de la Cas9 soit considérée comme fortement déterminée par l'ARN guide et le motif PAM adjacent à la séquence cible du génome, la Cas9 peut introduire des mutations hors cible étant donné que les ARN guides reconnaissent des séquences d'ADN présentant un à quelques mésappariements (Y. Lin et al. 2014). Sur les 8 premiers OFT les plus probables, cette analyse a révélé que 7 ne présentaient pas de coupures hors sites. En revanche, nous avons constaté l'insertion d'un nucléotide

au sein d'une région hors cible du gène *KRT4*, prédite comme étant la plus probable, ce qui a conduit à l'apparition d'un codon stop et donc à une protéine tronquée. De nombreux clones ont été ré isolés et analysés suite à cela, mais tous se sont également révélés être édités au niveau du ce locus *KRT4*. Etant donné que l'ARN guide utilisé dans notre étude, diffère seulement de 2 nucléotides par rapport au locus hors cible *KRT4*, il y avait une forte probabilité que cela se produise. De plus, il a été décrit que les kératines possèdent un grand nombre de régions homologues entre elles (Bragulla and Homberger 2009), ce qui complexifie l'identification d'ARN guide spécifique à la zone où se trouve la mutation au sein du gène *KRT5* ; c'est d'ailleurs cette limitation qui nous a contraint à changer de lignée d'hiPSc mutée au cours de notre étude, pour la génération de la lignée d'hiPSc EBS corrigée.

Suite à l'identification de ce OFT, nous avons donc vérifié l'impact que cela pouvait avoir sur la suite de notre étude et notamment sur la génération de kératinocytes à partir de cette lignée d'hiPSc EBS corrigée. Il s'est avéré que la kératine 4 codée par le gène *KRT4* est majoritairement exprimée dans l'œsophage et le tube digestif proximal (Fagerberg et al. 2014), et qu'elle n'est pas exprimée dans les cellules basales de l'épiderme (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3851>). De plus des résultats de transcriptomique et de protéomique internes à l'équipe (non publiés) ont également permis de confirmer l'absence d'expression du gène *KRT4* dans les kératinocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes, suggérant que l'édition au niveau de la kératine 4 ne semblerait pas avoir de relevance fonctionnelle.

La lignée d'hiPSc EBS corrigée a ensuite pu être différenciée en kératinocytes avec succès, et a permis l'obtention d'une population cellulaire homogène et mature, identique à ce qui est obtenu habituellement avec l'utilisation de lignées d'hiPSc EBS ou WT. La présence du OFT dans cette lignée d'hiPSc EBS corrigée n'a donc pas altéré la différenciation kératinocytaire.

Enfin, l'obtention de cette lignée isogénique, en plus des trois lignées d'hiPSc EBS que l'on a à notre disposition va donc permettre une avancée dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux mutations au sein du gène *KRT5* et ainsi permettre d'étudier si ceux-ci sont directement corrélés à la mutation causale.

- **Kératinocytes dérivés d'hiPSc et études des mécanismes moléculaires de l'EBS**

Une fois notre modèle cellulaire d'étude ayant été défini et caractérisé à la suite des résultats décrits précédemment, la deuxième étape a consisté à élucider de manière détaillée les mécanismes pathologiques sous-jacents de l'EBS, qui est une condition préalable importante pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi aboutir au développement de thérapies innovantes.

Pour cela, une analyse transcriptomique comparative à partir de lignées de kératinocytes dérivées de 3 lignées d'hiPSc EBS (K-EBS) et de trois lignées d'hiPSc WT (K-WT) a été effectuée, et a permis de mettre en évidence 138 gènes spécifiquement dérégulés (DEGs) dans les cellules EBS. L'étude d'interaction protéique parmi ces DEGs, nous a permis de révéler trois clusters hautement liés contenant des gènes impliqués dans : (1) la réponse inflammatoire, avec des marqueurs tels que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et CXCL10 (cluster 1 ; GO : 0006954), (2) l'organisation de la matrice extracellulaire, avec des gènes tels que l'ELN, SMOC1 et SMOC2 (cluster 2 ; GO : 0031012) et (3) l'organisation des chromosomes et du packaging de l'ADN tels que HS3ST2 et HMGB3 (cluster 3 ; GO : 0006323). Il est intéressant de noter que des études antérieures ont d'ailleurs montré que la migration des kératinocytes humains en culture pouvait être stimulée *in vitro* par l'élastine (ELN) (Kajiya et al. 1997). De plus, des études fonctionnelles ont également montré que SMOC-1/2 médie l'attachement cellulaire en se liant aux récepteurs de surface cellulaire de la famille des intégrines (Maier, Paulsson, and Hartmann 2008). Il serait donc intéressant dans des études ultérieures d'analyser les conséquences fonctionnelles de ces gènes pour approfondir la compréhension de la physiopathologie.

De plus, suite aux données transcriptomiques obtenues, l'ensemble des DEGs a été soumis à une analyse d'enrichissement d'ontologie à l'aide de l'outil d'analyse informatique « EnrichR ». Cette analyse nous a permis de montrer un enrichissement majeur de la voie de signalisation médiée par les cytokines (GO : 0019221) (P ajusté = 1,05E-4) et également de la réponse inflammatoire (GO : 0006954) (P ajusté = 1,31E-4). Ce résultat nous a permis de confirmer un défaut de la régulation de gènes codant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les K-EBS, mettant en avant la présence claire d'une composante inflammatoire dans l'EBS. Celle-ci n'ayant à ce jour jamais été étudiée dans un modèle cellulaire basé sur l'utilisation d'hiPSc EBS, pour la suite de mon projet nous avons choisi de nous concentrer sur l'étude du profil cytokinique pro-inflammatoire dans l'EBS et plus particulièrement sur la dérégulation des cytokines et chimiokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10, CXCL11, CCL2 et CCL20, à partir du modèle cellulaire que l'on a généré.



- **Etude du profil cytokinique pro-inflammatoire dans l'EBS**

De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence dans notre modèle cellulaire de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS) une augmentation de l'expression des transcrits codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10, CXCL11, CCL2 et CCL20, à l'état basal.

Néanmoins, comme évoqué lors de mes résultats, le milieu de culture utilisé peut influencer sur l'étude de l'aspect inflammatoire. Des efforts importants ont donc été fournis au cours de ma thèse pour d'une part, maintenir les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS et WT en culture et permettre leur amplification et maturation, et d'autre part pour permettre la détection d'une dérégulation de marqueurs pro-inflammatoires dans les K-EBS. En effet, nous avons pu montrer qu'en fonction du milieu de culture utilisé, les capacités de prolifération cellulaire, de migration cellulaire mais également de maturation des kératinocytes étaient fortement impactées. Cependant, bien qu'il soit extrêmement important de comprendre quels composants sont responsables de tels changements, les formulations des milieux sont en partie exclusives et confidentielles, et nous ne sommes pas en mesure de tester des composants individuellement.

Ainsi, pour augmenter la relevance et la pertinence de notre modèle pour cette étude du profil cytokinique pro-inflammatoire, nous avons fait le choix de mimer *in vitro* une composante inflammatoire la plus proche de celle observée chez le patient. Une étude a fait état de taux important d'IFN $\gamma$  dans les échantillons de sérums de patients (Annicchiarico et al. 2015). De plus l'IFN $\gamma$  a été décrit à plusieurs reprises comme étant un puissant stimulant pour provoquer la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les kératinocytes, notamment dans la psoriasis (Albanesi et al. 2018) ou la maladie Lichen planus (Shao et al. 2019). Pour ces raisons nous avons donc stimulé les K-EBS avec cette cytokine pro-inflammatoire. Dans ces conditions, nous avons pu confirmer les résultats que nous avons obtenus à l'état basal mais également pu mettre en évidence une augmentation de la sécrétion protéique de l'IL-1 $\alpha$  et des chimiokines CXCL10 et CXCL11 dans les K-EBS.

Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études ayant déjà fait état de marqueurs de l'inflammation dans différents modèles EBS. En 2007, Lu et al ont montré une augmentation de l'IL-1 $\beta$  au niveau ARN mais également au niveau protéique dans des souris transgéniques K5 -/- (Lu et al. 2007). L'équipe de Roth et al, a mis en évidence dans ce même modèle murin une augmentation de l'expression de CCL2, CCL20 mais également une augmentation du recrutement de cellules de Langherans dans l'épiderme de ces souris. Ces observations suggèrent que ces chimiokines exprimées induisent une augmentation de l'expression des défenses immunitaires (Roth et al. 2009). L'augmentation de l'expression de l'IL-1 $\beta$  mais également de CXCL8 (IL-8) a de même été montrée dans

des kératinocytes immortalisés EBS par Lettner et al et Wally et al (Wally, Lettner, et al. 2013 ; Lettner et al. 2013). Cette même équipe, mais également les équipes d'Annicchiarico, et d'Alexeev ont permis de mettre évidence une augmentation de l'expression de CXCL8, CXCL10, IL-1 $\beta$ , CCL2 (Lettner et al. 2013 ; Annicchiarico et al. 2015 ; Alexeev et al. 2017). En 2022, Lee et al, ont également montré une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , et IL-1 $\alpha$  dans des kératinocytes immortalisés EBS (G. H. Lee et al. 2022). Enfin, Alexeev et al, ont mis en évidence une infiltration de leucocytes LT, dans des biopsies de patients EBS, dont la migration aurait été augmentée par l'augmentation de chimiokines pro-inflammatoires (Alexeev et al. 2017).

Ce comparatif avec la littérature appuie la pertinence de notre modèle cellulaire pour l'étude de la composante inflammatoire dans l'EBS.

D'autre part, l'utilisation de la lignée isogénique que l'on a générée nous a permis de montrer que la correction de la mutation au sein du gène *KRT5* permettait de restaurer un niveau d'expression de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , CXCL10 et CXCL11 à un niveau proche de celui observé dans les lignées de kératinocytes dérivés d'hiPSc WT. Cela démontre clairement que la mutation causale est suffisante pour induire l'expression de marqueurs pro-inflammatoires et donc une inflammation. Néanmoins, une des limites consiste en la génération d'une seule lignée isogénique avec un seul fond génétique et une seule mutation. Il serait donc intéressant, pour appuyer d'avantage ce résultat, de générer d'autres lignées isogéniques porteuses de la même mutation au sein du gène *KRT5* à partir de lignées d'hiPSc sauvages, possédant toutes un fond génétique différent. Une autre stratégie pourrait aussi consister à corriger d'autres lignées d'hiPSc EBS porteuses de mutations différentes au sein du gène *KRT5*.

Pour conclure, les précédents modèles utilisés dans l'étude de l'EBS, ainsi que notre nouveau modèle cellulaire, confirment bien l'existence claire d'une composante inflammatoire dans cette pathologie. Néanmoins, l'origine de cette inflammation et ses conséquences sur la pathologie restent à étudier. Une des perspectives de mon travail de thèse serait donc d'utiliser le nouveau modèle cellulaire de kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS pour déterminer les mécanismes sous-jacents à ce profil cytokinique pro-inflammatoire.

- **Compréhension de l'implication des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans l'EBS**

Comme décrit précédemment, nous avons pu montrer dans notre étude que la stimulation à l'IFN $\gamma$ , utilisé pour mimer un contexte inflammatoire, induisait principalement une augmentation de la sécrétion des chimiokines CXCL10 et CXCL11 par les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS. Le rôle de celles-ci dans la physiopathologie de l'EBS n'est cependant pas connu à ce jour, il serait donc intéressant dans un premier temps d'étudier les voies de signalisation menant à leur surexpression.

Néanmoins, de manière générale, il est décrit dans la littérature que l'expression de CXCL10 et CXCL11 est directement activée via la voie JAK/STAT1, induite par la fixation de l'IFN $\gamma$ , recrutant ainsi des lymphocytes T de type 1 (Th1) (Kanda et al. 2007 ; De Benedetti et al. 2021). L'augmentation de l'expression de ces chimiokines par les kératinocytes renforcerait donc une induction massive des cellules Th1, ce qui serait à l'origine d'une inflammation cutanée persistante (Giustizieri et al. 2001 ; Klunker et al. 2003).

De plus, une étude a montré à partir de kératinocytes immortalisés conçus pour exprimer de manière stable la mutation EBS *KRT14* R125P (kératinocytes EBS), que la stimulation à l'IFN $\gamma$  de ces cellules à confluence (dont les agrégats de kératines avaient disparu) a induit une réapparition des agrégats de kératines, avec des concentrations croissantes d'IFN $\gamma$  (Badowski et al. 2022). Cela a permis d'indiquer une relation causale, bien qu'hypothétiquement indirecte, entre l'exposition des kératinocytes EBS à l'IFN $\gamma$  et l'induction d'agrégats de kératine, suggérant que l'IFN $\gamma$  serait susceptible d'exacerber le phénotype. Cette étude a également mis en évidence que suite au traitement à l'IFN $\gamma$  les kératinocytes EBS montraient un niveau beaucoup plus élevé de la phosphorylation de STAT1, comparés aux lignées de kératinocytes immortalisés WT.

Compte tenu de ces études, il serait donc intéressant de vérifier dans notre modèle cellulaire, si la stimulation à l'IFN $\gamma$  induit également une augmentation des agrégats de kératines dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS). De plus, en raison de l'augmentation de la sécrétion de CXCL10 et CXCL11 dans notre étude, nous pourrions envisager d'étudier la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$ , médiateur majeur de l'inflammation, notamment en vérifiant si la stimulation des lignées de K-EBS induit une augmentation de la phosphorylation de STAT1. La lignée isogénique serait également utilisée pour vérifier si ce que nous observerions est bien corrélé à la mutation causale de l'EBS.

Enfin, dans diverses maladies cutanées présentant une inflammation chronique et un infiltrat de cellules immunitaires important tel que le psoriasis (Hawkes, Chan, and Krueger 2017), des études ont permis de conduire au développement de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les principaux composants inflammatoires, tels que les inhibiteurs JAK/STAT, comme la Tofacitinib (Tian, Chen, and Xu 2019).

De ce fait, si nous observons une augmentation de la phosphorylation de STAT1 dans les kératinocytes dérivés d'hiPSc EBS (K-EBS), nous pourrions utiliser notre modèle cellulaire pour traiter les K-EBS à l'aide d'inhibiteur JAK/STAT afin d'étudier si cela permet une diminution de la phosphorylation de STAT1 et une diminution de l'expression de CXCL10 et CXCL11, mais également une diminution des agrégats de kératines. Nous pourrions également vérifier dans un contexte de co-culture avec la présence de cellules immunitaires ou dans un modèle *in vivo* (modèle murin) si l'utilisation d'une telle molécule, déjà utilisée en clinique dans d'autre pathologie, permettrait d'induire une diminution de la sécrétion de CXCL10 et CXCL11 par les kératinocytes et de vérifier si cela contribuerait à la diminution de recrutement de cellules Th1, à la diminution de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par ces lymphocytes et ainsi permettre de diminuer la cascade d'activation de la voie JAK/STAT, qui serait à l'origine d'une inflammation chronique.

- **hiPSc et approches de criblage pharmacologique**

Le 4-phénylbutyrate (PBA), un chaperon chimique décrit pour faciliter le repliement des protéines, a été utilisé dans des kératinocytes primaires EBS, par l'équipe de Spörrer et al, permettant de mettre en évidence que ce composé réduisait l'agrégation de filaments intermédiaires de kératines (KIF) dans ces cellules (Spörrer et al. 2019).

Nous avons donc étudié dans notre modèle cellulaire l'effet du PBA sur l'agrégation des KIF dans les K-EBS, en cultivant ces cellules dans un format en plaque 96 puits, afin de nous assurer que le modèle d'étude est compatible avec des applications de criblage pharmacologique. Le traitement au PBA a ainsi entraîné une réduction d'environ 40% du nombre d'agrégats de kératines cytoplasmiques dans les K-EBS. Ce résultat nous a permis de démontrer la preuve de principe de l'utilisation de notre modèle pour des approches de screening, en plaque 96 puits ; néanmoins il serait intéressant de vérifier que cela est également possible dans un format 384 puits, plus classiquement utilisé pour du criblage à haut débit.

De manière intéressante, l'étude ayant fait état d'utilisation de PBA permettant d'induire une diminution des agrégats de kératines a également permis de diminuer l'expression de la cytokine IL-1 $\beta$  (Spörrer et al. 2019). Nous pourrions donc vérifier par la suite, sur notre modèle cellulaire, si le traitement au PBA permettrait d'induire une diminution d'autres cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires identifiées comme dérégulées dans les K-EBS, telles que CXCL10 et CXCL11. Si tel est le cas cela renforcerait le lien entre la présence d'agrégats de kératines et la composante inflammatoire dans l'EBS, ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques, notamment en ciblant la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$ , en utilisant des inhibiteurs JAK/STAT. De plus, si l'utilisation du PBA permet dans

notre modèle, une diminution de la sécrétion de CXCL10 et CXCL11, l'expression de ces chimiokines pro-inflammatoires pourraient donc être un marqueur pathologique compatible avec un criblage en utilisant une méthode d'évaluation de type  $\alpha$ -ELISA.

# Conclusion

En résumé, au cours de ces années de thèse, j'ai pu participer au développement d'un nouveau modèle d'étude cellulaire *in vitro*, en générant des kératinocytes dérivés d'hiPSc de patients atteints d'EBS (K-EBS) mutés au sein du gène *KRT5* et de patients sains (K-WT). Ce modèle relevant et pertinent pour la modélisation de l'EBS m'a permis par la suite d'étudier les mécanismes moléculaires causés par des mutations au sein du gène *KRT5*, grâce à une approche transcriptomique comparative de K-EBS et K-WT. Cela m'a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans l'organisation de la matrice extracellulaire, l'organisation des chromosomes et du packaging de l'ADN, et de manière majoritaire, dans la chimiotaxie cellulaire et la réponse inflammatoire. Par la suite, mes travaux ont porté sur l'étude de la composante inflammatoire à l'aide de notre nouveau modèle cellulaire, permettant de renforcer l'évidence de l'implication de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans l'EBS. De plus, j'ai pu établir un lien direct entre une mutation au sein du gène *KRT5* et la composante inflammatoire identifiée dans l'EBS, grâce à la génération d'une lignée isogénique à l'aide de la technologie d'édition du génome CRISPR-Cas9.



## Références bibliographiques

- Aasen, Trond, Angel Raya, Maria J. Barrero, Elena Garreta, Antonella Consiglio, Federico Gonzalez, Rita Vassena, et al. 2008. 'Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes'. *Nature Biotechnology* 26 (11): 1276–84. <https://doi.org/10.1038/nbt.1503>.
- Aberdam, Daniel. 2004. 'Derivation of Keratinocyte Progenitor Cells and Skin Formation from Embryonic Stem Cells.' *The International Journal of Developmental Biology* 48 (2–3): 203–6. <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272386>.
- Abitbol, Roxanne J., and Linda Hua Zhou. 2009. 'Treatment of Epidermolysis Bullosa Simplex, Weber-Cockayne Type, With Botulinum Toxin Type A'. *Archives of Dermatology* 145 (1): 13–15. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2008.546>.
- Albanesi, Cristina, Stefania Madonna, Paolo Gisondi, and Giampiero Girolomoni. 2018. 'The Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells in the Pathogenesis of Psoriasis'. *Frontiers in Immunology* 9 (July). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01549>.
- Aleemardani, Mina, Michael Zivojin Trikić, Nicola Helen Green, and Frederik Claeysens. 2021. 'The Importance of Mimicking Dermal-Epidermal Junction for Skin Tissue Engineering: A Review'. *Bioengineering* 8 (11): 148. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110148>.
- Alexeev, Vitali, Julio Cesar Salas-Alanis, Francis Palisson, Lila Mukhtarzada, Giulio Fortuna, Jouni Uitto, Andrew South, and Olga Igoucheva. 2017. 'Pro-Inflammatory Chemokines and Cytokines Dominate the Blister Fluid Molecular Signature in Patients with Epidermolysis Bullosa and Affect Leukocyte and Stem Cell Migration'. *Journal of Investigative Dermatology* 137 (11): 2298–2308. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.002>.
- Ali, Gowher, Ahmed K. Elsayed, Manjula Nandakumar, Mohammed Bashir, Ihab Younis, Yasmin Abu Aqel, Bushra Memon, et al. 2020. 'Keratinocytes Derived from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate the Genetic Signature of Psoriasis Disease'. *Stem Cells and Development* 29 (7): 383–400. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0150>.
- Anders, Carolin, Ole Niewoehner, Alessia Duerst, and Martin Jinek. 2014. 'Structural Basis of PAM-Dependent Target DNA Recognition by the Cas9 Endonuclease'. *Nature* 513 (7519): 569–73. <https://doi.org/10.1038/nature13579>.
- Annicchiarico, Giuseppina, Maria Grazia Morgese, Susanna Esposito, Giuseppe Lopalco, Michele Lattarulo, Marilina Tampoia, Domenico Bonamonte, et al. 2015. 'Proinflammatory Cytokines and Antiskin Autoantibodies in Patients With Inherited Epidermolysis Bullosa'. *Medicine* 94 (42): e1528. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001528>.
- Anton-Lamprecht, I., and U. W. Schnyder. 1982. 'Epidermolysis Bullosa Herpetiformis Dowling-Meara. Report of a Case and Pathomorphogenesis'. *Dermatologica* 164 (4): 221–35.
- Anzalone, Andrew V., Peyton B. Randolph, Jessie R. Davis, Alexander A. Sousa, Luke W. Koblan, Jonathan M. Levy, Peter J. Chen, et al. 2019. 'Search-and-Replace Genome Editing without Double-Strand Breaks or Donor DNA'. *Nature* 576 (7785): 149–57. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>.
- Aoi, Takashi, Kojiro Yae, Masato Nakagawa, Tomoko Ichisaka, Keisuke Okita, Kazutoshi Takahashi, Tsutomu Chiba, and Shinya Yamanaka. 2008. 'Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells'. *Science (New York, N.Y.)* 321 (5889): 699–702. <https://doi.org/10.1126/science.1154884>.
- Araki, Ryoko, Yuko Hoki, Masahiro Uda, Miki Nakamura, Yuko Jincho, Chihiro Tamura, Misato Sunayama, et al. 2011. 'Crucial Role of C-Myc in the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells'. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (9): 1362–70. <https://doi.org/10.1002/stem.685>.
- Arin, Meral Julia. 2009. 'The Molecular Basis of Human Keratin Disorders'. *Human Genetics* 125 (4): 355–73. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0646-5>.



- Arin, M.J., G. Grimberg, H. Schumann, H. De Almeida Jr, Y.-R. Chang, G. Tadini, J. Kohlhase, T. Krieg, L. Bruckner-Tuderman, and C. Has. 2010. 'Identification of Novel and Known KRT5 and KRT14 Mutations in 53 Patients with Epidermolysis Bullosa Simplex: Correlation between Genotype and Phenotype'. *British Journal of Dermatology* 162 (6): 1365–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09657.x>.
- Arroyo-Olarte, Ruben D., Ricardo Bravo Rodríguez, and Edgar Morales-Ríos. 2021. 'Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond'. *Microorganisms* 9 (4): 844. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040844>.
- Assou, Said, Nicolas Girault, Mathilde Plinet, Julien Bouckenheimer, Caroline Sansac, Marion Combe, Joffrey Mianné, et al. 2020. 'Recurrent Genetic Abnormalities in Human Pluripotent Stem Cells: Definition and Routine Detection in Culture Supernatant by Targeted Droplet Digital PCR'. *Stem Cell Reports* 14 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.12.004>.
- Atkinson, Sarah D., Victoria E. McGilligan, Haihui Liao, Ildiko Szeverenyi, Frances J. D. Smith, C. B. Tara Moore, and W. H. Irwin McLean. 2011. 'Development of Allele-Specific Therapeutic siRNA for Keratin 5 Mutations in Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Journal of Investigative Dermatology* 131 (10): 2079–86. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.169>.
- Aushev, Magomet, Ulrich Koller, Claudio Mussolino, Toni Cathomen, and Julia Reichelt. 2017. 'Traceless Targeting and Isolation of Gene-Edited Immortalized Keratinocytes from Epidermolysis Bullosa Simplex Patients'. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 6 (July): 112–23. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.06.008>.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, and Robin Lovell-Badge. 2003. 'Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function'. *Genes & Development* 17 (1): 126–40. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>.
- Avior, Yishai, Ido Sagi, and Nissim Benvenisty. 2016. 'Pluripotent Stem Cells in Disease Modelling and Drug Discovery'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (3): 170–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.27>.
- Badowski, Cedric, Tong San Tan, Teimur Aliev, David Trudil, Maria Larina, Victoria Argentova, Muhammad Jasrie Firdaus, Paula Benny, Vivien S. T. Woo, and E. Birgitte Lane. 2022. 'Detrimental Effects of IFN- $\gamma$  on an Epidermolysis Bullosa Simplex Cell Model and Protection by a Humanized Anti-IFN- $\gamma$  Monoclonal Antibody'. *JID Innovations* 2 (2): 100096. <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2022.100096>.
- Banerjee, Santasree, Qian Wu, Ping Yu, Ming Qi, and Chen Li. 2014. 'In Silico Analysis of All Point Mutations on the 2B Domain of K5/K14 Causing Epidermolysis Bullosa Simplex: A Genotype-Phenotype Correlation'. *Molecular bioSystems* 10 (10): 2567–77. <https://doi.org/10.1039/c4mb00138a>.
- Banito, Ana, Sheikh T. Rashid, Juan Carlos Acosta, SiDe Li, Carlos F. Pereira, Imbisaat Geti, Sandra Pinho, et al. 2009. 'Senescence Impairs Successful Reprogramming to Pluripotent Stem Cells'. *Genes & Development* 23 (18): 2134–39. <https://doi.org/10.1101/gad.1811609>.
- Bardhan, Ajoy, Leena Bruckner-Tuderman, Iain L. C. Chapple, Jo-David Fine, Natasha Harper, Cristina Has, Thomas M. Magin, et al. 2020a. 'Epidermolysis Bullosa'. *Nature Reviews Disease Primers* 6 (1): 78. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0210-0>.
- Barmada, Sami J., Andrea Serio, Arpana Arjun, Bilada Bilican, Aaron Daub, D. Michael Ando, Andrey Tsvetkov, et al. 2014. 'Autophagy Induction Enhances TDP43 Turnover and Survival in Neuronal ALS Models'. *Nature Chemical Biology* 10 (8): 677–85. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1563>.
- Baroni, Adone, Elisabetta Buommino, Vincenza De Gregorio, Eleonora Ruocco, Vincenzo Ruocco, and Ronni Wolf. 2012. 'Structure and Function of the Epidermis Related to Barrier Properties'. *Clinics in Dermatology* 30 (3): 257–62. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, and Philippe Horvath. 2007. 'CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes'. *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819): 1709–12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.

- Bassett, Andrew R. 2017. 'Editing the Genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: Disease Models'. *Mammalian Genome* 28 (7): 348–64. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9684-9>.
- Baum, Christopher. 2007. 'Insertional Mutagenesis in Gene Therapy and Stem Cell Biology'. *Current Opinion in Hematology* 14 (4): 337–42. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3281900f01>.
- Bchetnia, Mbarka, Rebecca Dionne Gagné, Julie Powell, Charles Morin, Catherine McCuaig, Audrey Dupérée, Lucie Germain, Jacques P. Tremblay, and Catherine Laprise. 2022. 'Allele-Specific Inactivation of an Autosomal Dominant Epidermolysis Bullosa Simplex Mutation Using CRISPR-Cas9'. *The CRISPR Journal* 5 (4): 586–97. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0132>.
- Bchetnia, Mbarka, Laurie Martineau, Véronique Racine, Julie Powell, Catherine McCuaig, Charles Morin, Audrey Dupérée, François Gros-Louis, and Catherine Laprise. 2022. 'Generation of Two Induced Pluripotent Stem Cell Lines (UQACi002-A and UQACi005-A) from Two Patients with KRT14 Epidermolysis Bullosa Simplex Mutations'. *Stem Cell Research* 61 (May): 102750. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102750>.
- Bchetnia, Mbarka, Laurie Martineau, Véronique Racine, Julie Powell, Catherine McCuaig, Jack Puymirat, and Catherine Laprise. 2020. 'Génération d'une Lignée de Cellules Souches Pluripotentes Induites Par l'homme (UQACi001-A) à Partir d'un Patient Atteint d'épidermolyse Bulleuse Simplex Sévère Présentant La Mutation Hétérozygote p.R125S Dans Le Gène KRT 14'. *Stem Cell Research* 44 (April): 101748. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101748>.
- Beattie, Gillian M., Ana D. Lopez, Nathan Bucay, Andrew Hinton, Meri T. Firpo, Charles C. King, and Alberto Hayek. 2005. 'Activin A Maintains Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells in the Absence of Feeder Layers'. *STEM CELLS* 23 (4): 489–95. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0279>.
- Bento, Guida, Aygul K. Shafigullina, Albert A. Rizvanov, Vilma A. Sardão, Maria Paula Macedo, and Paulo J. Oliveira. 2020. 'Urine-Derived Stem Cells: Applications in Regenerative and Predictive Medicine'. *Cells* 9 (3): 573. <https://doi.org/10.3390/cells9030573>.
- Berault, Daniel R., Oualid Haddad, John V. McCuaig, Zachary J. Robinson, David Russell, E. Birgitte Lane, and Douglas S. Fudge. 2012. 'The Mechanical Behavior of Mutant K14-R125P Keratin Bundles and Networks in NEB-1 Keratinocytes'. *PLOS ONE* 7 (2): e31320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031320>.
- Bertero, Alessandro, Pedro Madrigal, Antonella Galli, Nina C. Hubner, Inmaculada Moreno, Deborah Burks, Stephanie Brown, et al. 2015. 'Activin/Nodal Signaling and NANOG Orchestrate Human Embryonic Stem Cell Fate Decisions by Controlling the H3K4me3 Chromatin Mark'. *Genes & Development* 29 (7): 702–17. <https://doi.org/10.1101/gad.255984.114>.
- Berthault, Camille, Sonia Gaucher, Olivier Gouin, Alain Schmitt, Mei Chen, David Woodley, Matthias Titeux, Alain Hovnanian, and Araksya Izmiryan. 2023. 'Highly Efficient Ex Vivo Correction of COL7A1 through Ribonucleoprotein-Based CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair to Treat Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa'. *The Journal of Investigative Dermatology*, December, S0022-202X(23)03117-2. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2023.10.035>.
- Bikle, Daniel D, Zhongjian Xie, and Chia-Ling Tu. 2012. 'Calcium Regulation of Keratinocyte Differentiation'. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 7 (4): 461–72. <https://doi.org/10.1586/eem.12.34>.
- Blanpain, Cédric, and Elaine Fuchs. 2009. 'Epidermal Homeostasis: A Balancing Act of Stem Cells in the Skin'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (3): 207–17. <https://doi.org/10.1038/nrm2636>.
- Bohnekamp, Jens, Diane E. Cryderman, Achim Paululat, Gabriel C. Baccam, Lori L. Wallrath, and Thomas M. Magin. 2015. 'A Drosophila Model of Epidermolysis Bullosa Simplex'. *The Journal of Investigative Dermatology* 135 (8): 2031–39. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.129>.
- Bolling, M.C., H.H. Lemmink, G.H.L. Jansen, and M.F. Jonkman. 2011. 'Mutations in KRT5 and KRT14 Cause Epidermolysis Bullosa Simplex in 75% of the Patients'. *British Journal of Dermatology* 164 (3): 637–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10146.x>.

- Bonafont, Jose, Angeles Mencía, Esteban Chacón-Solano, Wai Srifa, Sriram Vaidyanathan, Rosa Romano, Marta Garcia, et al. 2021. 'Correction of Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa by Homology-Directed Repair-Mediated Genome Editing'. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 29 (6): 2008–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.02.019>.
- Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. 2005. 'Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells'. *Cell* 122 (6): 947–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>.
- Bragulla, Hermann H, and Dominique G Homberger. 2009. 'Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia'. *Journal of Anatomy* 214 (4): 516–59. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>.
- Brenin, D., J. Look, M. Bader, N. Hübner, G. Levan, and P. Iannaccone. 1997. 'Rat Embryonic Stem Cells: A Progress Report'. *Transplantation Proceedings* 29 (3): 1761–65. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(97\)00046-8](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(97)00046-8).
- Briggaman, Robert A, and Clayton E Wheeler. 1975. 'The Epidermal-Dermal Junction'. *Journal of Investigative Dermatology* 65 (1): 71–84. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12598050>.
- Brouwer, Marinka, Huiqing Zhou, and Nael Nadif Kasri. 2016. 'Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies'. *Stem Cell Reviews and Reports* 12 (1): 54–72. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9622-8>.
- Brown, C. H. 1950. 'Keratins in Invertebrates'. *Nature* 166 (4219): 439. <https://doi.org/10.1038/166439a0>.
- Bruckner-Tuderman, L., B. Höpfner, and N. Hammami-Hauasli. 1999. 'Biology of Anchoring Fibrils: Lessons from Dystrophic Epidermolysis Bullosa'. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 18 (1): 43–54. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(98\)00007-9](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(98)00007-9).
- Bruckner-Tuderman, Leena. 2010. 'Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Pathogenesis and Clinical Features'. *Dermatologic Clinics* 28 (1): 107–14. <https://doi.org/10.1016/j.det.2009.10.020>.
- Bruckner-Tuderman, Leena, John A. McGrath, E. Clare Robinson, and Jouni Uitto. 2010. 'Animal Models of Epidermolysis Bullosa: Update 2010'. *Journal of Investigative Dermatology* 130 (6): 1485–88. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.75>.
- Brun, Jennifer, Christine Chiaverini, Caroline Devos, Stéphanie Leclerc-Mercier, Juliette Mazereeuw, Emmanuelle Bourrat, Annabel Maruani, et al. 2017. 'Pain and Quality of Life Evaluation in Patients with Localized Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12 (June): 119. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0666-5>.
- Candi, E., E. Tarcsa, J. J. Digiovanna, J. G. Compton, P. M. Elias, L. N. Marekov, and P. M. Steinert. 1998. 'A Highly Conserved Lysine Residue on the Head Domain of Type II Keratins Is Essential for the Attachment of Keratin Intermediate Filaments to the Cornified Cell Envelope through Isopeptide Crosslinking by Transglutaminases'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5): 2067–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2067>.
- Cao, Tongyu, Mary Ann Longley, Xiao-Jing Wang, and Dennis R. Roop. 2001. 'An Inducible Mouse Model for Epidermolysis Bullosa Simplex'. *The Journal of Cell Biology* 152 (3): 651–56.
- Castela, E., M. K. Tulic, A. Rozières, E. Bourrat, J.-F. Nicolas, J. Kanitakis, P. Vabres, et al. 2019. 'Epidermolysis Bullosa Simplex Generalized Severe Induces a T Helper 17 Response and Is Improved by Apremilast Treatment'. *British Journal of Dermatology* 180 (2): 357–64. <https://doi.org/10.1111/bjd.16897>.
- Cattaneo, C., E. Enzo, L. De Rosa, L. Sercia, F. Consiglio, M. Forcato, S. Bicciato, et al. 2024. 'Allele-Specific CRISPR-Cas9 Editing of Dominant Epidermolysis Bullosa Simplex in Human Epidermal Stem Cells'. *Molecular Therapy* 32 (2): 372–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.11.027>.
- Chambard, Jean-Claude, Renaud Lefloch, Jacques Pouyssegur, and Philippe Lenormand. 2007. 'ERK Implication in Cell Cycle Regulation'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease*, 1773 (8): 1299–1310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.010>.

- Chamcheu, J.C., M. Virtanen, H. Navsaria, P.E. Bowden, A. Vahlquist, and H. Törmä. 2010. 'Epidermolysis Bullosa Simplex Due to KRT5 Mutations: Mutation-related Differences in Cellular Fragility and the Protective Effects of Trimethylamine N-oxide in Cultured Primary Keratinocytes'. *British Journal of Dermatology* 162 (5): 980–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09615.x>.
- Chamcheu, Jean Christopher, Elizabeth Pavez Lorié, Baki Akgul, Elin Bannbers, Marie Virtanen, Luke Gammon, Aristidis Moustakas, Harshad Navsaria, Anders Vahlquist, and Hans Törmä. 2009a. 'Characterization of Immortalized Human Epidermolysis Bullosa Simplex (KRT5) Cell Lines: Trimethylamine N-Oxide Protects the Keratin Cytoskeleton against Disruptive Stress Condition'. *Journal of Dermatological Science* 53 (3): 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.11.003>.
- Chamcheu, Jean Christopher, Harshad Navsaria, Inger Pihl-Lundin, Mirjana Liovic, Anders Vahlquist, and Hans Törmä. 2011a. 'Chemical Chaperones Protect Epidermolysis Bullosa Simplex Keratinocytes from Heat Stress-Induced Keratin Aggregation: Involvement of Heat Shock Proteins and MAP Kinases'. *Journal of Investigative Dermatology* 131 (8): 1684–91. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.93>.
- Chamcheu, Jean Christopher, Imtiaz A. Siddiqui, Deeba N. Syed, Vaqar M. Adhami, Mirjana Liovic, and Hasan Mukhtar. 2011. 'Keratin Gene Mutations in Disorders of Human Skin and Its Appendages'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508 (2): 123–37. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.019>.
- Chan, Y., I. Anton-Lamprecht, Q. C. Yu, A. Jäckel, B. Zabel, J. P. Ernst, and E. Fuchs. 1994. 'A Human Keratin 14 "Knockout": The Absence of K14 Leads to Severe Epidermolysis Bullosa Simplex and a Function for an Intermediate Filament Protein'. *Genes & Development* 8 (21): 2574–87. <https://doi.org/10.1101/gad.8.21.2574>.
- Chanda, Soham, Cheen Euong Ang, Jonathan Davila, ChangHui Pak, Moritz Mall, Qian Yi Lee, Henrik Ahlenius, Seung Woo Jung, Thomas C. Südhof, and Marius Wernig. 2014. 'Generation of Induced Neuronal Cells by the Single Reprogramming Factor ASCL1'. *Stem Cell Reports* 3 (2): 282–96. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.020>.
- Chaplin, George, Nina G. Jablonski, Robert W. Sussman, and Elizabeth A. Kelley. 2013. 'The Role of Piloerection in Primate Thermoregulation'. *Folia Primatologica* 85 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1159/000355007>.
- Choi, Moonju, and Choongho Lee. 2015. 'Immortalization of Primary Keratinocytes and Its Application to Skin Research'. *Biomolecules & Therapeutics* 23 (5): 391–99. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.038>.
- Cong, Le, and Feng Zhang. 2015. 'Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System'. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1239: 197–217. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10).
- Coulombe, P A, M E Hutton, R Vassar, and E Fuchs. 1991. 'A Function for Keratins and a Common Thread among Different Types of Epidermolysis Bullosa Simplex Diseases.' *The Journal of Cell Biology* 115 (6): 1661–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.6.1661>.
- Coulombe, Pierre A., M. Elizabeth Hutton, Anthony Letal, Adelaide Hebert, Amy S. Paller, and Elaine Fuchs. 1991. 'Point Mutations in Human Keratin 14 Genes of Epidermolysis Bullosa Simplex Patients: Genetic and Functional Analyses'. *Cell* 66 (6): 1301–11. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90051-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90051-Y).
- Coulombe, Pierre A., Michelle L. Kerns, and Elaine Fuchs. 2009. 'Epidermolysis Bullosa Simplex: A Paradigm for Disorders of Tissue Fragility'. *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1784–93. <https://doi.org/10.1172/JCI38177>.
- Coulombe, Pierre A., and Chang-Hun Lee. 2012. 'Defining Keratin Protein Function in Skin Epithelia: Epidermolysis Bullosa Simplex and Its Aftermath'. *The Journal of Investigative Dermatology* 132 (3 Pt 2): 763–75. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.450>.

- Coulombe, Pierre A., and M. Bishr Omary. 2002. "Hard" and "Soft" Principles Defining the Structure, Function and Regulation of Keratin Intermediate Filaments'. *Current Opinion in Cell Biology* 14 (1): 110–22. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(01\)00301-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(01)00301-5).
- Coutier, Julien, Manon Bonnette, Sabrina Martineau, Aurélie Mercadier, Sophie Domingues, Manoubia Saidani, Margot Jarrige, et al. 2022. 'Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Keratinocytes, a Useful Model to Identify and Explore the Pathological Phenotype of Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Journal of Investigative Dermatology* 142 (10): 2695–2705.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.04.009>.
- D'Alessandro, Mariella, David Russell, Susan M. Morley, Anthony M. Davies, and E. Birgitte Lane. 2002. 'Keratin Mutations of Epidermolysis Bullosa Simplex Alter the Kinetics of Stress Response to Osmotic Shock'. *Journal of Cell Science* 115 (22): 4341–51. <https://doi.org/10.1242/jcs.00120>.
- D'Amour, Kevin A., Alan D. Agulnick, Susan Eliazar, Olivia G. Kelly, Evert Kroon, and Emmanuel E. Baetge. 2005. 'Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Definitive Endoderm'. *Nature Biotechnology* 23 (12): 1534–41. <https://doi.org/10.1038/nbt1163>.
- De Benedetti, Fabrizio, Giusi Prencipe, Claudia Bracaglia, Emiliano Marasco, and Alexei A. Grom. 2021. 'Targeting Interferon- $\gamma$  in Hyperinflammation: Opportunities and Challenges'. *Nature Reviews Rheumatology* 17 (11): 678–91. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00694-z>.
- De Masi, Claudia, Paola Spitalieri, Michela Murdocca, Giuseppe Novelli, and Federica Sangiuolo. 2020. 'Application of CRISPR/Cas9 to Human-Induced Pluripotent Stem Cells: From Gene Editing to Drug Discovery'. *Human Genomics* 14 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/s40246-020-00276-2>.
- De Rosa, Laura, Maria Carmela Latella, Alessia Secone Seconetti, Cecilia Cattelani, Johann W. Bauer, Sergio Bondanza, and Michele De Luca. 2020. 'Toward Combined Cell and Gene Therapy for Genodermatoses'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12 (5): a035667. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035667>.
- Devito, Liani, Matthew Donne, Nikola Kolundzic, Preeti Khurana, Carl Hobbs, Gabriel Kaddour, Sandrine Dubrac, et al. 2018. 'Induced Pluripotent Stem Cell Line from an Atopic Dermatitis Patient Heterozygous for c.2282del4 Mutation in Filaggrin: KCLi001-A'. *Stem Cell Research* 31 (August): 122–26. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.07.014>.
- Deyrieux, Adeline F., and V. G. Wilson. 2007. 'In Vitro Culture Conditions to Study Keratinocyte Differentiation Using the HaCaT Cell Line'. *Cytotechnology* 54 (2): 77–83. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9076-1>.
- Doganyigit, Zuleyha, Ece Eroglu, and Asli Okan. 2023. 'Intermediate Filament Proteins Are Reliable Immunohistological Biomarkers to Help Diagnose Multiple Tissue-Specific Diseases'. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 52 (5): 655–72. <https://doi.org/10.1111/ahe.12937>.
- Doman, Jordan L., Alexander A. Sousa, Peyton B. Randolph, Peter J. Chen, and David R. Liu. 2022. 'Designing and Executing Prime Editing Experiments in Mammalian Cells'. *Nature Protocols* 17 (11): 2431–68. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00724-4>.
- Domingues, Sophie, Annabelle Darle, Yolande Masson, Manoubia Saidani, Emilie Lagoutte, Ana Bejanariu, Julien Coutier, et al. 2022. 'Clinical Grade Human Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Skin Substitutes Promote Keratinocytes Wound Closure In Vitro'. *Cells* 11 (7): 1151. <https://doi.org/10.3390/cells11071151>.
- Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. 2014. 'Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9'. *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213): 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- Dowling, G. B., and R. H. Meara. 1954. 'Epidermolysis Bullosa Resembling Juvenile Dermatitis Herpetiformis'. *The British Journal of Dermatology* 66 (4): 139–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1954.tb12605.x>.
- Echeverría-García, Begoña, Asunción Vicente, Ángela Hernández, Jose M. Mascaró, Isabel Colmenero, Ana Terrón, María J. Escámez, Marcela del Río, María A. González-Enseñat, and Antonio Torrelo. 2013. 'Epidermolysis Bullosa Simplex with Mottled Pigmentation: A Family Report

- and Review'. *Pediatric Dermatology* 30 (6): e125–31. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2012.01748.x>.
- Eckert, R. L. 1988. 'Sequence of the Human 40-kDa Keratin Reveals an Unusual Structure with Very High Sequence Identity to the Corresponding Bovine Keratin'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (4): 1114–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1114>.
- Eckhart, Leopold, Saskia Lippens, Erwin Tschachler, and Wim Declercq. 2013. 'Cell Death by Cornification'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (12): 3471–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.010>.
- El Hachem, May, Giovanna Zambruno, Eva Bourdon-Lanoy, Annalisa Ciasulli, Christiane Buisson, Smail Hadj-Rabia, Andrea Diociaiuti, et al. 2014. 'Multicentre Consensus Recommendations for Skin Care in Inherited Epidermolysis Bullosa'. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (May): 76. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-76>.
- Eminli, Sarah, Jochen Utikal, Katrin Arnold, Rudolf Jaenisch, and Konrad Hochedlinger. 2008. 'Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression'. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (10): 2467–74. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0317>.
- Erceg Ivkošić, Ivana, Rajko Fureš, Vesna Čosić, Nika Mikelin, Luka Bulić, Domagoj Dobranić, Petar Brlek, and Dragan Primorac. 2023. 'Unlocking the Potential of Mesenchymal Stem Cells in Gynecology: Where Are We Now?' *Journal of Personalized Medicine* 13 (8): 1253. <https://doi.org/10.3390/jpm13081253>.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. 'Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos'. *Nature* 292 (5819): 154–56. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
- Fagerberg, Linn, Björn M. Hallström, Per Oksvold, Caroline Kampf, Dijana Djureinovic, Jacob Odeberg, Masato Habuka, et al. 2014. 'Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics'. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (2): 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>.
- Falabella, Anna F., Lawrence A. Schachner, Isabel C. Valencia, and William H. Eaglstein. 1999. 'The Use of Tissue-Engineered Skin (Apligraf) to Treat a Newborn With Epidermolysis Bullosa'. *Archives of Dermatology* 135 (10). <https://doi.org/10.1001/archderm.135.10.1219>.
- Fine, Jo-David. 2016. 'Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry'. *JAMA Dermatology* 152 (11): 1231–38. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.2473>.
- Fine, Jo-David, Leena Bruckner-Tuderman, Robin A.J. Eady, Eugene A. Bauer, Johann W. Bauer, Cristina Has, Adrian Heagerty, et al. 2014. 'Inherited Epidermolysis Bullosa: Updated Recommendations on Diagnosis and Classification'. *Journal of the American Academy of Dermatology* 70 (6): 1103–26. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.01.903>.
- Fine, Jo-David, Lorraine B. Johnson, Madeline Weiner, Kuo-Ping Li, and Chirayath Suchindran. 2009. 'Epidermolysis Bullosa and the Risk of Life-Threatening Cancers: The National EB Registry Experience, 1986-2006'. *Journal of the American Academy of Dermatology* 60 (2): 203–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.09.035>.
- Ford, Christine A., Angela M. Stanfield, Richard J. Spelman, Bronwyn Smits, Alexandra E. L. Ankersmidt-Udy, Kenneth Cottier, Hilary Holloway, et al. 2005. 'A Mutation in Bovine Keratin 5 Causing Epidermolysis Bullosa Simplex, Transmitted by a Mosaic Sire'. *Journal of Investigative Dermatology* 124 (6): 1170–76. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23610.x>.
- Fuchs, E., and H. Green. 1980. 'Changes in Keratin Gene Expression during Terminal Differentiation of the Keratinocyte'. *Cell* 19 (4): 1033–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90094-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90094-x).
- Fusaki, Noemi, Hiroshi Ban, Akiyo Nishiyama, Koichi Saeki, and Mamoru Hasegawa. 2009. 'Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus That Does Not Integrate into the Host Genome'. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 85 (8): 348–62. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>.

- Gardner, R. L., and F. A. Brook. 1997. 'Reflections on the Biology of Embryonic Stem (ES) Cells'. *The International Journal of Developmental Biology* 41 (2): 235–43.
- Gaudelli, Nicole M., Alexis C. Komor, Holly A. Rees, Michael S. Packer, Ahmed H. Badran, David I. Bryson, and David R. Liu. 2017. 'Programmable Base Editing of A•T to G•C in Genomic DNA without DNA Cleavage'. *Nature* 551 (7681): 464–71. <https://doi.org/10.1038/nature24644>.
- Geerts, Dirk, Lionel Fontao, Mirjam G. Nievers, Roel Q.J. Schaapveld, Patricia E. Purkis, Grant N. Wheeler, E. Birgitte Lane, Irene M. Leigh, and Arnoud Sonnenberg. 1999. 'Binding of Integrin A6 $\beta$ 4 to Plectin Prevents Plectin Association with F-Actin but Does Not Interfere with Intermediate Filament Binding'. *The Journal of Cell Biology* 147 (2): 417–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.417>.
- Giustizieri, M. L., F. Mascia, A. Frezzolini, O. De Pità, L. M. Chinni, A. Giannetti, G. Girolomoni, and S. Pastore. 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): 871–77. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114707>.
- Gnedeva, Ksenia, Ekaterina Vorotelyak, Flavio Cimadamore, Giulio Cattarossi, Elena Giusto, Vasiliy V. Terskikh, and Alexey V. Terskikh. 2015. 'Derivation of Hair-Inducing Cell from Human Pluripotent Stem Cells'. Edited by Austin John Cooney. *PLOS ONE* 10 (1): e0116892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116892>.
- Gonzalez, Mercedes E. 2013. 'Evaluation and Treatment of the Newborn with Epidermolysis Bullosa'. *Seminars in Perinatology, Dermatology in Infants*, 37 (1): 32–39. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2012.11.004>.
- Green, Howard, Karen Easley, and Shiro Iuchi. 2003. 'Marker Succession during the Development of Keratinocytes from Cultured Human Embryonic Stem Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (26): 15625–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307226100>.
- Guenou, Hind, Xavier Nissan, Fernando Larcher, Jessica Feteira, Gilles Lemaitre, Manoubia Saidani, Marcela Del Rio, et al. 2009. 'Human Embryonic Stem-Cell Derivatives for Full Reconstruction of the Pluristratified Epidermis: A Preclinical Study'. *The Lancet* 374 (9703): 1745–53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61496-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61496-3).
- Gurdon, J. B. 1962. 'The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles'. *Development* 10 (4): 622–40. <https://doi.org/10.1242/dev.10.4.622>.
- Haapaniemi, Emma, Sandeep Botla, Jenna Persson, Bernhard Schmierer, and Jussi Taipale. 2018. 'CRISPR–Cas9 Genome Editing Induces a P53-Mediated DNA Damage Response'. *Nature Medicine* 24 (7): 927–30. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>.
- Haines, Rebecca L., and E. Birgitte Lane. 2012. 'Keratins and Disease at a Glance'. *Journal of Cell Science* 125 (17): 3923–28. <https://doi.org/10.1242/jcs.099655>.
- Halliwell, Jason, Ivana Barbaric, and Peter W. Andrews. 2020. 'Acquired Genetic Changes in Human Pluripotent Stem Cells: Origins and Consequences'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 21 (12): 715–28. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00292-z>.
- Hammelman, Jennifer, Tulsi Patel, Michael Closser, Hynek Wichterle, and David Gifford. 2022. 'Ranking Reprogramming Factors for Cell Differentiation'. *Nature Methods* 19 (7): 812–22. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01522-2>.
- Hammersen, Johanna, Cristina Has, Nora Naumann-Bartsch, Daniel Stachel, Dimitra Kiritsi, Stephan Söder, Mathilde Tardieu, Markus Metzler, Leena Bruckner-Tuderman, and Holm Schneider. 2016. 'Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa'. *The Journal of Investigative Dermatology* 136 (11): 2150–57. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.06.609>.
- Han, Ji Woong, and Young-Sup Yoon. 2011. 'Induced Pluripotent Stem Cells: Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming'. *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (7): 1799–1820. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3814>.

- Has, C., J.W. Bauer, C. Bodemer, M.C. Bolling, L. Bruckner-Tuderman, A. Diem, J.-D. Fine, et al. 2020. 'Consensus Reclassification of Inherited Epidermolysis Bullosa and Other Disorders with Skin Fragility'. *British Journal of Dermatology* 183 (4): 614–27. <https://doi.org/10.1111/bjd.18921>.
- Has, C., L. Liu, M.C. Bolling, A.V. Charlesworth, M. El Hachem, M.J. Escámez, I. Fuentes, et al. 2020. 'Clinical Practice Guidelines for Laboratory Diagnosis of Epidermolysis Bullosa'. *The British Journal of Dermatology* 182 (3): 574–92. <https://doi.org/10.1111/bjd.18128>.
- Has, Cristina, and Leena Bruckner-Tuderman. 2014. 'The Genetics of Skin Fragility'. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 15: 245–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025540>.
- Has, Cristina, and Judith Fischer. 2019. 'Inherited Epidermolysis Bullosa: New Diagnostics and New Clinical Phenotypes'. *Experimental Dermatology* 28 (10): 1146–52. <https://doi.org/10.1111/exd.13668>.
- Hatzfeld, M., and M. Burba. 1994. 'Function of Type I and Type II Keratin Head Domains: Their Role in Dimer, Tetramer and Filament Formation'. *Journal of Cell Science* 107 ( Pt 7) (July): 1959–72. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.7.1959>.
- Hawkes, Jason E., Tom C. Chan, and James G. Krueger. 2017. 'Psoriasis Pathogenesis and the Development of Novel, Targeted Immune Therapies'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (3): 645–53. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.004>.
- Henry, Marianne P., J. Ross Hawkins, Jennifer Boyle, and Joanna M. Bridger. 2018. 'The Genomic Health of Human Pluripotent Stem Cells: Genomic Instability and the Consequences on Nuclear Organization'. *Frontiers in Genetics* 9: 623. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00623>.
- Herrmann, Harald, and Ueli Aebi. 2016. 'Intermediate Filaments: Structure and Assembly'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (11): a018242. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018242>.
- Hewitt, Kyle J., Yulia Shamis, Ryan B. Hayman, Mariam Margvelashvili, Shumin Dong, Mark W. Carlson, and Jonathan A. Garlick. 2011. 'Epigenetic and Phenotypic Profile of Fibroblasts Derived from Induced Pluripotent Stem Cells'. Edited by Andy Lau. *PLoS ONE* 6 (2): e17128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017128>.
- Hiremagalore, R., A. Kubba, S. Bansel, and H. Jerajani. 2015. 'Immunofluorescence Mapping in Inherited Epidermolysis Bullosa: A Study of 86 Cases from India'. *British Journal of Dermatology* 172 (2): 384–91. <https://doi.org/10.1111/bjd.13305>.
- Ho, Minh, Brian Thompson, Jeffrey Nicholas Fisk, Daniel W. Nebert, Elspeth A. Bruford, Vasilis Vasiliou, and Christopher G. Bunick. 2022. 'Update of the Keratin Gene Family: Evolution, Tissue-Specific Expression Patterns, and Relevance to Clinical Disorders'. *Human Genomics* 16 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s40246-021-00374-9>.
- Hobbs, Ryan P., Juliane C. Lessard, and Pierre A. Coulombe. 2012. 'Keratin Intermediate Filament Proteins – Novel Regulators of Inflammation and Immunity in Skin'. *Journal of Cell Science* 125 (22): 5257–58. <https://doi.org/10.1242/jcs.122929>.
- Holahan, Heather M., Ronda S. Farah, Nkanyenzi N. Ferguson, Amy S. Paller, and Allison A. Legler. 2016. 'Treatment of Symptomatic Epidermolysis Bullosa Simplex with Botulinum Toxin in a Pediatric Patient'. *JAAD Case Reports* 2 (3): 259–60. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2016.05.003>.
- Homberg, Melanie, and Thomas M. Magin. 2014. 'Beyond Expectations: Novel Insights into Epidermal Keratin Function and Regulation'. *International Review of Cell and Molecular Biology* 311: 265–306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800179-0.00007-6>.
- Homberg, Melanie, Lena Ramms, Nicole Schwarz, Georg Dreissen, Rudolf E. Leube, Rudolf Merkel, Bernd Hoffmann, and Thomas M. Magin. 2015. 'Distinct Impact of Two Keratin Mutations Causing Epidermolysis Bullosa Simplex on Keratinocyte Adhesion and Stiffness'. *Journal of Investigative Dermatology* 135 (10): 2437–45. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.184>.



- Hu, Johnny H., Shannon M. Miller, Maarten H. Geurts, Weixin Tang, Liwei Chen, Ning Sun, Christina M. Zeina, et al. 2018. 'Evolved Cas9 Variants with Broad PAM Compatibility and High DNA Specificity'. *Nature* 556 (7699): 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature26155>.
- Huang, Tony P., Kevin T. Zhao, Shannon M. Miller, Nicole M. Gaudelli, Benjamin L. Oakes, Christof Fellmann, David F. Savage, and David R. Liu. 2019. 'Circularly Permuted and PAM-Modified Cas9 Variants Broaden the Targeting Scope of Base Editors'. *Nature Biotechnology* 37 (6): 626–31. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0134-y>.
- Huang, Tyng-Shyan, Li Li, Lilian Moalim-Nour, Deyong Jia, Jian Bai, Zemin Yao, Steffany A. L. Bennett, Daniel Figeys, and Lisheng Wang. 2015. 'A Regulatory Network Involving  $\beta$ -Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling'. *Stem Cells* 33 (5): 1419–33. <https://doi.org/10.1002/stem.1944>.
- Huitema, Leonie, Taylor Phillips, Vitali Alexeev, and Olga Igoucheva. 2021. 'Immunological Mechanisms Underlying Progression of Chronic Wounds in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa'. *Experimental Dermatology* 30 (12): 1724–33. <https://doi.org/10.1111/exd.14411>.
- Ibrahim, Michel R., Walid Medhat, Hasan El-Fakahany, Hamza Abdel-Raouf, and Evan Y. Snyder. 2020. 'Deriving Keratinocyte Progenitor Cells and Keratinocytes from Human-Induced Pluripotent Stem Cells'. *Current Protocols in Stem Cell Biology* 54 (1): e119. <https://doi.org/10.1002/cpsc.119>.
- Ilic, Dusko, and Caroline Ogilvie. 2017. 'Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?' *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1002/stem.2450>.
- Irion, S., M. C. Nostro, S. J. Kattman, and G. M. Keller. 2008. 'Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells: From Developmental Biology to Therapeutic Applications'. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73: 101–10. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.065>.
- Irvine, A. D., and W. H. McLean. 1999. 'Human Keratin Diseases: The Increasing Spectrum of Disease and Subtlety of the Phenotype-Genotype Correlation'. *The British Journal of Dermatology* 140 (5): 815–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02810.x>.
- Ishida-Yamamoto, Akemi, John A McGrath, Stephen J Chapman, Iren M Leigh, E Birgitte Lane, and Robin A J Eady. 1991. 'Epidermolysis Bullosa Simplex (Dowling-Meara Type) Is a Genetic Disease Characterized by an Abnormal Keratin-Filament Network Involving Keratins K5 and K14'. *Journal of Investigative Dermatology* 97 (6): 959–68. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12491885>.
- Itoh, Munenari, Maija Kiuru, Mitchell S. Cairo, and Angela M. Christiano. 2011. 'Generation of Keratinocytes from Normal and Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa-Induced Pluripotent Stem Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (21): 8797–8802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100332108>.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, and N. Benvenisty. 2000. 'Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Compromising the Three Embryonic Germ Layers'. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 6 (2): 88–95.
- Jacków, Joanna, Zongyou Guo, Corey Hansen, Hasan E. Abaci, Yanne S. Doucet, Jung U Shin, Ryota Hayashi, et al. 2019. 'CRISPR/Cas9-Based Targeted Genome Editing for Correction of Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using iPS Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (52): 26846–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907081116>.
- Janik, Edyta, Marcin Niemcewicz, Michal Ceremuga, Lukasz Krzowski, Joanna Saluk-Bijak, and Michal Bijak. 2020. 'Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9'. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 9604. <https://doi.org/10.3390/ijms21249604>.

- Jiang, Fuguo, and Jennifer A. Doudna. 2017. 'CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms'. *Annual Review of Biophysics* 46 (May): 505–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity'. *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Johnson, Amanda L., Samuel M. Peterson, Margaret M.L. Terry, Betsy Ferguson, Lois M. Colgin, and Anne D. Lewis. 2020. 'Spontaneous KRT5 Gene Mutation in Rhesus Macaques (*Macaca Mulatta*): A Novel Nonhuman Primate Model of Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Veterinary Pathology* 57 (2): 344–48. <https://doi.org/10.1177/0300985819900354>.
- Kajiya, Hiroyoshi, Nobuhiko Tanaka, Toyoko Inazumi, Yoshiyuki Seyama, Shingo Tajima, and Akira Ishibashi. 1997. 'Cultured Human Keratinocytes Express Tropoelastin'. *Journal of Investigative Dermatology* 109 (5): 641–44. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12337639>.
- Kanda, Naoko, Teruo Shimizu, Yayoi Tada, and Shinichi Watanabe. 2007. 'IL-18 Enhances IFN- $\gamma$ -Induced Production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in Human Keratinocytes'. *European Journal of Immunology* 37 (2): 338–50. <https://doi.org/10.1002/eji.200636420>.
- Karagiannis, Peter, Kazutoshi Takahashi, Megumu Saito, Yoshinori Yoshida, Keisuke Okita, Akira Watanabe, Haruhisa Inoue, et al. 2019. 'Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development'. *Physiological Reviews* 99 (1): 79–114. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017>.
- Keith, Allison R., Kirk Twaroski, Christen L. Ebens, and Jakub Tolar. 2020. 'Leading Edge: Emerging Drug, Cell, and Gene Therapies for Junctional Epidermolysis Bullosa'. *Expert Opinion on Biological Therapy* 20 (8): 911–23. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1740678>.
- Khurana, Preeti, Nikola Kolundzic, Carsten Flohr, and Dusko Ilic. 2021. 'Human Pluripotent Stem Cells: An Alternative for 3D in Vitro Modelling of Skin Disease'. *Experimental Dermatology* 30 (11): 1572–87. <https://doi.org/10.1111/exd.14358>.
- Kim, E, A Harris, L Bingham, W Yan, J Su, and D Murrell. 2017. 'A Review of 52 Pedigrees with Epidermolysis Bullosa Simplex Identifying Ten Novel Mutations in KRT5 and KRT14 in Australia'. *Acta Dermato Venereologica* 97 (9): 1114–19. <https://doi.org/10.2340/00015555-2715>.
- Kim, Hui Kwon, Sungtae Lee, Younggwang Kim, Jinman Park, Seonwoo Min, Jae Woo Choi, Tony P. Huang, Sungroh Yoon, David R. Liu, and Hyongbum Henry Kim. 2020. 'High-Throughput Analysis of the Activities of xCas9, SpCas9-NG and SpCas9 at Matched and Mismatched Target Sequences in Human Cells'. *Nature Biomedical Engineering* 4 (1): 111–24. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0505-1>.
- Kim, InSoo. 2013. 'A Brief Overview of Cell Therapy and Its Product'. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 39 (5): 201. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2013.39.5.201>.
- Kim, Kichul, Sol Min, Daehwan Kim, Hyewon Kim, and Sangho Roh. 2021. 'A Rho Kinase (ROCK) Inhibitor, Y-27632, Inhibits the Dissociation-Induced Cell Death of Salivary Gland Stem Cells'. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (9): 2658. <https://doi.org/10.3390/molecules26092658>.
- Kim, Minhee, Minmin Li, Lizbeth R. A. Intong-Wheeler, Kim Tran, Damian Marucci, and Dedee F. Murrell. 2018. 'Epidemiology and Outcome of Squamous Cell Carcinoma in Epidermolysis Bullosa in Australia and New Zealand'. *Acta Dermato-Venereologica* 98 (1): 70–76. <https://doi.org/10.2340/00015555-2781>.
- Kim, Seyun, and Pierre A. Coulombe. 2007. 'Intermediate Filament Scaffolds Fulfill Mechanical, Organizational, and Signaling Functions in the Cytoplasm'. *Genes & Development* 21 (13): 1581–97. <https://doi.org/10.1101/gad.1552107>.
- Kim, Sojung, Daesik Kim, Seung Woo Cho, Jungeun Kim, and Jin-Soo Kim. 2014. 'Highly Efficient RNA-Guided Genome Editing in Human Cells via Delivery of Purified Cas9 Ribonucleoproteins'. *Genome Research* 24 (6): 1012–19. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>.

- Kim, Y G, J Cha, and S Chandrasegaran. 1996. 'Hybrid Restriction Enzymes: Zinc Finger Fusions to Fok I Cleavage Domain.' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (3): 1156–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>.
- Kim, Yena, Narae Park, Yeri Alice Rim, Yoojun Nam, Hyerin Jung, Kijun Lee, and Ji Hyeon Ju. 2018. 'Establishment of a Complex Skin Structure via Layered Co-Culture of Keratinocytes and Fibroblasts Derived from Induced Pluripotent Stem Cells'. *Stem Cell Research & Therapy* 9 (1): 217. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0958-2>.
- Kissenpfennig, Adrien, Sandrine Henri, Bertrand Dubois, Corinne Laplace-Builhé, Pierre Perrin, Nikolaus Romani, Christoph H. Tripp, et al. 2005. 'Dynamics and Function of Langerhans Cells in Vivo: Dermal Dendritic Cells Colonize Lymph Node Areas Distinct from Slower Migrating Langerhans Cells'. *Immunity* 22 (5): 643–54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.004>.
- Kitajima, Y., S. Inoue, and H. Yaoita. 1989. 'Abnormal Organization of Keratin Intermediate Filaments in Cultured Keratinocytes of Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Archives of Dermatological Research* 281 (1): 5–10. <https://doi.org/10.1007/BF00424265>.
- Kleinstiver, Benjamin P., Vikram Pattanayak, Michelle S. Prew, Shengdar Q. Tsai, Nhu T. Nguyen, Zongli Zheng, and J. Keith Joung. 2016. 'High-Fidelity CRISPR-Cas9 Nucleases with No Detectable Genome-Wide off-Target Effects'. *Nature* 529 (7587): 490–95. <https://doi.org/10.1038/nature16526>.
- Klunker, Sven, Axel Trautmann, Mübecce Akdis, Johan Verhagen, Peter Schmid-Grendelmeier, Kurt Blaser, and Cezmi A. Akdis. 2003. 'A Second Step of Chemotaxis after Transendothelial Migration: Keratinocytes Undergoing Apoptosis Release IFN-Gamma-Inducible Protein 10, Monokine Induced by IFN-Gamma, and IFN-Gamma-Inducible Alpha-Chemoattractant for T Cell Chemotaxis toward Epidermis in Atopic Dermatitis'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (2): 1078–84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.1078>.
- Knöbel, Maria, Edel A. O'Toole, and Frances J. D. Smith. 2015. 'Keratins and Skin Disease'. *Cell and Tissue Research* 360 (3): 583–89. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2105-4>.
- Koch, Peter J., Saiphon Webb, Jessica A. Gugger, Maddison N. Salois, and Maranke I. Koster. 2022. 'Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Keratinocytes'. *Current Protocols* 2 (4): e408. <https://doi.org/10.1002/cpz1.408>.
- Kocher, Thomas, Patricia Peking, Alfred Klausegger, Eva Maria Murauer, Josefina Piñón Hofbauer, Verena Wally, Thomas Lettner, et al. 2017. 'Cut and Paste: Efficient Homology-Directed Repair of a Dominant Negative KRT14 Mutation via CRISPR/Cas9 Nickases'. *Molecular Therapy* 25 (11): 2585–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.015>.
- Kogut, Igor, Dennis R. Roop, and Ganna Bilousova. 2013. 'Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into a Keratinocyte Lineage'. In *Epidermal Cells*, edited by Kursad Turksen, 1195:1–12. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2013\\_64](https://doi.org/10.1007/7651_2013_64).
- Kolundzic, Nikola, Preeti Khurana, Carl Hobbs, Marija Rogar, Sandra Ropret, Hans Törmä, Dusko Ilic, and Mirjana Liovic. 2019. 'Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Line from an Epidermolysis Bullosa Simplex Patient Heterozygous for Keratin 5 E475G Mutation and with the Dowling Meara Phenotype'. *Stem Cell Research* 37 (May): 101424. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101424>.
- Komor, Alexis C., Yongjoo B. Kim, Michael S. Packer, John A. Zuris, and David R. Liu. 2016. 'Programmable Editing of a Target Base in Genomic DNA without Double-Stranded DNA Cleavage'. *Nature* 533 (7603): 420–24. <https://doi.org/10.1038/nature17946>.
- Konstantakos, Vasileios, Anastasios Nentidis, Anastasia Krithara, and Georgios Paliouras. 2022. 'CRISPR–Cas9 gRNA Efficiency Prediction: An Overview of Predictive Tools and the Role of Deep Learning'. *Nucleic Acids Research* 50 (7): 3616–37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>.
- Kruegel, Jenny, and Nicolai Miosge. 2010. 'Basement Membrane Components Are Key Players in Specialized Extracellular Matrices'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (17): 2879–95. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0367-x>.

- Lai-Cheong, J. E., A. Tanaka, G. Hawche, P. Emanuel, C. Maari, M. Taskesen, S. Akdeniz, L. Liu, and J. A. McGrath. 2009. 'Kindler Syndrome: A Focal Adhesion Genodermatosis'. *The British Journal of Dermatology* 160 (2): 233–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08976.x>.
- Lane, E. B., E. L. Rugg, H. Navsaria, I. M. Leigh, A. H. Heagerty, A. Ishida-Yamamoto, and R. A. Eady. 1992. 'A Mutation in the Conserved Helix Termination Peptide of Keratin 5 in Hereditary Skin Blistering'. *Nature* 356 (6366): 244–46. <https://doi.org/10.1038/356244a0>.
- Lee, Chang-Hun, and Pierre A. Coulombe. 2009. 'Self-Organization of Keratin Intermediate Filaments into Cross-Linked Networks'. *The Journal of Cell Biology* 186 (3): 409–21. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810196>.
- Lee, Gun Ho, Ramrada Lekwuttikarn, Elidia Tafoya, Monica Martin, Kavita Y. Sarin, and Joyce M. Teng. 2022. 'Transcriptomic Repositioning Analysis Identifies mTOR Inhibitor as Potential Therapy for Epidermolysis Bullosa Simplex'. *The Journal of Investigative Dermatology* 142 (2): 382–89. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.07.170>.
- Lee, Jiyeon, Wouter H. van der Valk, Sara A. Serdy, CiCi Deakin, Jin Kim, Anh Phuong Le, and Karl R. Koehler. 2022. 'Generation and Characterization of Hair-Bearing Skin Organoids from Human Pluripotent Stem Cells'. *Nature Protocols* 17 (5): 1266–1305. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00681-y>.
- Lee, Seung Tae, Se Woong Oh, Dae Yong Kim, Jae Yong Han, Shin Yong Moon, and Jeong Mook Lim. 2006. 'Serum Replacement with a Growth Factor-Free Synthetic Substance in Culture Medium Contributes to Effective Establishment of Mouse Embryonic Stem Cells of Various Origins'. *Fertility and Sterility* 86 (4 Suppl): 1137–45. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.01.056>.
- Lefort, Nathalie, Maxime Feyeux, Cécile Bas, Olivier Féraud, Annelise Bennaceur-Griscelli, Gerard Tachdjian, Marc Peschanski, and Anselme L. Perrier. 2008. 'Human Embryonic Stem Cells Reveal Recurrent Genomic Instability at 20q11.21'. *Nature Biotechnology* 26 (12): 1364–66. <https://doi.org/10.1038/nbt.1509>.
- Lehman, T. A., R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W. P. Bennett, J. A. Welsh, R. A. Metcalf, M. R. Stampfer, N. Fusenig, and E. M. Rogan. 1993. 'P53 Mutations in Human Immortalized Epithelial Cell Lines'. *Carcinogenesis* 14 (5): 833–39. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.5.833>.
- Leikeim, Anna. 2022. 'Vaskularisierungsstrategien Für Vollhautäquivalente Zur Modellierung Der Melanom-ProgressionVascularization Strategies for Full-Thickness Skin Equivalents to Model Melanoma Progression'. Application/pdf. Universität Würzburg. <https://doi.org/10.25972/OPUS-27295>.
- Leowattana, Wattana, Tawitthep Leowattana, and Pathomthep Leowattana. 2022. 'Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Atrial-Specific Cardiomyocytes and Atrial Fibrillation'. *World Journal of Clinical Cases* 10 (27): 9588–9601. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i27.9588>.
- Lettner, Thomas, Roland Lang, Alfred Klaussegger, Stefan Hainzl, Johann W. Bauer, and Verena Wally. 2013. 'MMP-9 and CXCL8/IL-8 Are Potential Therapeutic Targets in Epidermolysis Bullosa Simplex'. *PLoS One* 8 (7): e70123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070123>.
- Li, Wenlin, Wei Wei, Saiyong Zhu, Jinliang Zhu, Yan Shi, Tongxiang Lin, Ergeng Hao, Alberto Hayek, Hongkui Deng, and Sheng Ding. 2009. 'Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors'. *Cell Stem Cell* 4 (1): 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.014>.
- Lin, Steven, Brett T Staahl, Ravi K Alla, and Jennifer A Doudna. 2014. 'Enhanced Homology-Directed Human Genome Engineering by Controlled Timing of CRISPR/Cas9 Delivery'. *eLife* 3 (December): e04766. <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>.
- Lin, Yanni, Thomas J. Cradick, Matthew T. Brown, Harshavardhan Deshmukh, Piyush Ranjan, Neha Sarode, Brian M. Wile, Paula M. Vertino, Frank J. Stewart, and Gang Bao. 2014. 'CRISPR/Cas9 Systems Have off-Target Activity with Insertions or Deletions between Target DNA and Guide RNA Sequences'. *Nucleic Acids Research* 42 (11): 7473–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gku402>.

- Liovic, Mirjana, Mariella D'Alessandro, Marjana Tomic-Canic, Viacheslav N. Bolshakov, Stephanie E. Coats, and E. Birgitte Lane. 2009. 'Severe Keratin 5 and 14 Mutations Induce Down-Regulation of Junction Proteins in Keratinocytes'. *Experimental Cell Research* 315 (17): 2995–3003. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.07.013>.
- Liovic, Mirjana, Brian Lee, Marjana Tomic-Canic, Mariella D'Alessandro, Viacheslav N. Bolshakov, and E. Birgitte Lane. 2008. 'Dual-Specificity Phosphatases in the Hypo-Osmotic Stress Response of Keratin-Defective Epithelial Cell Lines'. *Experimental Cell Research* 314 (10): 2066–75. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.020>.
- Lloyd, C., Q. C. Yu, J. Cheng, K. Turksen, L. Degenstein, E. Hutton, and E. Fuchs. 1995. 'The Basal Keratin Network of Stratified Squamous Epithelia: Defining K15 Function in the Absence of K14'. *The Journal of Cell Biology* 129 (5): 1329–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.5.1329>.
- Lu, Hong, Jian Chen, Laura Planko, Paola Zigrino, Ludger Klein-Hitpass, and Thomas M. Magin. 2007. 'Induction of Inflammatory Cytokines by a Keratin Mutation and Their Repression by a Small Molecule in a Mouse Model for EBS'. *Journal of Investigative Dermatology* 127 (12): 2781–89. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700918>.
- Ludwig, Tenneille E., Peter W. Andrews, Ivana Barbaric, Nissim Benvenisty, Anita Bhattacharyya, Jeremy M. Crook, Laurence M. Daheron, et al. 2023. 'ISSCR Standards for the Use of Human Stem Cells in Basic Research'. *Stem Cell Reports* 18 (9): 1744–52. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2023.08.003>.
- Lynley, Alexis M., and Beverly A. Dale. 1983. 'The Characterization of Human Epidermal Filaggrin'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 744 (1): 28–35. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(83\)90336-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(83)90336-9).
- Maier, Silke, Mats Paulsson, and Ursula Hartmann. 2008. 'The Widely Expressed Extracellular Matrix Protein SMOC-2 Promotes Keratinocyte Attachment and Migration'. *Experimental Cell Research* 314 (13): 2477–87. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.05.020>.
- Makar, I. A., V. V. Havryliak, and H. M. Sedilo. 2007. '[Genetic and biochemical aspects of keratin synthesis by hair follicles]'. *TSitologija i genetika* 41 (1): 75–79.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, and George M. Church. 2013. 'RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9'. *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Mallon, Barbara S., Kye-Yoon Park, Kevin G. Chen, Rebecca S. Hamilton, and Ronald D. G. McKay. 2006. 'Toward Xeno-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells'. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (7): 1063–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.014>.
- Mao, Jiayi, Qimanguli Saiding, Shutong Qian, Zhimo Liu, Binfan Zhao, Qiuyu Zhao, Bolun Lu, et al. 2022. 'Reprogramming Stem Cells in Regenerative Medicine'. *Smart Medicine* 1 (1): e20220005. <https://doi.org/10.1002/SMMD.20220005>.
- Mariath, Luiza Monteavaro, Juliana Tosetto Santin, Lavínia Schuler-Faccini, and Ana Elisa Kiszewski. 2020. 'Inherited Epidermolysis Bullosa: Update on the Clinical and Genetic Aspects'. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 95 (5): 551–69. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.05.001>.
- Marionnet, Claire, Cécile Pierrard, Corinne Vioux-Chagnoleau, Juliette Sok, Daniel Asselineau, and Françoise Bernerd. 2006. 'Interactions between Fibroblasts and Keratinocytes in Morphogenesis of Dermal Epidermal Junction in a Model of Reconstructed Skin'. *Journal of Investigative Dermatology* 126 (5): 971–79. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700230>.
- Maruyama, Takeshi, Stephanie K. Dougan, Matthias C. Truttmann, Angelina M. Bilate, Jessica R. Ingram, and Hidde L. Ploegh. 2015. 'Increasing the Efficiency of Precise Genome Editing with CRISPR-Cas9 by Inhibition of Nonhomologous End Joining'. *Nature Biotechnology* 33 (5): 538–42. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>.
- Mateizel, I., N. De Temmerman, U. Ullmann, G. Cauffman, K. Sermon, H. Van de Velde, M. De Rycke, et al. 2006. 'Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines from Embryos Obtained after IVF and after PGD for Monogenic Disorders'. *Human Reproduction (Oxford, England)* 21 (2): 503–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei345>.

- Matsumura, Wakana, Yasuyuki Fujita, Chihiro Nakayama, Satoru Shinkuma, Shotaro Suzuki, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, and Hiroshi Shimizu. 2018. 'Establishment of Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Human Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Keratinocytes'. *Journal of Dermatological Science* 89 (3): 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.017>.
- McGrath, John A. 2015. 'Recently Identified Forms of Epidermolysis Bullosa'. *Annals of Dermatology* 27 (6): 658–66. <https://doi.org/10.5021/ad.2015.27.6.658>.
- McMillan, James R, Masashi Akiyama, and Hiroshi Shimizu. 2003. 'Epidermal Basement Membrane Zone Components: Ultrastructural Distribution and Molecular Interactions'. *Journal of Dermatological Science* 31 (3): 169–77. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(03\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(03)00045-8).
- Metallo, Christian M., Lin Ji, Juan J. De Pablo, and Sean P. Palecek. 2008. 'Retinoic Acid and Bone Morphogenetic Protein Signaling Synergize to Efficiently Direct Epithelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells'. *Stem Cells* 26 (2): 372–80. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0501>.
- Mir, Aamir, Alireza Edraki, Jooyoung Lee, and Erik J. Sontheimer. 2018. 'Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application'. *ACS Chemical Biology* 13 (2): 357–65. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00855>.
- Moll, Roland, Markus Divo, and Lutz Langbein. 2008. 'The Human Keratins: Biology and Pathology'. *Histochemistry and Cell Biology* 129 (6): 705–33. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>.
- Molla, Kutubuddin A., and Yinong Yang. 2019. 'CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications'. *Trends in Biotechnology* 37 (10): 1121–42. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.008>.
- Montaudié, H., C. Chiaverini, E. Sbidian, A. Charlesworth, and J.-P. Lacour. 2016. 'Inherited Epidermolysis Bullosa and Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review of 117 Cases'. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11 (1): 117. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0489-9>.
- Moradi, Sharif, Hamid Mahdizadeh, Tomo Šarić, Johnny Kim, Javad Harati, Hosein Shahsavarani, Boris Greber, and Joseph B. Moore. 2019. 'Research and Therapy with Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Social, Legal, and Ethical Considerations'. *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>.
- Morley, S. M., S. R. Dundas, J. L. James, T. Gupta, R. A. Brown, C. J. Sexton, H. A. Navsaria, I. M. Leigh, and E. B. Lane. 1995. 'Temperature Sensitivity of the Keratin Cytoskeleton and Delayed Spreading of Keratinocyte Lines Derived from Ebs Patients'. *Journal of Cell Science* 108 (11): 3463–71. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.11.3463>.
- Morley, S.m., M. D'Alessandro, C. Sexton, E.l. Rugg, H. Navsaria, C.s. Shemanko, M. Huber, et al. 2003a. 'Generation and Characterization of Epidermolysis Bullosa Simplex Cell Lines: Scratch Assays Show Faster Migration with Disruptive Keratin Mutations'. *British Journal of Dermatology* 149 (1): 46–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05493.x>.
- Morley, S.M., M. D'Alessandro, C. Sexton, E.L. Rugg, H. Navsaria, C.S. Shemanko, M. Huber, et al. 2003. 'Generation and Characterization of Epidermolysis Bullosa Simplex Cell Lines: Scratch Assays Show Faster Migration with Disruptive Keratin Mutations'. *British Journal of Dermatology* 149 (1): 46–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05493.x>.
- Müller, Felix B., Wolfgang Küster, Kerstin Wodecki, Hiram Almeida, Leena Bruckner-Tuderman, Thomas Krieg, Bernhard P. Korge, and Meral J. Arin. 2006. 'Novel and Recurrent Mutations in Keratin KRT5 and KRT14 Genes in Epidermolysis Bullosa Simplex: Implications for Disease Phenotype and Keratin Filament Assembly'. *Human Mutation* 27 (7): 719–20. <https://doi.org/10.1002/humu.9437>.
- Murat-Sušić, Slobodna, Karmela Husar, Mihael Skerlev, Branka Marinović, and Irena Babić. 2011. 'Inherited Epidermolysis Bullosa - the Spectrum of Complications'. *Acta Dermatovenerologica Croatica: ADC* 19 (4): 255–63.

- Murrell, Dedee F., Niken Trisnowati, Spiros Miyakis, and Amy S. Paller. 2011. 'The Yin and the Yang of Keratin Amino Acid Substitutions and Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Journal of Investigative Dermatology* 131 (9): 1787–90. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.206>.
- Nakagawa, Masato, Michiyo Koyanagi, Koji Tanabe, Kazutoshi Takahashi, Tomoko Ichisaka, Takashi Aoi, Keisuke Okita, Yuji Mochiduki, Nanako Takizawa, and Shinya Yamanaka. 2008. 'Generation of Induced Pluripotent Stem Cells without Myc from Mouse and Human Fibroblasts'. *Nature Biotechnology* 26 (1): 101–6. <https://doi.org/10.1038/nbt1374>.
- Nakashima, Yoshiki, and Takeshi Omasa. 2016. 'What Kind of Signaling Maintains Pluripotency and Viability in Human-Induced Pluripotent Stem Cells Cultured on Laminin-511 with Serum-Free Medium?' *BioResearch Open Access* 5 (1): 84–93. <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0001>.
- Nandan, Mandayam O., and Vincent W. Yang. 2009. 'The Role of Krüppel-like Factors in the Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells'. *Histology and Histopathology* 24 (10): 1343–55. <https://doi.org/10.14670/HH-24.1343>.
- Naso, Gaetano, Soragia Athina Gkazi, Christos Georgiadis, Vignesh Jayarajan, Joanna Jacków, Roland Fleck, Leanne Allison, et al. 2023. 'Édition de La Base de La Cytosine Désaminase Pour Restaurer COL7A1 Dans l'épidermolyse Bulleuse Dystrophique Humaine : Modèle de Peau Murine'. *JID Innovations* 3 (3): 100191. <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2023.100191>.
- Navarro, Pablo, Nicola Festuccia, Douglas Colby, Alessia Gagliardi, Nicholas P Mullin, Wensheng Zhang, Violetta Karwacki-Neisius, et al. 2012. 'OCT4/SOX2-Independent *Nanog* Autorepression Modulates Heterogeneous *Nanog* Gene Expression in Mouse ES Cells: *Nanog* Autorepression and Transcription Switching'. *The EMBO Journal* 31 (24): 4547–62. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.321>.
- Neumayer, Gernot, Jessica L. Torkelson, Shengdi Li, Kelly McCarthy, Hanson H. Zhen, Madhuri Vangipuram, Joanna Jackow, et al. 2023. 'A Scalable, GMP-Compatible, Autologous Organotypic Cell Therapy for Dystrophic Epidermolysis Bullosa'. *bioRxiv*, March, 2023.02.28.529447. <https://doi.org/10.1101/2023.02.28.529447>.
- Nguyen, Alan V., and Athena M. Soulika. 2019. 'The Dynamics of the Skin's Immune System'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8): E1811. <https://doi.org/10.3390/ijms20081811>.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, and A. Smith. 1998. 'Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4'. *Cell* 95 (3): 379–91. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81769-9).
- Nishimasu, Hiroshi, Xi Shi, Soh Ishiguro, Linyi Gao, Seiichi Hirano, Sae Okazaki, Taichi Noda, et al. 2018. 'Engineered CRISPR-Cas9 Nuclease with Expanded Targeting Space'. *Science (New York, N.Y.)* 361 (6408): 1259–62. <https://doi.org/10.1126/science.aas9129>.
- Nissan, Xavier, Lionel Larribere, Manoubia Saidani, Ilse Hurbain, Cédric Delevoye, Jessica Feteira, Gilles Lemaitre, Marc Peschanski, and Christine Baldeschi. 2011. 'Functional Melanocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells Engraft into Pluristratified Epidermis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (36): 14861–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019070108>.
- Nyström, Alexander, Leena Bruckner-Tuderman, and Dimitra Kiritsi. 2021. 'Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Secondary Disease Mechanisms and Disease Modifiers'. *Frontiers in Genetics* 12 (September): 737272. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.737272>.
- Oceguera-Yanez, Fabian, Alfonso Avila-Robinson, and Knut Woltjen. 2022. 'Differentiation of Pluripotent Stem Cells for Modeling Human Skin Development and Potential Applications'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (November): 1030339. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1030339>.
- Oh, Seung-Ick, Chang Kyu Lee, Kyung Jin Cho, Kyung-Ok Lee, Ssang-Goo Cho, and Sunghoi Hong. 2012. 'Technological Progress in Generation of Induced Pluripotent Stem Cells for Clinical Applications'. *The Scientific World Journal* 2012: 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/417809>.

- Ohta, Shigeki, Yoichi Imaizumi, Yohei Okada, Wado Akamatsu, Reiko Kuwahara, Manabu Ohyama, Masayuki Amagai, et al. 2011. 'Generation of Human Melanocytes from Induced Pluripotent Stem Cells'. Edited by Huck H. Ng. *PLoS ONE* 6 (1): e16182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016182>.
- Okamoto, Sachiko, Yasunori Amaishi, Izumi Maki, Tatsuji Enoki, and Junichi Mineno. 2019. 'Highly Efficient Genome Editing for Single-Base Substitutions Using Optimized ssODNs with Cas9-RNPs'. *Scientific Reports* 9 (1): 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41121-4>.
- Oldershaw, Rachel A., Melissa A. Baxter, Emma T. Lowe, Nicola Bates, Lisa M. Grady, Francesca Soncin, Daniel R. Brison, Timothy E. Hardingham, and Susan J. Kimber. 2010. 'Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells toward Chondrocytes'. *Nature Biotechnology* 28 (11): 1187–94. <https://doi.org/10.1038/nbt.1683>.
- Omary, M. Bishr, Pierre A. Coulombe, and W. H. Irwin McLean. 2004. 'Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases'. *The New England Journal of Medicine* 351 (20): 2087–2100. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040319>.
- Onder, Tamer T., Nergis Kara, Anne Cherry, Amit U. Sinha, Nan Zhu, Kathrin M. Bernt, Patrick Cahan, et al. 2012. 'Chromatin-Modifying Enzymes as Modulators of Reprogramming'. *Nature* 483 (7391): 598–602. <https://doi.org/10.1038/nature10953>.
- ORIGEN, Center for Reproductive Medicine, Brazil, Hurtado R, De Lima Bossi R, ORIGEN, Center for Reproductive Medicine, Brazil, Valle M, ORIGEN, Center for Reproductive Medicine, Brazil, Sampaio M, et al. 2021. 'In Vitro Human Embryo Morphology - An Odyssey Outside the Oviduct'. *Austin Journal of Anatomy* 8 (1). <https://doi.org/10.26420/austinjanat.2021.1099>.
- Osborn, Mark J., Gregory A. Newby, Amber N. McElroy, Friederike Knipping, Sarah C. Nielsen, Megan J. Riddle, Lily Xia, et al. 2020. 'Base Editor Correction of COL7A1 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patient-Derived Fibroblasts and iPSCs'. *The Journal of Investigative Dermatology* 140 (2): 338-347.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.701>.
- Papp, Kim, Kristian Reich, Craig L. Leonardi, Leon Kircik, Sergio Chimenti, Richard G. B. Langley, ChiaChi Hu, et al. 2015. 'Apremilast, an Oral Phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitor, in Patients with Moderate to Severe Plaque Psoriasis: Results of a Phase III, Randomized, Controlled Trial (Efficacy and Safety Trial Evaluating the Effects of Apremilast in Psoriasis [ESTEEM] 1)'. *Journal of the American Academy of Dermatology* 73 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.03.049>.
- Park, In-Hyun, Rui Zhao, Jason A. West, Akiko Yabuuchi, Hongguang Huo, Tan A. Ince, Paul H. Lerou, M. William Lensch, and George Q. Daley. 2008. 'Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency with Defined Factors'. *Nature* 451 (7175): 141–46. <https://doi.org/10.1038/nature06534>.
- Park, Jung Eun, Hee Jun Kwon, Hwa Jin Lee, and Hyung Seo Hwang. 2023. 'Anti-Inflammatory Effect of Taxifolin in TNF- $\alpha$ /IL-17A/IFN- $\gamma$  Induced HaCaT Human Keratinocytes'. *Applied Biological Chemistry* 66 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s13765-023-00769-3>.
- Peking, P., J.S. Breitenbach, M. Ablinger, W.H. Muss, F.J. Poetschke, T. Kocher, U. Koller, et al. 2019. 'An Ex Vivo RNA Trans-splicing Strategy to Correct Human Generalized Severe Epidermolysis Bullosa Simplex'. *The British Journal of Dermatology* 180 (1): 141–48. <https://doi.org/10.1111/bjd.17075>.
- Peters, Bettina, Jutta Kirfel, Heinrich Büssow, Miguel Vidal, and Thomas M. Magin. 2001. 'Complete Cytolysis and Neonatal Lethality in Keratin 5 Knockout Mice Reveal Its Fundamental Role in Skin Integrity and in Epidermolysis Bullosa Simplex'. Edited by Thomas D. Pollard. *Molecular Biology of the Cell* 12 (6): 1775–89. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1775>.
- Petrof, Gabriela, Maria Papanikolaou, Anna E. Martinez, Jemima E. Mellerio, John A. McGrath, Ajoy Bardhan, Natasha Harper, et al. 2022. 'The Epidemiology of Epidermolysis Bullosa in England and Wales: Data from the National Epidermolysis Bullosa Database\*'. *British Journal of Dermatology* 186 (5): 843–48. <https://doi.org/10.1111/bjd.20958>.



- Porter, Rebecca M., and E. Birgitte Lane. 2003. 'Phenotypes, Genotypes and Their Contribution to Understanding Keratin Function'. *Trends in Genetics* 19 (5): 278–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00071-4).
- Prodinger, Christine, Julia Reichelt, Johann W. Bauer, and Martin Laimer. 2019. 'Epidermolysis Bullosa: Advances in Research and Treatment'. *Experimental Dermatology* 28 (10): 1176–89. <https://doi.org/10.1111/exd.13979>.
- Prost-Squarcioni, Catherine. 2006. 'Histologie de la peau et des follicules pileux'. *médecine/sciences* 22 (2): 131–37. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222131>.
- Ramovs, Veronika, Ignacia Fuentes, Christian Freund, Harald Mikkers, Christine L. Mummery, and Karine Raymond. 2021. 'Génération et Réparation Génétique de Deux Lignées Cellulaires Pluripotentes Induites Par l'homme Provenant de Patients Atteints d'épidermolyse Bulleuse Simplex et de Cardiomyopathie Dilatée Associées à Une Mutation Hétérozygote Dans Le Codon d'initiation de La Traduction de *KLHL24*'. *Stem Cell Research* 57 (December): 102582. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102582>.
- Ramovs, Veronika, Hans Janssen, Ignacia Fuentes, Amandine Pitaval, Walid Rachidi, Susana M. Chuva de Sousa Lopes, Christian Freund, Xavier Gidrol, Christine L. Mummery, and Karine Raymond. 2022. 'Characterization of the Epidermal-Dermal Junction in hiPSC-Derived Skin Organoids'. *Stem Cell Reports* 17 (6): 1279–88. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.04.008>.
- Rao, Mahendra S., and Nasir Malik. 2012. 'Assessing iPSC Reprogramming Methods for Their Suitability in Translational Medicine'. *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (10): 3061–68. <https://doi.org/10.1002/jcb.24183>.
- Rees, Holly A., and David R. Liu. 2018. 'Base Editing: Precision Chemistry on the Genome and Transcriptome of Living Cells'. *Nature Reviews Genetics* 19 (12): 770–88. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0059-1>.
- Rietscher, Katrin, Heinz-Georg Jahnke, Matthias Rübsam, Eric W. Lin, Cristina Has, M. Bishr Omary, Carien M. Niessen, and Thomas M. Magin. 2022. 'Kinase Inhibition by PKC412 Prevents Epithelial Sheet Damage in Autosomal Dominant Epidermolysis Bullosa Simplex through Keratin and Cell Contact Stabilization'. *Journal of Investigative Dermatology* 142 (12): 3282–93. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.05.1088>.
- Ringrose, Leonie. 2006. 'Polycomb, Trithorax and the Decision to Differentiate'. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 28 (4): 330–34. <https://doi.org/10.1002/bies.20388>.
- Rivera, Teresa, Yuanyuan Zhao, Yuhui Ni, and Jiwu Wang. 2020. 'Human-Induced Pluripotent Stem Cell Culture Methods Under cGMP Conditions'. *Current Protocols in Stem Cell Biology* 54 (1): e117. <https://doi.org/10.1002/cpsc.117>.
- Robinton, Daisy A., and George Q. Daley. 2012. 'The Promise of Induced Pluripotent Stem Cells in Research and Therapy'. *Nature* 481 (7381): 295–305. <https://doi.org/10.1038/nature10761>.
- Rodda, David J., Joon-Lin Chew, Leng-Hiong Lim, Yui-Han Loh, Bei Wang, Huck-Hui Ng, and Paul Robson. 2005. 'Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2'. *Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 24731–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>.
- Romani, N., A. Lenz, H. Glassel, H. Stössel, U. Stanzl, O. Majdic, P. Fritsch, and G. Schuler. 1989. 'Cultured Human Langerhans Cells Resemble Lymphoid Dendritic Cells in Phenotype and Function'. *The Journal of Investigative Dermatology* 93 (5): 600–609. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12319727>.
- Roth, Wera, Ursula Reuter, Claudia Wohlenberg, Leena Bruckner-Tuderman, and Thomas M. Magin. 2009. 'Cytokines as Genetic Modifiers in K5<sup>-/-</sup> Mice and in Human Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Human Mutation* 30 (5): 832–41. <https://doi.org/10.1002/humu.20981>.
- Rousselle, Patricia, Fabienne Braye, and Guila Dayan. 2019. 'Re-Epithelialization of Adult Skin Wounds: Cellular Mechanisms and Therapeutic Strategies'. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Wound healing and fibrosis – State of play, 146 (June): 344–65. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.019>.

- Russell, David, Paul D. Andrews, John James, and E. Birgitte Lane. 2004. 'Mechanical Stress Induces Profound Remodelling of Keratin Filaments and Cell Junctions in Epidermolysis Bullosa Simplex Keratinocytes'. *Journal of Cell Science* 117 (22): 5233–43. <https://doi.org/10.1242/jcs.01407>.
- Russell, David, Heike Ross, and E Birgitte Lane. 2010. 'ERK Involvement in Resistance to Apoptosis in Keratinocytes with Mutant Keratin'. *Journal of Investigative Dermatology* 130 (3): 671–81. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.327>.
- Sakkas, Lazaros I., Athanasios Mavropoulos, and Dimitrios P. Bogdanos. 2017. 'Phosphodiesterase 4 Inhibitors in Immune-Mediated Diseases: Mode of Action, Clinical Applications, Current and Future Perspectives'. *Current Medicinal Chemistry* 24 (28): 3054–67. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170530093902>.
- Samoilova, E. M., V. A. Kalsin, N. M. Kushnir, D. A. Chistyakov, A. V. Troitskiy, and V. P. Baklaushev. 2018. 'Adult Neural Stem Cells: Basic Research and Production Strategies for Neurorestorative Therapy'. *Stem Cells International* 2018: 4835491. <https://doi.org/10.1155/2018/4835491>.
- Sawant, Mugdha, Nicole Schwarz, Reinhard Windoffer, Thomas M. Magin, Jan Krieger, Norbert Mücke, Boguslaw Obara, et al. 2018. 'Threonine 150 Phosphorylation of Keratin 5 Is Linked to Epidermolysis Bullosa Simplex and Regulates Filament Assembly and Cell Viability'. *Journal of Investigative Dermatology* 138 (3): 627–36. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.011>.
- Saxena, Shobhit, Madhuri Hanwate, Kaushik Deb, Vijay Sharma, and Satish Totey. 2008. 'FGF2 Secreting Human Fibroblast Feeder Cells: A Novel Culture System for Human Embryonic Stem Cells'. *Molecular Reproduction and Development* 75 (10): 1523–32. <https://doi.org/10.1002/mrd.20895>.
- Schatoff, Emma M., Maria Paz Zafra, and Lukas E. Dow. 2019. 'Base Editing the Mammalian Genome'. *Methods (San Diego, Calif.)* 164–165 (July): 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.02.022>.
- Schmidt, Enno, and Detlef Zillikens. 2013. 'Pemphigoid Diseases'. *The Lancet* 381 (9863): 320–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61140-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61140-4).
- Schubert, Mollie S., Bernice Thommandru, Jessica Woodley, Rolf Turk, Shuqi Yan, Gavin Kurgan, Matthew S. McNeill, and Garrett R. Rettig. 2021. 'Optimized Design Parameters for CRISPR Cas9 and Cas12a Homology-Directed Repair'. *Scientific Reports* 11 (1): 19482. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98965-y>.
- Schweizer, Jürgen, Paul E. Bowden, Pierre A. Coulombe, Lutz Langbein, E. Birgitte Lane, Thomas M. Magin, Lois Maltais, et al. 2006. 'New Consensus Nomenclature for Mammalian Keratins'. *The Journal of Cell Biology* 174 (2): 169–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603161>.
- Seltmann, Kristin, Wera Roth, Fanny Loschke, Marcell Lederer, Stefan Hüttelmaier, and Thomas M. Magin. 2013. 'Keratins Mediate Localization of Hemidesmosomes and Repress Cell Motility'. *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (1): 181–90. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.256>.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins, and J. D. Gearhart. 1998. 'Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Human Primordial Germ Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23): 13726–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13726>.
- Shamshirgaran, Yasaman, Jun Liu, Huseyin Sumer, Paul J. Verma, and Amir Taheri-Ghahfarokhi. 2022. 'Tools for Efficient Genome Editing; ZFN, TALEN, and CRISPR'. In *Applications of Genome Modulation and Editing*, edited by Paul John Verma, Huseyin Sumer, and Jun Liu, 29–46. New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2301-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2301-5_2).
- Shao, Shuai, Lam C. Tsoi, Mrinal K. Sarkar, Xianying Xing, Ke Xue, Ranjitha Uppala, Celine C. Berthier, et al. 2019. 'IFN- $\gamma$  Enhances Cell-Mediated Cytotoxicity against Keratinocytes via JAK2/STAT1 in Lichen Planus'. *Science Translational Medicine* 11 (511): eaav7561. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav7561>.

- Shin, Kee Cheol, Bo Young Park, Han Koo Kim, Woo Seob Kim, and Tae Hui Bae. 2011. 'The Use of Cultured Allogenic Keratinocyte Grafting in a Patient with Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Annals of Dermatology* 23 (Suppl 3): S393–97. <https://doi.org/10.5021/ad.2011.23.S3.S393>.
- Simpson, Cory L., Dipal M. Patel, and Kathleen J. Green. 2011. 'Deconstructing the Skin: Cytoarchitectural Determinants of Epidermal Morphogenesis'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (9): 565–80. <https://doi.org/10.1038/nrm3175>.
- Slaymaker, Ian M., Linyi Gao, Bernd Zetsche, David A. Scott, Winston X. Yan, and Feng Zhang. 2016. 'Rationally Engineered Cas9 Nucleases with Improved Specificity'. *Science (New York, N.Y.)* 351 (6268): 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>.
- Smith, Kelly P., Mai X. Luong, and Gary S. Stein. 2009. 'Pluripotency: Toward a Gold Standard for Human ES and iPS Cells'. *Journal of Cellular Physiology* 220 (1): 21–29. <https://doi.org/10.1002/jcp.21681>.
- Smola, Hans, Hans-Jürgen Stark, Gabi Thiekötter, Nicolae Mirancea, Thomas Krieg, and Norbert E. Fusenig. 1998. 'Dynamics of Basement Membrane Formation by Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Organotypic Skin Culture'. *Experimental Cell Research* 239 (2): 399–410. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3910>.
- Snider, Natasha T., and M. Bishr Omary. 2014. 'Post-Translational Modifications of Intermediate Filament Proteins: Mechanisms and Functions'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (3): 163–77. <https://doi.org/10.1038/nrm3753>.
- So, Jodi Y., and Joyce Teng. 1993. 'Epidermolysis Bullosa Simplex'. In *GeneReviews®*, edited by Margaret P. Adam, Ghayda M. Mirzaa, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen W. Gripp, and Anne Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1369/>.
- Soheilifar, Mohammad Hasan, Nastaran Masoudi-Khoram, Afshan Shirkavand, and Shima Ghorbanifar. 2022. 'Non-Coding RNAs in Photoaging-Related Mechanisms: A New Paradigm in Skin Health'. *Biogerontology* 23 (3): 289–306. <https://doi.org/10.1007/s10522-022-09966-x>.
- Sørensen, Charlotte B., Anne-Sofie Ladekjær-Mikkelsen, Brage S. Andresen, Flemming Brandrup, Niels K. Veien, Sanne K. Buus, Ingrun Anton-Lamprecht, et al. 1999. 'Identification of Novel and Known Mutations in the Genes for Keratin 5 and 14 in Danish Patients with Epidermolysis Bullosa Simplex: Correlation Between Genotype and Phenotype'. *Journal of Investigative Dermatology* 112 (2): 184–90. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00495.x>.
- Sorrell, J. Michael, M.A. Baber, and A.I. Caplan. 2004. 'Site-matched Papillary and Reticular Human Dermal Fibroblasts Differ in Their Release of Specific Growth Factors/Cytokines and in Their Interaction with Keratinocytes'. *Journal of Cellular Physiology* 200 (1): 134–45. <https://doi.org/10.1002/jcp.10474>.
- Spörrer, Marina, Ania Prochnicki, Regine C. Tölle, Alexander Nyström, Philipp R. Esser, Melanie Homberg, Ioannis Athanasiou, et al. 2019. 'Treatment of Keratinocytes with 4-Phenylbutyrate in Epidermolysis Bullosa: Lessons for Therapies in Keratin Disorders'. *EBioMedicine* 44 (May): 502–15. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.062>.
- Sprecher, E., A. Ishida-Yamamoto, O. M. Becker, L. Marekov, C. J. Miller, P. M. Steinert, K. Neldner, and G. Richard. 2001. 'Evidence for Novel Functions of the Keratin Tail Emerging from a Mutation Causing Ichthyosis Hystrix'. *The Journal of Investigative Dermatology* 116 (4): 511–19. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01292.x>.
- Stadtfeld, Matthias, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, and Konrad Hochedlinger. 2008. 'Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration'. *Science* 322 (5903): 945–49. <https://doi.org/10.1126/science.1162494>.
- Staerk, Judith, Meelad M. Dawlaty, Qing Gao, Dorothea Maetzel, Jacob Hanna, Cesar A. Sommer, Gustavo Mostoslavsky, and Rudolf Jaenisch. 2010. 'Reprogramming of Human Peripheral Blood Cells to Induced Pluripotent Stem Cells'. *Cell Stem Cell* 7 (1): 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.002>.

- Steichen, Clara, Zara Hannoun, Eléanor Luce, Thierry Hauet, and Anne Dubart-Kupperschmitt. 2019. 'Genomic Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming, Differentiation and Applications'. *World Journal of Stem Cells* 11 (10): 729–47. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i10.729>.
- Steinert, P. M., D. A. Parry, E. L. Racoosin, W. W. Idler, A. C. Steven, B. L. Trus, and D. R. Roop. 1984. 'The Complete cDNA and Deduced Amino Acid Sequence of a Type II Mouse Epidermal Keratin of 60,000 Da: Analysis of Sequence Differences between Type I and Type II Keratins'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (18): 5709–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.18.5709>.
- Steinert, P. M., A. C. Steven, and D. R. Roop. 1985. 'The Molecular Biology of Intermediate Filaments'. *Cell* 42 (2): 411–20. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90098-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90098-4).
- Stone, Richard M., Paul W. Manley, Richard A. Larson, and Renaud Capdeville. 2018. 'Midostaurin: Its Odyssey from Discovery to Approval for Treating Acute Myeloid Leukemia and Advanced Systemic Mastocytosis'. *Blood Advances* 2 (4): 444–53. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011080>.
- Strober, Bruce, Ali Alikhan, Benjamin Lockshin, Rebecca Shi, Joshua Cirulli, and Peter Schafer. 2019. 'Apremilast Mechanism of Efficacy in Systemic-Naive Patients with Moderate Plaque Psoriasis: Pharmacodynamic Results from the UNVEIL Study'. *Journal of Dermatological Science* 96 (3): 126–33. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.09.003>.
- Sukoyan, Marina A., Sergei Y. Vatolin, Alevtina N. Golubitsa, Antonina I. Zhelezova, Lora A. Semenova, and Oleg L. Serov. 1993. 'Embryonic Stem Cells Derived from Morulae, Inner Cell Mass, and Blastocysts of Mink: Comparisons of Their Pluripotencies'. *Molecular Reproduction and Development* 36 (2): 148–58. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360205>.
- Sullivan, Stephen, Glyn N. Stacey, Chihiro Akazawa, Naoki Aoyama, Ricardo Baptista, Patrick Bedford, Annelise Bennaceur Griscelli, et al. 2018. 'Quality Control Guidelines for Clinical-Grade Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines'. *Regenerative Medicine* 13 (7): 859–66. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095>.
- Sumi, T, N Tsuneyoshi, N Nakatsuji, and H Suemori. 2007. 'Apoptosis and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Induced by Sustained Activation of C-Myc'. *Oncogene* 26 (38): 5564–76. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210353>.
- Sürün, Duran, Aksana Schneider, Jovan Mircetic, Katrin Neumann, Felix Lansing, Maciej Paszkowski-Rogacz, Vanessa Hänchen, Min Ae Lee-Kirsch, and Frank Buchholz. 2020. 'Efficient Generation and Correction of Mutations in Human iPSCs Utilizing mRNAs of CRISPR Base Editors and Prime Editors'. *Genes* 11 (5): 511. <https://doi.org/10.3390/genes11050511>.
- Swartling, C., M. Karlqvist, K. Hymnelius, J. Weis, and A. Vahlquist. 2010. 'Botulinum Toxin in the Treatment of Sweat-worsened Foot Problems in Patients with Epidermolysis Bullosa Simplex and Pachyonychia Congenita'. *British Journal of Dermatology* 163 (5): 1072–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09927.x>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors'. *Cell* 131 (5): 861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors'. *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Tan, Tong San, John E. A. Common, John S. Y. Lim, Cedric Badowski, Muhammad Jasrie Firdaus, Steven S. Leonardi, and E. Birgitte Lane. 2021a. 'A Cell-Based Drug Discovery Assay Identifies Inhibition of Cell Stress Responses as a New Approach to Treatment of Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Journal of Cell Science* 134 (19): jcs258409. <https://doi.org/10.1242/jcs.258409>.
- Thomson, J A, J Kalishman, T G Golos, M Durning, C P Harris, R A Becker, and J P Hearn. 1995. 'Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line.' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (17): 7844–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7844>.

- Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffrey M. Jones. 1998. 'Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts'. *Science* 282 (5391): 1145–47. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
- Tian, Fangyuan, Zhaoyan Chen, and Ting Xu. 2019. 'Efficacy and Safety of Tofacitinib for the Treatment of Chronic Plaque Psoriasis: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *The Journal of International Medical Research* 47 (6): 2342–50. <https://doi.org/10.1177/0300060519847414>.
- Till, J. E., and E. A. McCulloch. 1961. 'A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells'. *Radiation Research* 14 (2): 213. <https://doi.org/10.2307/3570892>.
- Toivola, Diana M., Guo-Zhong Tao, Aida Habtezion, Jian Liao, and M. Bishr Omary. 2005. 'Cellular Integrity plus: Organelle-Related and Protein-Targeting Functions of Intermediate Filaments'. *Trends in Cell Biology* 15 (11): 608–17. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.004>.
- Tokuzawa, Yoshimi, Eiko Kaiho, Masayoshi Maruyama, Kazutoshi Takahashi, Kaoru Mitsui, Mitsuyo Maeda, Hitoshi Niwa, and Shinya Yamanaka. 2003. 'Fbx15 Is a Novel Target of Oct3/4 but Is Dispensable for Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Mouse Development'. *Molecular and Cellular Biology* 23 (8): 2699–2708. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2699-2708.2003>.
- Tolar, Jakub, Lily Xia, Chris J. Lees, Megan Riddle, Amber McElroy, Douglas R. Keene, Troy C. Lund, et al. 2013. 'Keratinocytes from Induced Pluripotent Stem Cells in Junctional Epidermolysis Bullosa'. *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (2): 562–65. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.278>.
- Touboul, Thomas, Nicholas R. F. Hannan, Sébastien Corbineau, Amélie Martinez, Clémence Martinet, Sophie Branchereau, Sylvie Mainot, et al. 2010. 'Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells under Chemically Defined Conditions That Recapitulate Liver Development'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (5): 1754–65. <https://doi.org/10.1002/hep.23506>.
- Tsuruta, Daisuke, Takashi Hashimoto, Kevin J. Hamill, and Jonathan C.R. Jones. 2011. 'Hemidesmosomes and Focal Contact Proteins: Functions and Cross-Talk in Keratinocytes, Bullous Diseases and Wound Healing'. *Journal of Dermatological Science* 62 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.01.005>.
- Ujiié, Inkin, Yasuyuki Fujita, Chihiro Nakayama, Wakana Matsumura, Shotaro Suzuki, Satoru Shinkuma, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, and Hiroshi Shimizu. 2017. 'Altered Balance of Epidermis-Related Chemokines in Epidermolysis Bullosa'. *Journal of Dermatological Science* 86 (1): 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.12.021>.
- Vahidnezhad, Hassan, Leila Youssefian, Amir Hossein Saeidian, and Jouni Uitto. 2019. 'Phenotypic Spectrum of Epidermolysis Bullosa: The Paradigm of Syndromic versus Non-Syndromic Skin Fragility Disorders'. *Journal of Investigative Dermatology* 139 (3): 522–27. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.017>.
- Vallier, Ludovic, Sasha Mendjan, Stephanie Brown, Zhenzhi Chng, Adrian Teo, Lucy E. Smithers, Matthew W. B. Trotter, et al. 2009. 'Activin/Nodal Signalling Maintains Pluripotency by Controlling Nanog Expression'. *Development* 136 (8): 1339–49. <https://doi.org/10.1242/dev.033951>.
- Vassar, Robert, Pierre A Coulombe, Linda Degenstein, Kathryn Albers, and Elaine Fuchs. 1991. 'Mutant Keratin Expression in Transgenic Mice Causes Marked Abnormalities Resembling a Human Genetic Skin Disease'. *Cell* 64 (2): 365–80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90645-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90645-F).
- Vogt, Alex, and Yuan He. 2023. 'Structure and Mechanism in Non-Homologous End Joining'. *DNA Repair* 130 (October): 103547. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103547>.
- Wagner, Martin, Andrea Trost, Helmut Hintner, Johann W. Bauer, and Kamil Onder. 2013. 'Imbalance of Intermediate Filament Component Keratin 14 Contributes to Increased Stress Signalling in

- Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Experimental Dermatology* 22 (4): 292–94. <https://doi.org/10.1111/exd.12112>.
- Wally, Verena, Marietta Brunner, Thomas Lettner, Martin Wagner, Ulrich Koller, Andrea Trost, Eva M. Murauer, Stefan Hainzl, Helmut Hintner, and Johann W. Bauer. 2010. 'K14 mRNA Reprogramming for Dominant Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Human Molecular Genetics* 19 (23): 4715–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq405>.
- Wally, Verena, Alain Hovnanian, Juliette Ly, Hana Buckova, Victoria Brunner, Thomas Lettner, Michael Ablinger, et al. 2018. 'Diacerein Orphan Drug Development for Epidermolysis Bullosa Simplex: A Phase 2/3 Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial'. *Journal of the American Academy of Dermatology* 78 (5): 892-901.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.01.019>.
- Wally, Verena, Sophie Kitzmueller, Florian Lagler, Angelika Moder, Wolfgang Hitzl, Martin Wolkersdorfer, Peter Hofbauer, et al. 2013. 'Topical Diacerein for Epidermolysis Bullosa: A Randomized Controlled Pilot Study'. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (1): 69. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-69>.
- Wally, Verena, Thomas Lettner, Patricia Peking, Doris Peckl-Schmid, Eva M. Murauer, Stefan Hainzl, Helmut Hintner, and Johann W. Bauer. 2013. 'The Pathogenetic Role of IL-1 $\beta$  in Severe Epidermolysis Bullosa Simplex'. *Journal of Investigative Dermatology* 133 (7): 1901–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.31>.
- Wang, Fengrong, Abigail Zieman, and Pierre A. Coulombe. 2016. 'Skin Keratins'. *Methods in Enzymology* 568: 303–50. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.09.032>.
- Watson, Rachel E. B., and Christopher E. M. Griffiths. 2019. *Cutaneous Photoaging*. Royal Society of Chemistry.
- Webber, Beau R, Mark J Osborn, Amber N McElroy, Kirk Twaroski, Cara-lin Lonetree, Anthony P DeFeo, Lily Xia, et al. 2016. 'CRISPR/Cas9-Based Genetic Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa'. *NPJ Regenerative Medicine* 1 (December): 16014. <https://doi.org/10.1038/npjregenmed.2016.14>.
- Weber, Miriam S, Matthias Eibauer, Suganya Sivagurunathan, Thomas M Magin, Robert D Goldman, and Ohad Medalia. 2021. 'Structural Heterogeneity of Cellular K5/K14 Filaments as Revealed by Cryo-Electron Microscopy'. Edited by Andrew P Carter, Anna Akhmanova, and Helen Foster. *eLife* 10 (July): e70307. <https://doi.org/10.7554/eLife.70307>.
- Weiner, M., A. Stein, S. Cash, J. De Leoz, and J-D. Fine. 2004. 'Tetracycline and Epidermolysis Bullosa Simplex: A Double-blind, Placebo-controlled, Crossover Randomized Clinical Trial'. *British Journal of Dermatology* 150 (3): 613–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2004.05816.x>.
- Weng, Tingting, Pan Wu, Wei Zhang, Yurong Zheng, Qiong Li, Ronghua Jin, Haojiao Chen, et al. 2020. 'Regeneration of Skin Appendages and Nerves: Current Status and Further Challenges'. *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02248-5>.
- Williams, Luis A., Brandi N. Davis-Dusenbery, and Kevin C. Eggan. 2012. 'SnapShot: Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells'. *Cell* 149 (5): 1174-1174.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.015>.
- Wilson, A. K., P. A. Coulombe, and E. Fuchs. 1992. 'The Roles of K5 and K14 Head, Tail, and R/K L L E G E Domains in Keratin Filament Assembly in Vitro'. *The Journal of Cell Biology* 119 (2): 401–14. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.401>.
- Wilson, Paul A., and Ali Hemmati-Brivanlou. 1995. 'Induction of Epidermis and Inhibition of Neural Fate by Bmp-4'. *Nature* 376 (6538): 331–33. <https://doi.org/10.1038/376331a0>.
- Wong, Victor W., Michael Sorkin, Jason P. Glotzbach, Michael T. Longaker, and Geoffrey C. Gurtner. 2011. 'Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing'. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 969618. <https://doi.org/10.1155/2011/969618>.
- Wu, K. C., J. T. Bryan, M. I. Morasso, S. I. Jang, J. H. Lee, J. M. Yang, L. N. Marekov, D. A. Parry, and P. M. Steinert. 2000. 'Coiled-Coil Trigger Motifs in the 1B and 2B Rod Domain Segments Are Required for the Stability of Keratin Intermediate Filaments'. *Molecular Biology of the Cell* 11 (10): 3539–58. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.10.3539>.

- Wu, Shao-Shuai, Qing-Cui Li, Chang-Qing Yin, Wen Xue, and Chun-Qing Song. 2020. 'Advances in CRISPR/Cas-Based Gene Therapy in Human Genetic Diseases'. *Theranostics* 10 (10): 4374–82. <https://doi.org/10.7150/thno.43360>.
- Yamamoto, Takuya, Miki Ebisuya, Fumito Ashida, Kazuo Okamoto, Shin Yonehara, and Eisuke Nishida. 2006. 'Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression'. *Current Biology* 16 (12): 1171–82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.044>.
- Yamanaka, Shinya. 2020. 'Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges'. *Cell Stem Cell* 27 (4): 523–31. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>.
- Yang, Bei, Li Yang, and Jia Chen. 2019. 'Development and Application of Base Editors'. *The CRISPR Journal* 2 (2): 91–104. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0001>.
- Yang, Ruifeng, Ying Zheng, Michelle Burrows, Shujing Liu, Zhi Wei, Arben Nace, Wei Guo, Suresh Kumar, George Cotsarelis, and Xiaowei Xu. 2014. 'Generation of Folliculogenic Human Epithelial Stem Cells from Induced Pluripotent Stem Cells'. *Nature Communications* 5 (1): 3071. <https://doi.org/10.1038/ncomms4071>.
- Youssefian, Leila, Hassan Vahidnezhad, Mohammadreza Barzegar, Qiaoli Li, Soheila Sotoudeh, Ameneh Yazdanfar, Amir Hooshang Ehsani, et al. 2015. 'The Kindler Syndrome: A Spectrum of FERMT1 Mutations in Iranian Families'. *The Journal of Investigative Dermatology* 135 (5): 1447–50. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.9>.
- Yu, Junying, Kejin Hu, Kim Smuga-Otto, Shulan Tian, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. 2009. 'Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences'. *Science (New York, N.Y.)* 324 (5928): 797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. 'Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells'. *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1917–20. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>.
- Yu, Yi, Yijun Guo, Qiqi Tian, Yuanqing Lan, Hugh Yeh, Meng Zhang, Ipek Tasan, Surbhi Jain, and Huimin Zhao. 2020. 'An Efficient Gene Knock-in Strategy Using 5'-Modified dsDNA Donors with Short Homology Arms'. *Nature Chemical Biology* 16 (4): 387–90. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0432-1>.
- Zhang, Ya, Hongyuan Zhang, Zhipeng Wang, Zhaowei Wu, Yu Wang, Na Tang, Xuexia Xu, Suwen Zhao, Weizhong Chen, and Quanjiang Ji. 2020. 'Programmable Adenine Deamination in Bacteria Using a Cas9-Adenine-Deaminase Fusion'. *Chemical Science* 11 (6): 1657–64. <https://doi.org/10.1039/c9sc03784e>.
- Zhao, Yang, Xiaolei Yin, Han Qin, Fangfang Zhu, Haisong Liu, Weifeng Yang, Qiang Zhang, et al. 2008. 'Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSC Generation'. *Cell Stem Cell* 3 (5): 475–79. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.002>.
- Zomer, Helena D., and Andrea G. Trentin. 2018. 'Skin Wound Healing in Humans and Mice: Challenges in Translational Research'. *Journal of Dermatological Science* 90 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009>.