



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES BIOMÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES

La matrice extracellulaire épidermique

caractérisation de TSG-6 et de l'hyaluronan en contexte inflammatoire

Evrard, Celine

Award date:
2022

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

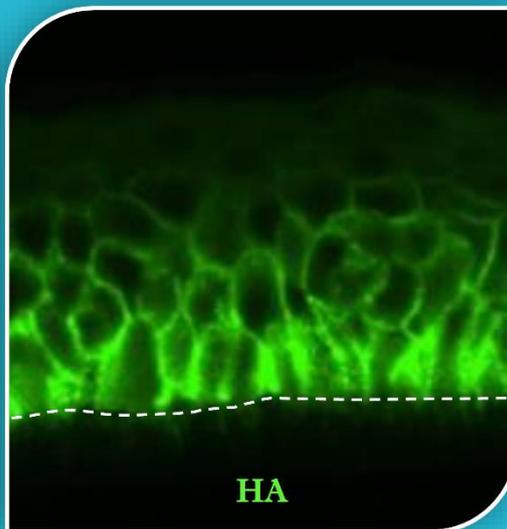
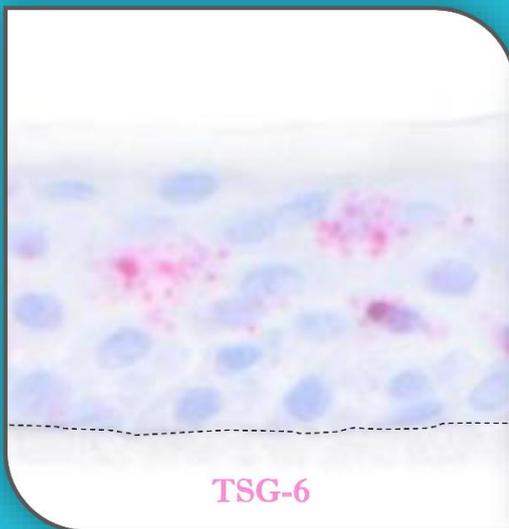
Download date: 03. Jul. 2025

La matrice extracellulaire épidermique : caractérisation de TSG-6 et de l'hyaluronan en contexte inflammatoire

Dissertation présentée en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Sciences Biomédicales et
Pharmaceutiques

Céline
Evrard

21 janvier
2022



Composition du jury :

Pr. Marielle Boonen, *présidente du jury*

Pr. Olivier De Backer

Dr. Romain Debret

Pr. Christophe Deroanne

Pr. Patricia Renard

Pr. Bruno Flamion, *co-promoteur*

Pr. Yves Poumay, *promoteur*

Université de Namur, Belgique

Université de Namur, Belgique

Université Claude Bernard – Lyon 1, France

Université de Liège, Belgique

Université de Namur, Belgique

Université de Namur, Belgique

Université de Namur, Belgique

Remerciements

Au moment même où j'écris ces lignes, je termine six années et demi de travail, d'investissement, de rencontres, de larmes mais aussi de rires. Si je n'ai pas trouvé le remède contre une grave maladie ou encore découvert une protéine extraordinaire, j'ai élargi mon domaine de compétences et surtout j'ai appris à mieux me connaître, gagné en maturité et fait la rencontre de personnes exceptionnelles qui m'ont donné confiance. C'est donc tout naturellement que je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué à différents niveaux à l'aboutissement de cette thèse.

En priorité, je tiens à vivement remercier Monsieur Poumay qui m'a accueillie dans son laboratoire, m'a faite confiance et m'a aidée à mener à bien ce projet. Malgré ses nombreuses occupations et obligations, il a toujours pris le temps de m'écouter, de me conseiller, de me guider et de partager ses nombreuses connaissances. Je retiens particulièrement son humanité et la gentillesse avec laquelle il gère son équipe. Je remercie également Monsieur Flamion, mon co-promoteur, pour ses conseils avisés et ses idées partagées depuis l'étranger. Même si elle n'a pas le statut de co-promotrice, je tiens à souligner l'investissement de Catherine qui, malgré tout, a joué ce rôle et a su me rassurer et me réorienter quand c'était nécessaire. Nos nombreuses discussions m'ont beaucoup aidée et appris, sans oublier sa précieuse aide dans le « toilettage » des rédactions ! 😊

Je souhaiterais également remercier les membres du jury, à savoir la professeure Marielle Boonen, le professeur Olivier De Backer, le Docteur Romain Debret, le professeur Christophe Deroanne et la professeure Patsy Renard, qui ont relu le manuscrit et significativement contribué à son amélioration. Merci pour les riches discussions que nous avons partagées sur la matrice extracellulaire, l'HA, le CRISPR/Cas9 et la protéine TSG-6 ainsi que les remarques et conseils bienveillants et pertinents qui ont accru mon expertise dans le domaine.

Ensuite, des remerciements s'imposent vis-à-vis de tous ceux qui ont partagé mon quotidien professionnel. Tout d'abord, les « anciens » qui ont accompagné mes premiers pas dans le domaine de la recherche fondamentale et plus particulièrement sur l'acide hyaluronique. Le premier à qui je pense est Jérémy, mon « maître », qui m'a initiée à la recherche, qui a été présent du début de mon mémoire à la fin de ma thèse et qui a été de bons conseils (parfois) et angoissant (souvent). Merci aussi à Abdallah, mon post-doc préféré, qui m'a beaucoup soutenue et conseillée dans les moments difficiles du début de thèse. Je remercie également Evelyne et Joanna, mes co-assistantes avec qui j'ai beaucoup discuté boulot mais pas que... et avec lesquelles j'ai passé d'excellents moments. Je ne peux oublier la famille recomposée « LabCeTi-LNR » actuelle qui ne cesse de s'agrandir et dans laquelle chaque membre a contribué, à sa manière, à l'élaboration de la présente thèse. Merci à Kathleen et aux Val's pour leur soutien technique, leur dynamisme et la mise en place d'un cadre de recherche agréable. Merci à Massimo et Geoffrey qui ont solutionné tous mes problèmes informatiques et qui répondaient présent chaque fois que je criais « au secours ».

Merci à Charles pour son oreille attentive et disponible à tout moment, ses petits mails sympathiques et encourageants et son enthousiasme. Merci à Audrey, l'élève studieuse de Serdaigle, avec qui j'ai partagé la presque totalité de mes années de thèse. Merci à Nico et Lindsay, la team d'assistants nouvelle génération, qui rendent les TP tellement funs ; je suis triste que notre redoutable collaboration prenne fin... Un tout grand merci à Emilie, ma copiiiine de labo, qui me supporte depuis le premier jour de ma thèse et avec qui j'ai partagé les plus beaux congrès, et les plus compliqués aussi ! Le grand Tatou que tu es m'aura menée sur la bonne voie ^^ Et finalement, le petit dernier, Bastien, qui me pousse vers la sortie... Un jour, je te pardonnerai 😊 Pour terminer, je n'oublie pas mes « enfants », Juliette et Chloé, que j'ai aimé encadrer et initier à la recherche et ses trop nombreux déboires !

A côté de la recherche, les travaux pratiques ont également représenté une partie significative mais agréable de ces six dernières années. Pour tout cet apprentissage et l'encadrement, je remercie chaleureusement Caro ainsi que Marie-Paule et Adeline dont j'ai envahi le bureau ces derniers mois. J'ai adoré apprendre et enseigner à leur côté et sous leurs conseils avisés.

Je m'en voudrais de ne pas associer à ces remerciements les autres collègues de l'URPhyM comme Olivia, Pauline, Inès, Laurent, ... pour leur partage et leur bonne humeur et particulièrement l'ODB'team qui m'a beaucoup apporté dans l'établissement de ces foutues cellules KO ! Un tout grand merci à Olivier, Axelle, Domi, Lucie et Alexis pour leur apport scientifique mais aussi et surtout pour leur accueil et leur sympathie. Enfin, je tiens également à citer Damien, Marino, Myriam, Julie et Sébastien, les amis d'URBC, avec qui j'ai énormément échangé sur la science mais aussi sur la vie en général.

Pour terminer, je voudrais consacrer ce dernier paragraphe aux personnes qui ne sont pas nécessairement dans le domaine de la recherche mais qui ont fait preuve d'un soutien indéfectible : les amis et la famille proche. De manière plus particulière, ce sont mes parents ainsi que ma sœur et mon frère que je souhaiterais profondément remercier, bien qu'aucun mot, ni aucune phrase ne puissent jamais exprimer la gratitude que j'ai envers eux tant ils ont été importants pour moi. Pour rester dans le domaine de la peau, on peut dire qu'ils ont été mon ancrage, ma base à l'instar de la lame basale pour l'épiderme. J'en profite également pour m'excuser pour les moments difficiles que je leur ai fait subir... Merci de m'avoir soutenue, accompagnée et motivée durant cette tranche de vie si particulière !

Abréviations

4-MU	4-methylumbelliférone
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CA2	Carbonic Anhydrase 2
CD44	Cluster of Differentiation 44
CDK	Kinase cycline-dépendante
CFU	Unité formant colonie
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
DA	Dermatite Atopique
Da	Dalton
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Récepteur
EPK	Epithélium Pavimenteux Simple Kératinisé
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAG	Glycosaminoglycan
GFP	Green Fluorescent Protein
GlcAc	N-acétyl-D-glucosamine
GlcUA	D-glucuronate
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl Inositol
HA	Hyaluronan
HABP	HA-binding protein
HAS	HA Synthase
HB-EGF	Heparin-binding EGF
HC	Heavy Chain/Chaîne lourde
HYAL	Hyaluronidase
IL	Interleukines
ITI	Inter- α -trypsine inhibiteur

JED	Jonction épidermo-dermique
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDCK	Cellule Madin-Darby Canine Kidney
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase Matricielle
NAK	Normal Adult Keratinocyte
NELL2	neural epidermal growth factor-like 2
NFkB	Nuclear factor-kappa B
NLR	Node-like Récepteur
NMF	Facteur d'hydratation naturel
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
RHAMM	Hyaluronan-mediated motility receptor
RHE	Epiderme Humain Reconstruit
RNP	Ribonucléoprotéine
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
shRNA	Small-Hairpin RNA
siRNA	Small-Interfering RNA
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
StrepH	Hyaluronidase bactérienne
TEER	Résistance Electrique Trans-Epithéliale
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T Helper
TLR	Toll-like Récepteur
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFAIP6	TNF α induced protein 6
TSG-6	TNF α stimulated gene 6

UDP	Uridine Diphosphate
UGDH	UDP-Glucose 6-Déshydrogénase
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

INTRODUCTION.....	11
1. La peau	13
1.1. L'hypoderme.....	13
1.2. Le derme.....	14
1.3. L'épiderme.....	15
1.3.1. Composants/populations cellulaires	15
1.3.2. Organisation tissulaire et processus de différenciation	17
1.3.3. Fonctions de barrière	22
1.3.4. La matrice extracellulaire épidermique	29
2. L'hyaluronan.....	33
2.1. Généralités	33
2.1.1. Structure.....	33
2.1.2. Fonctions générales de l'hyaluronan	34
2.1.3. Localisation.....	35
2.2. Synthèse	36
2.3. Dégradation.....	39
2.4. Fonctions de l'HA épidermique	43
2.4.1. Régulation de la prolifération des kératinocytes	43
2.4.2. Régulation de la différenciation des kératinocytes.....	45
2.4.3. Participation à la barrière épidermique	46
2.4.4. Cicatrisation et inflammation.....	47
2.5. Hyaladhérines.....	53
3. TSG-6	56
3.1. Généralités	56
3.2. Fonctions de la protéine TSG-6	58
3.2.1. Organisation de la matrice extracellulaire	58
3.2.2. Régulation cellulaire et régulation immunitaire	60
3.3. Expression tissulaire de la protéine TSG-6	61
3.3.1. Expression de la protéine TSG-6 induite par l'inflammation	61
3.3.2. Expression constitutive de la protéine TSG-6.....	65
3.3.3. Interaction HA-TSG-6 en contexte inflammatoire.....	67
OBJECTIFS.....	71

RESULTATS.....	75
PARTIE 1 : Implication de la hyaluronidase 1 dans la dégradation de l'HA épidermique	77
PARTIE 2 : Etude des conséquences de l'absence de la protéine TSG-6 sur l'HA épidermique.....	93
2.1. Modèles et outils d'étude	93
2.1.1. Reconstruction d'épidermes à partir de kératinocytes N/TERT.....	93
2.1.2. Edition du gène <i>TNFAIP6</i> des kératinocytes N/TERT par CRISPR/Cas9	98
2.1.3. Adaptations de modèles inflammatoires sur RHE produits par les kératinocytes N/TERT101	
2.2. Caractérisation de l'expression du TSG-6 épidermique en conditions saines et inflammatoires et investigation de ses rôles	104
DISCUSSION & RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	125
1. Etude du rôle d'une protéine par knockout dans des RHE	127
1.1. Diminution d'expression (ARN interférant) <i>versus</i> invalidation génique (CRISPR/Cas9)....	127
1.2. Invalidation génique par CRISPR/Cas9 dans les RHE : choix du type cellulaire.....	132
2. Etude de l'HA et de la protéine TSG-6 épidermique : limitations liées à l'utilisation des RHE ...	135
2.1. Implication de la lame basale	135
2.2. Implication de l'ITI	137
2.3. Implication des autres cellules et constituants de la MEC.....	139
2.3.1. Les cellules immunitaires	139
2.3.2. Les fibroblastes.....	141
2.3.3. Les constituants de la MEC.....	141
3. Impact de la désorganisation de la MEC sur la capacité de réponse des kératinocytes à des stimuli	143
3.1. Migration des kératinocytes.....	143
3.2. Réponses à l'(HB-)EGF	145
3.3. Réponses aux infections par dermatophytes.....	148
3.4. Réponses aux cytokines Th2 (IL-4 et IL-13)	150
CONCLUSIONS.....	155
ANNEXES : CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES.....	159
REFERENCES.....	209

INTRODUCTION

1. La peau

Décrite en 1953 comme la « façade monumentale du corps humain », la peau représente l'organe le plus imposant du corps humain en termes de poids et s'étend sur une surface de 1,5 à 2m². De par sa localisation d'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur, la peau joue un double rôle. D'une part, elle représente la première barrière de protection contre les agressions chimiques, physiques et biologiques de l'environnement externe et d'autre part, elle permet de contenir les fluides internes. Afin d'assurer ses fonctions de barrière et de maintien de l'homéostasie, la peau est organisée en trois couches : l'hypoderme (tissu le plus profond), le derme (tissu intermédiaire) et l'épiderme (tissu le plus superficiel). Diverses structures spécialisées telles que des follicules pileux et des glandes sébacées et sudoripares sont également présentes dans la peau (Figure 1). L'épaisseur de la peau ainsi que la densité des appendices cutanés varient d'un endroit à l'autre du corps humain (Montagna et Parakkal, 1974) (Freinkel et Woodley, 2001).

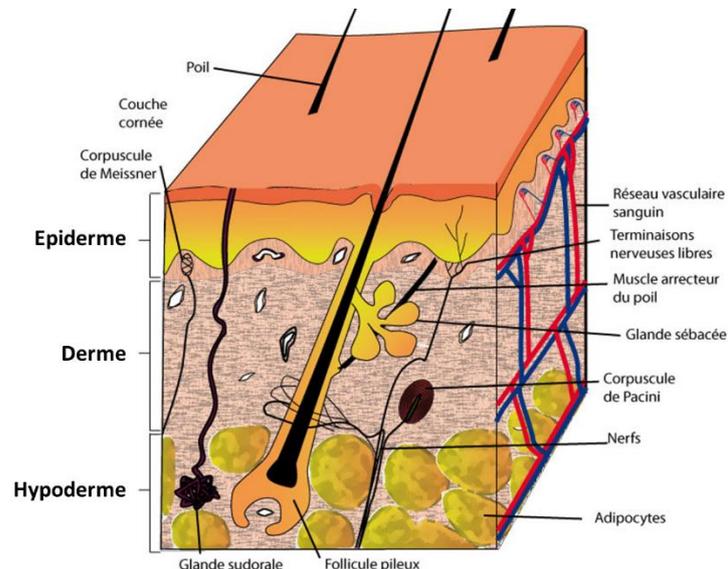


Figure 1 : Représentation schématique de la peau et de ses annexes (biologidelapeau.fr)

1.1. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Par son épaisseur, elle assure une protection mécanique des structures internes sous-jacentes. L'hypoderme est composé d'un tissu conjonctif dense en cellules de type adipocytes entre lesquels résident de nombreux vaisseaux sanguins et fibres nerveuses. Les adipocytes sont de grandes cellules contenant des réserves de graisse par accumulation d'acides gras et de glycérides. Ces stocks de graisse confèrent à l'hypoderme un rôle de thermorégulation et de réserve énergétique libérable dans le sang (Freinkel et Woodley, 2001).

1.2. Le derme

Le derme est la couche intermédiaire de la peau. Peu cellularisé en conditions normales, il est majoritairement composé de fibres (collagène et élastique). Les fibres de collagène de type I, III et V y sont les plus représentées et confèrent au derme sa résistance aux forces de traction alors que les fibres élastiques assurent la capacité de déformation du tissu. Des molécules non-fibreuses telles que des protéoglycans et des glycosaminoglycans (notamment l'acide hyaluronique) participent également à la formation d'une large matrice extracellulaire amorphe au travers de laquelle des cellules peuvent migrer. Ces molécules non-fibreuses ont la capacité de retenir jusqu'à 1000x leur propre volume en eau conférant au derme sa capacité à absorber des déformations et des chocs avec une résilience élevée. Toutes ces molécules de la matrice extracellulaire sont synthétisées par les fibroblastes, cellules résidentes du derme (Freinkel et Woodley, 2001).

Le derme est composé de 2 régions : le derme réticulaire et le derme papillaire, tous deux irrigués par un riche réseau vasculaire. Chaque région dermique possède un réseau vasculaire propre nommé plexus vasculaire papillaire superficiel dans le derme papillaire et plexus cutané profond dans le derme réticulaire. Ces deux réseaux sont reliés entre eux par des anastomoses artério-veineuses participant à la régulation thermique cutanée et à l'apport en oxygène et nutriments dans les trois couches de la peau. Le derme est également fortement innervé par des terminaisons nerveuses libres qui traversent le derme et peuvent rejoindre l'épiderme ainsi que par diverses terminaisons encapsulées. Le **derme réticulaire** est caractérisé par la présence de corpuscules de Vater-Pacini et Ruffini qui sont respectivement des récepteurs du toucher et des propriocepteurs. Le derme réticulaire est la couche la plus profonde et la plus épaisse du derme. Il est composé de nombreuses fibres de collagènes et élastiques qui forment un réseau au sein duquel se situent les appendices cutanés. Le **derme papillaire** est quant à lui un tissu conjonctif lâche innervé jusqu'à des corpuscules de Wagner-Meissner impliqués dans la perception des mouvements. Comme son nom l'indique, le derme papillaire forme des « papilles » qui correspondent à des extensions du derme vers l'épiderme. Ses replis permettent un meilleur ancrage de l'épiderme sur le derme sous-jacent et renforcent la jonction épidermo-dermique. Au niveau de cette jonction, le derme interagit avec l'épiderme dans des situations de cicatrisation cutanée et de remodelage (Freinkel et Woodley, 2001).

Les différents constituants du derme lui confèrent donc diverses fonctions. La matrice extracellulaire riche en fibres permet d'absorber les chocs et de maintenir l'hydratation cutanée, le double réseau vasculaire participe à l'homéostasie thermique et les nombreuses terminaisons nerveuses encapsulées jouent un rôle dans la régulation de la pression et du toucher alors que les terminaisons nerveuses libres sont impliquées dans les sensations de douleur et de température. De plus, le derme est un tissu

de soutien pour l'épiderme en termes d'ancrage, de nutrition (diffusion des nutriments et de l'oxygène) et d'immunité (Walters et al., 2002).

1.3. L'épiderme

Couche la plus superficielle de la peau, l'épiderme se trouve au contact direct avec l'environnement extérieur et est donc majoritairement impliqué dans la fonction de barrière cutanée. L'épiderme peut être qualifié d'épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK). L'épiderme est donc lui-même composé de plusieurs couches cellulaires dont le nombre varie selon la localisation. Les zones les plus fines, telles que celles observées au niveau des paupières, possèdent un épiderme dont l'épaisseur est de 50µm environ. On parle d'EPSK à couche cornée mince (ou de type B). Les EPSK à couche cornée épaisse (ou de type A) ont une épaisseur maximale de 1 mm environ et se localisent au niveau des faces palmaire et plantaire (site <http://biologiedelapeau.fr/>). Ces épithéliums sont en constant renouvellement, nécessitant une régulation fine des processus de prolifération, différenciation et desquamation. On estime que le temps de régénération total de l'épiderme est de 45 jours : 31 jours de renouvellement des kératinocytes dans les couches vivantes de l'épiderme et 14 jours de renouvellement des cornéocytes (Halprin, 1972).

1.3.1. Composants/populations cellulaires

L'épiderme est composé de 4 types cellulaires. Les kératinocytes représentent la population cellulaire majoritaire. Répartis dans l'épithélium, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes constituent les 3 autres types cellulaires résidents de ce tissu (Figure 2).

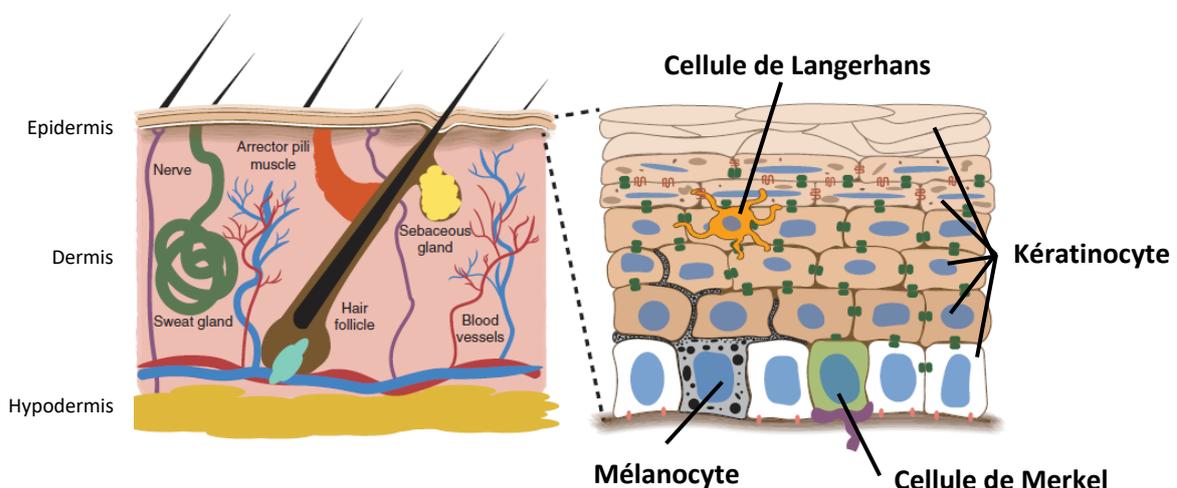


Figure 2 : Représentation schématique des 4 types cellulaires résidents de l'épiderme (adapté de Moreci et al., 2020)

Les **cellules de Langerhans** représentent 2 à 3% des cellules de l'épiderme. Il s'agit de cellules immunitaires provenant de la moelle osseuse qui migrent entre les kératinocytes des couches supra-basales de l'épiderme où elles se lient aux kératinocytes voisins via les E-cadhérines (Freinkel et Woodley, 2001) (Yan et al., 2020). D'abord considérées comme un sous-type des cellules dendritiques, elles sont maintenant considérées comme originaires de la lignée des macrophages (Ogawa et al., 2018). Impliquées dans l'immunité innée, les cellules de Langerhans sont capables de reconnaître des antigènes, phagocyter des organismes étrangers, les cliver et migrer dans les ganglions lymphatiques pour y présenter des peptides immunogènes aux lymphocytes T et déclencher une réponse immunitaire (Freinkel et Woodley, 2001).

Les **cellules de Merkel** sont des cellules neuroendocrines qui descendent de la lignée épidermique (Morrison et al., 2009). Elles sont localisées entre les kératinocytes de la couche basale auxquels elles sont liées par des desmosomes. Appelées aussi « cellules du toucher », ces cellules fonctionnent comme des mécanorécepteurs et permettent la détection de formes, textures, courbes, etc. (Freinkel et Woodley, 2001) (Boulais et Misery, 2007). L'innervation de l'épiderme est également assurée par les terminaisons nerveuses libres impliquées dans la perception de la douleur, des températures et des démangeaisons. Ces terminaisons passent majoritairement entre les kératinocytes des couches basales, épineuses et granuleuses mais elles peuvent également progresser dans les kératinocytes via des « tunnels » cytoplasmiques suggérant une communication spécifique entre les kératinocytes et le système nerveux (Talagas et al., 2020).

Les **mélanocytes** sont des cellules dérivées de la crête neurale. Comme les cellules de Merkel, elles sont situées au niveau de la couche basale de l'épiderme et se lient aux kératinocytes adjacents via des E-cadhérines. Les mélanocytes sont caractérisés par la présence de dendrites qui s'insinuent entre les kératinocytes des couches supra-basales. Les mélanocytes sont responsables de la pigmentation de la peau. En effet, ils produisent de la mélanine au sein des mélanosomes, lesquels migrent le long des prolongements dendritiques avant d'être transférés aux kératinocytes avoisinants. La mélanine forme alors un « écran » à la face apicale du noyau des kératinocytes, protégeant le matériel génétique des stress ultraviolets (UV). Ce processus de transfert des mélanosomes est stimulé lorsque les kératinocytes sont exposés à un stress UV (Freinkel et Woodley, 2001) (Lambert et al., 2019).

Les **kératinocytes** représentent 90 à 95% des cellules épidermiques. Le cytoplasme des kératinocytes est rempli de filaments intermédiaires de kératines qui les caractérisent. Ces cellules reposent sur la lame basale où elles prolifèrent avant d'entamer le processus de différenciation ou kératinisation. Durant ce processus, les kératinocytes vont subir des changements morphologiques et biochimiques menant *in fine* à leur desquamation. Sur base de ces modifications morphologiques, l'épiderme peut

être subdivisé en 4 à 5 couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche transitoire éventuelle et la couche cornée (Freinkel et Woodley, 2001).

1.3.2. Organisation tissulaire et processus de différenciation

Lors de la formation et du renouvellement de l'épiderme, les kératinocytes prolifèrent au niveau de la couche basale avant d'entamer un processus de différenciation, appelé aussi kératinisation ou cornification au niveau de l'épiderme. La fin de ce processus est caractérisée par une mort cellulaire programmée. Durant ces différentes étapes, les kératinocytes subissent des modifications de leur expression génique. En fonction du stade de différenciation, les kératinocytes vont exprimer ou réprimer l'expression d'un certain nombre de protéines qui peuvent être utilisées comme « marqueurs de différenciation » (Figure 3).

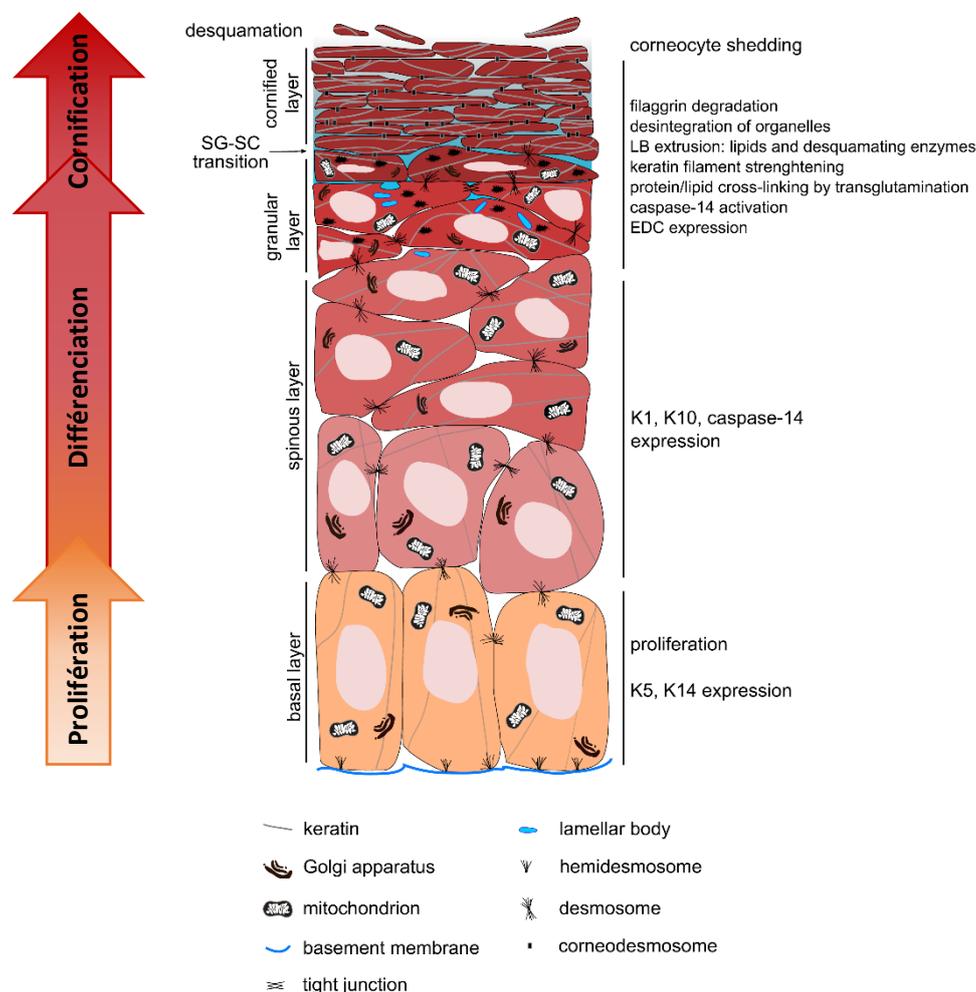


Figure 3 : Représentation schématique des couches de l'épiderme composé de kératinocytes proliférant au niveau de la couche basale avant d'entrer dans le processus de différenciation et enfin de cornification. Le côté droit de la figure mentionne les expressions protéiques et processus clés des étapes de prolifération, différenciation et cornification (Adapté de Eckhart et al., 2013)

La **couche basale** est la couche la plus profonde de l'épiderme. Il s'agit d'une couche composée d'une seule assise cellulaire qui repose directement sur la lame basale. Les kératinocytes basaux sont ancrés sur la membrane basale par des intégrines. Ces protéines sont des récepteurs transmembranaires composés d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta qui interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire dermique d'une part et avec les filaments intermédiaires de kératines des kératinocytes épidermiques d'autre part. De plus, l'intégrine $\beta 1$ lie la matrice extracellulaire directement aux filaments d'actine des kératinocytes ; c'est ce qu'on appelle des adhésions focales (Moreci et al., 2020). L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ lie les hémidesmosomes, plaques d'attache cytoplasmique, à la laminine 332 (pour une revue : Simpson et al., 2011). Les kératinocytes sont liés entre eux par deux types de structure : les jonctions *adherens* qui établissent des connexions entre les microfilaments d'actine de cellules adjacentes grâce aux E-cadhérines et les desmosomes qui lient les filaments intermédiaires de kératine (Moreci et al., 2020). Parmi les 54 types de filaments intermédiaires de kératine, c'est la paire kératine 5 / kératine 14 qui est majoritairement exprimée dans les kératinocytes de la couche basale (Eckhart et al., 2013). Cette couche est aussi appelée « couche germinative » car elle est le siège des cellules souches et de la prolifération. Les cellules souches épidermiques se divisent lentement et sont caractérisées par une division asymétrique. Après division cellulaire, une des deux cellules-filles garde son pouvoir clonogène indéfini alors que la deuxième cellule-fille devient une cellule d'amplification transitoire. Ces cellules sont caractérisées par un haut potentiel de division mais limité dans le temps. Lorsque ces cellules arrêtent de se diviser, elles perdent leur capacité d'adhésion à la lame basale sous le contrôle de p63, migrent vers les couches supra-basales et entrent en différenciation. Lorsqu'ils quittent la couche basale, les kératinocytes cessent d'exprimer la paire K5/K14 et se mettent à exprimer des composants des filaments intermédiaires de kératine 1 et kératine 10 (Eckhart et al., 2013).

La **couche épineuse** est une couche composée de 5 à 10 assises cellulaires dont la hauteur des cellules diminue en montant vers l'extérieur du corps humain. Le nom de couche « épineuse » provient des nombreuses jonctions de type desmosome qui attachent les kératinocytes entre eux et donnent des images d'épines en microscopie optique. Les desmosomes de la couche épineuse diffèrent de ceux présents dans la couche basale car ils lient la paire de kératine 1 et kératine 10 et ils présentent une surexpression de la desmogléine 1 (Moreci et al., 2020). Ces nombreux desmosomes participent au maintien de l'intégrité du tissu. Lors de cette étape de différenciation, les corps d'Odland (corps lamellaires) apparaissent dans le cytoplasme des kératinocytes (Freinkel et Woodley, 2001).

La **couche granuleuse** est composée de 1 à 3 couche(s) de cellules pavimenteuses. Dans ces kératinocytes apparaissent des grains de kératohyaline et le noyau se pycnose. Les grains de kératohyaline contiennent des filaments intermédiaires de kératine, la profilaggrine (précurseur de la

filaggrine) et la loricrine. Ces protéines, bien qu'apparaissant dans une des couches vivantes de l'épiderme, ne seront réellement fonctionnelles qu'au niveau de la couche cornée (Freinkel et Woodley, 2001).

Dans les zones supérieures de cette couche, les corps lamellaires maturés dans l'appareil de Golgi vont fusionner avec la membrane plasmique apicale des kératinocytes et déverser leur contenu en glycoprotéines, glycolipides, phospholipides, stérols libres dans la matrice extracellulaire. Cette matrice lipidique va entourer les cellules cornées de manière à fermer les espaces intercellulaires (Freinkel et Woodley, 2001) (Moreci et al., 2020). De ces corps lamellaires sont également libérés des peptides antimicrobiens (voir point 1.3.3.) et des enzymes de type hydrolases acides (sérine protéase, phospholipase A2, sphingomyélinase, β -glucocérébrosidase) et inhibiteurs de protéases impliqués dans le processus de desquamation (Gunathilake, 2015).

C'est aussi dans cette couche que les jonctions serrées apparaissent via l'expression des claudines et des occludines (Moreci et al., 2020).

Une **couche de transition** est parfois considérée entre la couche granuleuse et la couche cornée, particulièrement au niveau des épidermes palmo-plantaires. Au niveau de cette couche apparaissent des signes de mort cellulaire programmée : augmentation du nombre d'organites ressemblants à des lysosomes et diminution du nombre de mitochondries, d'appareils de Golgi, de ribosomes et de réticulums endoplasmiques (Lavker et Matoltsy, 1970).

La **couche cornée** est la couche ultime de la différenciation et est composée de cellules pavimenteuses anucléées appelées cornéocytes. Le nombre d'assises cellulaires est dépendant de la localisation de l'épiderme. Les épidermes de type B (épidermes des paupières, du dos,...) sont caractérisés par la présence d'une quinzaine de couche alors que les épidermes de type A (épidermes face palmaire et face plantaire) possèdent jusqu'à une centaine de couche (Freinkel et Woodley, 2001).

Cette ultime étape de la différenciation est appelée cornification et fait intervenir plusieurs processus (Figure 4) : (a) Les organites (noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, lysosomes) sont dégradés. Les processus de dégradation impliqués dans ce type particulier de mort programmée ne sont pas encore très bien connus. Contrairement à la mort cellulaire programmée par apoptose qui concerne une cellule isolée, la cornification concerne toutes les cellules d'une couche (Costanzo et al., 2015). Le noyau pycnotique est lysé et disparaît. En effet, une augmentation de l'expression d'endonucléases est observée dans les stades tardifs de la différenciation épidermique (Eckhart et al., 2013). D'autres part, des nucléophagosomes ont également été observés dans la couche granuleuse, suggérant que l'autophagie (auto-dégradation d'éléments intracellulaires via les lysosomes) soit, au moins en partie, responsable de la dégradation des organites (Akinduro et al., 2016). Une autophagie

déficiente provoque d'ailleurs des pathologies cutanées impliquant des problèmes de barrière tel que le psoriasis, caractérisé par de la parakératose c'est-à-dire des restes de noyaux dans les cornéocytes (Akinduro et al., 2016). L'élimination des mitochondries se fait notamment via mitophagie. De manière général, le cycle fission/fusion caractéristique des mitochondries est maintenu en équilibre. Durant le processus de différenciation, la machinerie de fission est déclenchée et stabilisée par NIX, un récepteur d'autophagie, ce qui induit la fragmentation mitochondriale menant *in fine* à la dégradation de ces organites (Simpson et al., 2021). (b) Les filaments intermédiaires de kératine sont agrégés par la filaggrine sous le contrôle de la transglutaminase 1. Lors de la mort de la cellule, la concentration intracellulaire en ion calcium augmente. Cette concentration accrue en ion calcium induit l'activation de la transglutaminase 1, une enzyme présente dès la couche épineuse mais inactive (Eckhart et al., 2013) (Candi et al., 2005). De manière intéressante, lors de son ascension vers les couches les plus superficielles et grâce à l'acidification des couches supérieures, la filaggrine est ensuite dégradée entre autres en acides aminés et forme les facteurs naturels d'hydratation (NMF) essentiel à l'hydratation cutanée (Fluhr et al., 2010). (c) D'autres protéines d'enveloppe telles que l'involucrine, la loritrine, les *small proline-rich proteins* (SPR), les protéines S100A sont réticulées par les transglutaminases pour former une enveloppe cornée d'environ 7 à 15 nm d'épaisseur à la face interne de la membrane plasmique (Candi et al., 2005) (Eckhart et al., 2013). Toutes ces protéines (loritrine, involucrine, *late cornified envelope*, SPR et protéines S100, notamment la profilaggrine) font partie du complexe de différenciation épidermique (CDE) et sont codées par des gènes qui se trouvent tous sur le même chromosome humain 1q21 (Henry et al., 2012). (d) Les précurseurs lipidiques contenus dans les corps lamellaires et déversés à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée sont transformés en céramides, cholestérol et acides gras de manière efficace à pH acide (Fluhr et al., 2001) (Hachem et al., 2003). Les céramides se lient de manière covalente à l'enveloppe des cornéocytes et forment un réseau lipidique dense (Kypriotou et al., 2012).

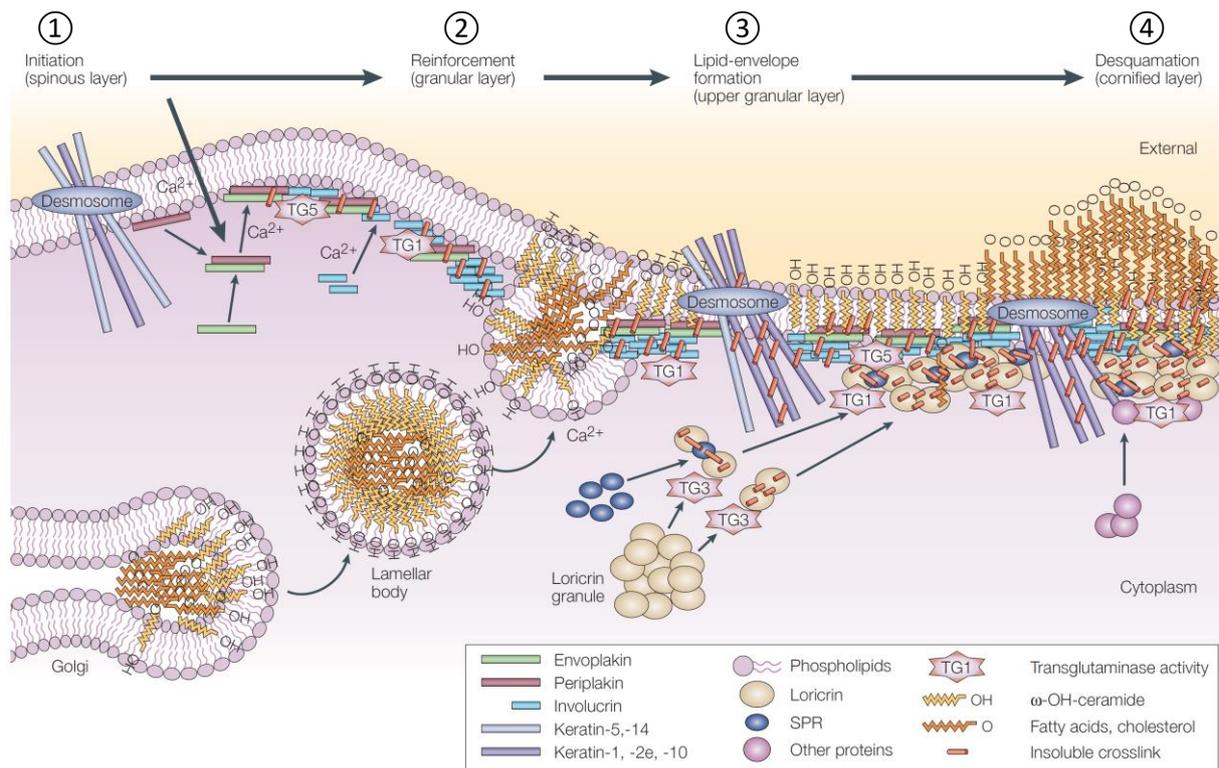


Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la formation d'une enveloppe cornée. ① Synthèse des protéines et lipides impliqués dans la formation de l'enveloppe. ② Sécrétion des lipides dans la matrice extracellulaire et agrégation de protéines d'enveloppe à la face interne de la membrane. ③ Attachement des lipides aux protéines de membranes déjà agrégées et agrégation de la loricine et des SPR au niveau des desmosomes. ④ Desquamation (Candi et al., 2005)

Lors du passage des couches vivantes à la couche cornée de l'épiderme, les desmosomes qui assurent les jonctions entre les kératinocytes adjacents sont modifiés et appelés cornéodesmosomes. Ces derniers expriment des protéines telles que les desmoglécine, desmocolline, envoplakine, périplakine, plakophiline et cornéodesmosine (Candi et al., 2005).

Finalement les cornéocytes les plus superficiels finissent par desquamer et sont remplacés par des cellules des couches sous-jacents en différenciation. Le processus de desquamation est finement régulé par un pH acide en surface de la peau. Des sérines protéases, majoritairement les kallikrines 5 et 7, sont relarguées par les corps d'Odland sous une forme immature. Dans les espaces intercellulaires, ces enzymes mûrissent et deviennent actives à pH acide. Elles ciblent alors les cornéodesmosomes en protéolysant les cornéodesmosines, les desmocollines et les desmoglécines. L'activité de ces protéases est régulée par un inhibiteur endogène appelé LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type related inhibitor 1*) qui interagit avec les kallikrines à pH neutre et régule ainsi la vitesse de desquamation des cornéocytes par rapport au renouvellement des cornéocytes (Eckhart et al., 2013).

1.3.3. Fonctions de barrière

L'épiderme est le tissu qui se trouve directement au contact de l'environnement extérieur. Dès lors, il doit faire face aux menaces physiques et chimiques et aux pathogènes. A l'inverse, il doit contenir les fluides internes tout en maintenant une bonne hydratation. Pour assurer son rôle de protection, l'épiderme peut être vu comme un ensemble de barrières complémentaires les unes aux autres. Les cornéocytes, entourés d'une matrice lipidique ainsi que les jonctions entre les cellules des couches vivantes constituent une **barrière physique**. Une **barrière immunitaire** est assurée par les cellules immunitaires, les peptides anti-microbiens et les cytokines relarguées par les différents types cellulaires. Finalement, le **microbiome** cutané joue également un rôle de barrière (Figure 5).

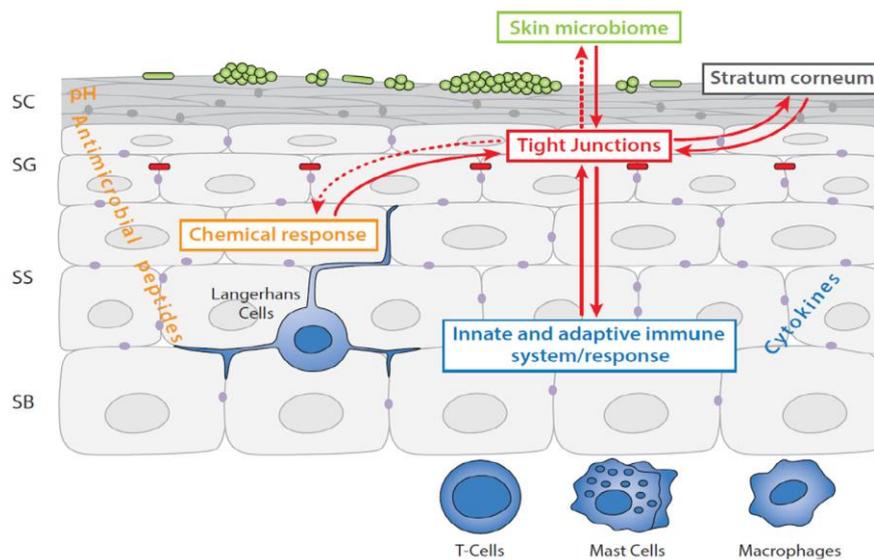


Figure 5 : Représentation des barrières de l'épiderme (Basler et al., 2016)

Barrières physiques

La toute première barrière physique est constituée par la couche cornée, elle-même composée d'un ensemble de cornéocytes reliés entre eux par des cornéodesmosomes et baignant dans une matrice lipidique hydrophobe. L'ensemble cornéocytes et matrice lipidique est communément comparé à un modèle de « briques et mortier » (Figure 6) (Michaels et al, 1975).

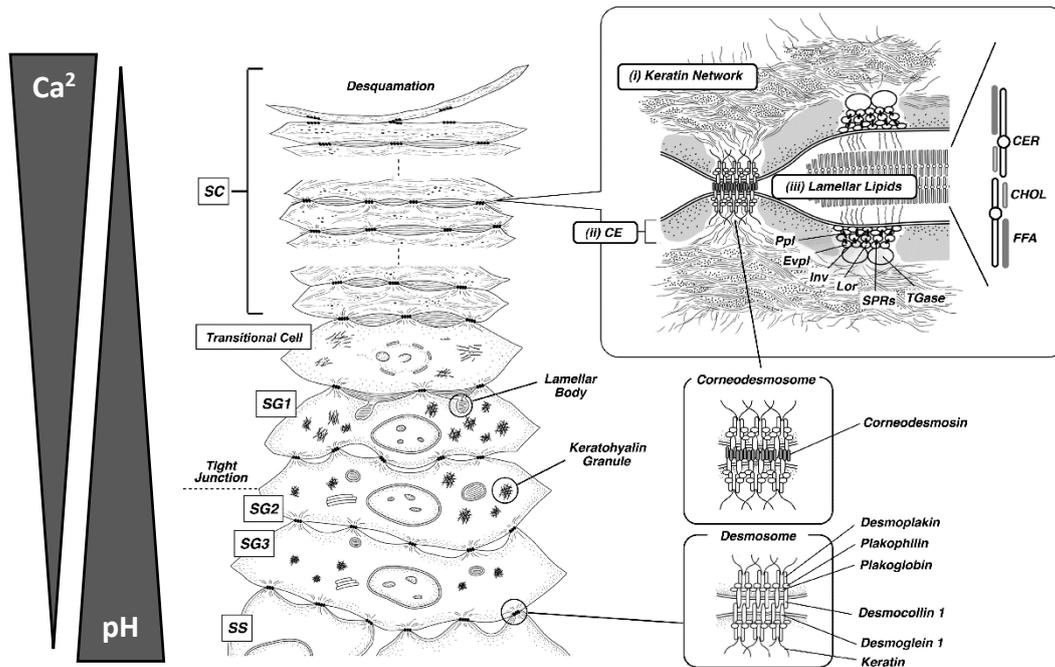


Figure 6 : Représentation de la couche cornée composée de cornéocytes dont le cytoplasme est rempli d'un réseau de kératine (I) et dont la membrane plasmique est épaissie par la formation d'une enveloppe cornée (II). Les cornéocytes sont reliés entre eux par des cornéodesmosomes et sont entourés par une matrice lipidique riche en céramides, cholestérols et acides gras libres (III) (adapté de Matsui et al., 2015)

Les filaments de kératine alignés et condensés par la filaggrine provoquent l'écrasement de la cellule sur elle-même, typique de la morphologie des **cornéocytes** (Proksch et al., 2008). Il est à noter que l'ensemble kératine et filaggrine représente 80 à 90% de la masse de l'épiderme (Baroni et al., 2012). Les cornéocytes sont liés entre eux par des cornéodesmosomes qui renforcent la capacité de résistance mécanique de la couche cornée (Proksch et al., 2008). En plus de cette matrice de kératine, l'enveloppe cornée confère aux cornéocytes des propriétés de résistance mécanique supplémentaires. L'enveloppe cornée est constituée de diverses protéines (loricine, involucrine, périplakine, envoplakine et SPR) liées entre elles, par l'intermédiaire des transglutaminases, par des ponts disulfures et des ponts isopeptidiques. Ces liens isopeptidiques sont résistants à la plupart des enzymes protéolytiques (Proksch et al., 2008).

Après avoir joué un rôle d'agrégation des filaments de kératine, la filaggrine est protéolysée dans les cornéocytes des couches supérieures provoquant la libération d'acides aminés libres entre autres, qui avec des sels, donnent place à des NMF (*Natural Moisturizing Factors*) essentiel à l'hydratation. Les NMF représentent 20 à 30% du poids sec de la couche cornée (Verdier-Sevrain et al., 2007). L'hydratation cutanée est un facteur important impliqué dans la résistance aux stress mécaniques et contribuant à la résilience du tissu (Fluhr et al., 2010). De plus, l'hydratation de la peau est essentielle

pour le processus de desquamation car elle influence l'activité d'enzymes telle que les sérines protéases (Verdier-Sevrain et al., 2007).

La **matrice lipidique** insoluble empêche la perte d'eau et l'entrée de substances solubles dans l'eau en fermant les espaces entre les cornéocytes (Baroni et al., 2012). Cette matrice est constituée de lipides libérés par les corps lamellaires de la couche granuleuse et qui s'alignent parallèlement aux cornéocytes auxquels ils se lient par des liaisons covalentes au niveau de l'enveloppe cornée. Entre l'exocytose des corps lamellaires dans la couche granuleuse et la mise en place d'une matrice dense dans la couche cornée, les lipides subissent une étape de maturation grâce aux enzymes libérées conjointement par les corps lamellaires. Ces enzymes (hydrolases acides) interviennent notamment dans la transformation des glycosphingolipides en céramides et des phospholipides en acides gras. Les céramides représentent à eux seuls 50% des lipides de la couche cornée et sont liés de manière covalente aux protéines d'enveloppe et majoritairement à l'involucrine (Proksch et al., 2008). Le cholestérol est un autre constituant majeur de la matrice et représente 25% de l'ensemble des lipides de la matrice (Proksch et al., 2008) (Matsui et al., 2015). Le rôle du cholestérol serait de fournir fluidité et flexibilité à la couche cornée (Baroni et al., 2012).

L'efficacité et l'intégrité de l'ensemble compacte « briques et mortier » est permise grâce à un pH cutané acide (4,1 à 5,8). L'acidification des couches supérieures de l'épiderme est dépendante de la génération d'acides gras libres et de l'acide urocanique (Hachem et al., 2003) et de la présence de transporteurs Na^+/H^+ se trouvant à la membrane plasmique des kératinocytes (Hachem et al., 2005). Cette acidité superficielle permet d'une part de prévenir les infections et d'autre part d'activer certaines enzymes impliquées dans le processus de desquamation (kallikréines) et nécessaires à la transformation des lipides extracellulaires (hydrolases acides) (Baroni et al., 2012) (Fluhr et al., 2001) (Proksch et al., 2018).

La deuxième ligne de défense physique de l'épiderme est constituée par les **jonctions serrées**. Ce type de jonction se trouvent au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme et sépare la face apicale des faces basolatérales des kératinocytes. Elles participent à la limitation de la perte hydrique et au contrôle des voies paracellulaires (Baroni et al., 2012) (Proksch et al., 2008). Il s'agit de jonctions transmembranaires composées de plusieurs types de protéines, nommées occludines (Ocln), claudines (Cldn 1, 4 et 7), zonula occludens (ZO), MUPP-1 (multi-PDZ protein-1) et JAM-1 (junctional adhesion molecule-1) qui sont liées aux filaments d'actine du cytosquelette des kératinocytes (Figure 7). Les jonctions serrées forment une barrière à double sens. En effet, elles constituent une barrière « inside-out » empêchant le passage d'ions des couches vivantes vers la couche cornée et inversement, une

barrière « outside-in » bloquant des molécules qui auraient réussi à passer la couche cornée (Basler et al., 2016) (Garcia et al., 2018).

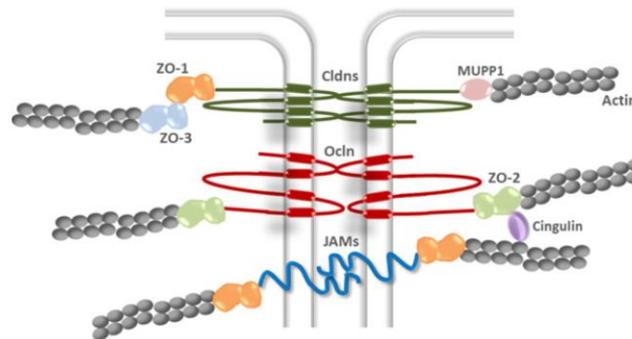


Figure 7 : Composition moléculaire des jonctions serrées (Adapté de Basler et al., 2016)

Barrières immunitaires

Pour soutenir les barrières physiques, l'épiderme est constitué d'une barrière immunitaire innée cellulaire et humorale (Basler et al., 2016).

Les **cellules immunitaires** telles que les cellules de Langerhans et les lymphocytes T interviennent dans les défenses (Basler et al., 2016). Les cellules de Langerhans sont les cellules sentinelles de l'épiderme. Elles sont capables d'étendre et rétracter leurs dendrites entre les kératinocytes pour surveiller leur environnement. Lorsqu'elles sont au contact d'un élément pathogène, elles peuvent le phagocyter et présenter des antigènes aux lymphocytes T et ainsi déclencher une réponse immunitaire locale. Elles peuvent également migrer jusqu'au ganglion lymphatique pour déclencher une réponse immunitaire à ce niveau (Chambers et al., 2020).

Parallèlement, les kératinocytes des différentes couches de la peau produisent des lipides et des **peptides antimicrobiens**. Plusieurs peptides antimicrobiens sont exprimés de manière constitutive comme les protéines S100, la RNase 7 et les bêta-défensines (2 et 3) (Brogden et al., 2012) (Harder et al., 2013). Lorsque les kératinocytes des couches vivantes de l'épiderme se retrouvent au contact d'éléments étrangers, ces derniers sont reconnus par les Toll-like récepteurs (TLR) et NOD-like récepteurs (NLR), des récepteurs du système immunitaire inné nommés aussi récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), ce qui initie une réponse des kératinocytes. Ceux-ci sécrètent alors massivement des peptides antimicrobiens constitutifs ainsi des nouveaux peptides tels que les cathélicidines (LL-37) (Harder et al., 2013) (Natsuga, 2014). Ces peptides antimicrobiens vont à leur tour induire la production de cytokines et chémokines par les kératinocytes et recruter les cellules immunitaires au site d'infection (Brogden et al., 2012) (Clausen et al., 2016).

En plus de ces peptides, certains lipides de la couche cornée possèdent une activité antimicrobienne comme les acides gras libres, la sphingosine et les glycosylcéramides (Fluhr et al., 2001) (Brogden et al., 2012).

Parallèlement à la libération des peptides antimicrobiens, la reconnaissance des éléments pathogènes par les TLR déclenche la libération de **cytokines** (Chambers et al., 2020). Notamment, les kératinocytes peuvent induire la libération de TSLP (Thymic stromal lymphopoietin), une cytokine clé dans l'inflammation de la peau, suite à une exposition à des allergènes ou une blessure (Gutowska-Owsiak et al., 2013).

Cytokines et barrière sont extrêmement liés dans des processus pathologiques. Dans la dermatite atopique (DA), maladie inflammatoire de la peau caractérisée par de la xérose, de la spongiose et de l'hypogranulose, les cytokines de type Th2 ont la capacité d'affecter la barrière de l'épiderme. De Vuyst et al (2016) a modélisé la pathologie comme un cercle vicieux (Figure 8). Lorsque les kératinocytes sont activés par des allergènes par exemple, ils sécrètent des cytokines et notamment du TSLP provoquant l'activation et la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions lymphatiques et induisant l'activation de lymphocytes T effecteurs Th2. Ces lymphocytes T vont à leur tour libérer des interleukines (IL-4, IL-5, IL-13) et du TNF α . Les IL-4 et IL-13 sont connus comme altérateurs de l'expression de protéines impliquées dans les fonctions de barrière telles que la filaggrine, l'involucrine, la desmogléine, les composants des jonctions serrées (claudine-1) et certains gènes responsables de la synthèse des céramides (voir review De Vuyst et al., 2017 pour plus de détails). L'affaiblissement de la barrière cutanée a pour conséquence une plus grande perméabilité aux pathogènes et allergènes provoquant une réaction en chaîne. Les IL-4 et IL-13 sont d'ailleurs utilisées *in vitro* sur épiderme humain reconstruits (RHE) pour mimer les caractéristiques phénotypiques de la DA. En effet, le traitement d'un épiderme avec les interleukines 4 et 13 induit simultanément spongiose, apoptose et expression de gènes typiques de la DA tels que NELL2 et CA2. De plus, les études de la fonction de barrière montrent que celle-ci est significativement altérée (De Vuyst et al., 2016) (Do Nascimento Pedrosa et al., 2017).

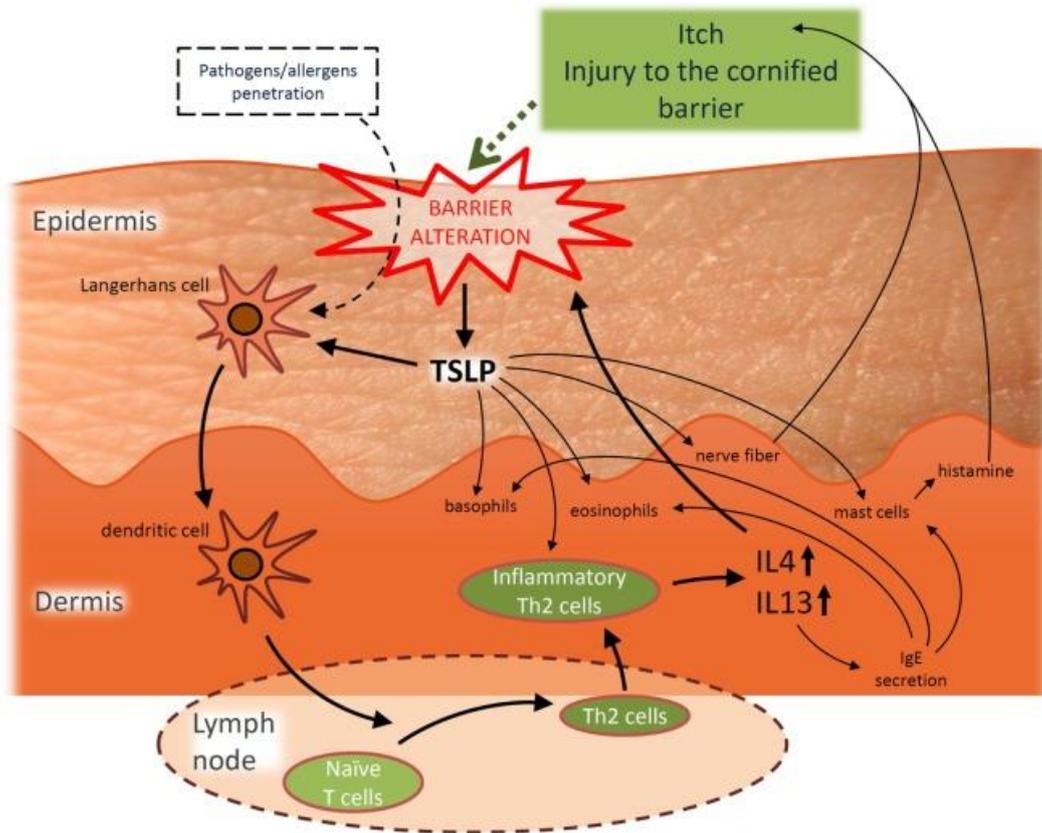


Figure 8 : Représentation schématique du développement et du maintien des mécanismes inflammatoires impliqués dans la dermatite atopique (De Vuyst et al., 2016)

Microbiome

La flore commensale apporte une défense immunitaire supplémentaire. On considère que la peau est colonisée par environ 1 million de bactérie par cm^2 (Byrd et al., 2018). La majorité des bactéries appartiennent aux familles *Corynebacterium*, *Propionibacterium* et *Staphylococcus*. Tous ces microorganismes non-pathogènes sont adaptés aux conditions d'humidité, de température, de pH et à la présence des peptides antimicrobiens présents à la surface de la peau (Balato et al., 2019). Ces acteurs du microbiome jouent plusieurs rôles. Tout d'abord, ils libèrent eux-mêmes des molécules antimicrobiennes et ont la capacité de bloquer la production de cytokines inflammatoires. Simultanément, leur présence-même provoque une certaine forme de compétition avec les éventuels pathogènes étrangers pour l'accès aux nutriments et à l'espace. Finalement, le microbiome renforce l'action des autres barrières de l'épiderme. En effet, certaines bactéries (*S. epidermidis*) sont capables d'activer les TLR des kératinocytes, notamment TLR2 qui augmente la formation des jonctions serrées et par conséquent la fonction de barrière (Perscott et al., 2017) (Balato et al., 2019). En effet, l'exposition d'épidermes à des éléments de paroi bactérienne tel que le peptidoglycan, ligand du TLR2,

induit une association accrue de la protéine kinase C ζ /I phospho-atypique avec l'occludine, renforçant les jonctions serrées (Yuki et al., 2011).

En plus des bactéries, on peut observer des virus et champignons en surface de la peau. Pour les champignons, on parle de « mycobiome ». Parmi les nombreux champignons résidents de la peau, l'espèce *Malassezia* est largement répandue. De par leur nature lipophile, ces levures sont majoritairement répandues dans des zones riches en sébum comme le cuir chevelu (Grice et Segre, 2011). Par rapport aux bactéries qui sont réparties de manière homogène à la surface de l'épiderme, les champignons sont davantage site-dépendants. Ainsi, une faible diversité de champignons colonise le dos et la tête, moyennement les bras et plusieurs espèces fongiques colonisent les pieds (White et al., 2014).

De nombreuses études s'intéressent à un autre type de champignons qui se développent éventuellement au niveau de la peau, les **dermatophytes**. Ces champignons appartiennent au groupe des champignons pathogènes et provoquent des infections des structures cutanées kératinisées (couche cornée, cheveux, ongles) nommées dermatophytoses. Les infections à dermatophytes représentent un véritable problème de santé publique qui touche 20 à 25% de la population (Havlickova et al., 2008) (Zhan et al., 2017). Les dermatophytes sont des champignons filamenteux qui se répandent notamment sur la couche cornée des épidermes et se nourrissent des structures kératinisées (Faway et al., 2018). En tant qu'espèce anthropophile, *Trichophyton rubrum* infecte uniquement les êtres humains et est responsable de 90% des dermatophytoses humaines (Nenoff et al., 2014). L'étude *in vitro* menée par Faway et al., 2017 a permis de mettre en évidence certains mécanismes et la cinétique d'infection au niveau d'épidermes humains par *T. rubrum* (Figure 9). Les champignons, sous forme d'arthroconidie (spores provenant de la segmentation d'hyphes fongiques) adhèrent à l'épiderme endéans 1h après le contact avec l'hôte. Après 4h, les arthroconidies germent et forment des hyphes segmentés. Il faut ensuite entre 1 et 3 jours supplémentaires pour que les hyphes progressent dans la couche cornée en passant par les espaces intercellulaires par dégradation des cornéodesmosomes et au travers des cornéocytes, de la matrice lipidique et des filaments de kératines agrégés. Au 4^{ème} jour post-infection, les hyphes atteignent les couches vivantes de l'épiderme et rompent les jonctions serrées situées au niveau de la couche granuleuse supérieure. Suite à la dégradation des barrières physiques, on observe notamment que les kératinocytes produisent et libèrent des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que des peptides anti-microbiens (Faway et al., 2018).

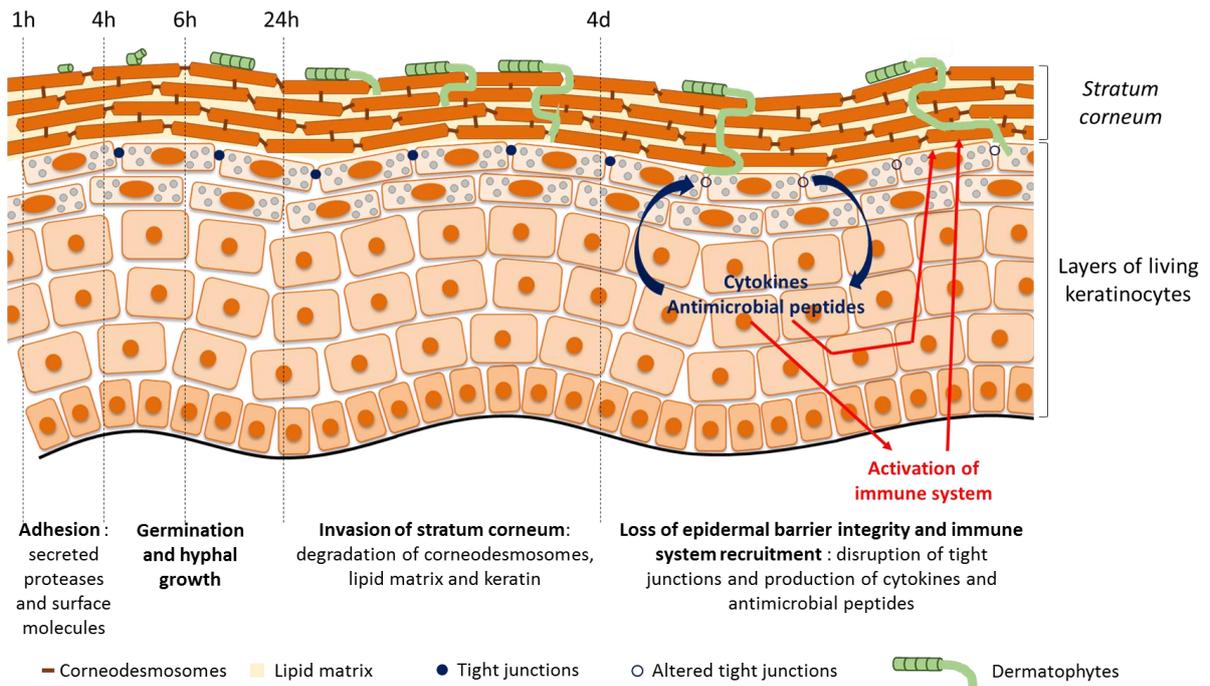


Figure 9 : Représentation schématique de la cinétique et des mécanismes impliqués dans l’infection d’épidermes humains par l’espèce dermatophyte *Trichophyton rubrum* (Faway et al., 2018)

1.3.4. La matrice extracellulaire épidermique

La matrice extracellulaire (MEC) représente une composante majeure du derme. C’est également le cas au niveau de la jonction épidermo-dermique où elle compose la lame basale de l’épiderme. Cependant, une MEC existe également au niveau de l’épiderme-même, bien qu’elle y soit discrète, vu la nature épithéliale de ce tissu (Figure 10). Cette MEC épidermique remplit les espaces intercellulaires de l’épiderme, essentiellement entre les kératinocytes des couches vivantes, mais également autour des mélanocytes, cellules de Merkel et cellules de Langerhans. En moyenne, ces espaces intercellulaires présentent une épaisseur de l’ordre de 15 à 20 nm.

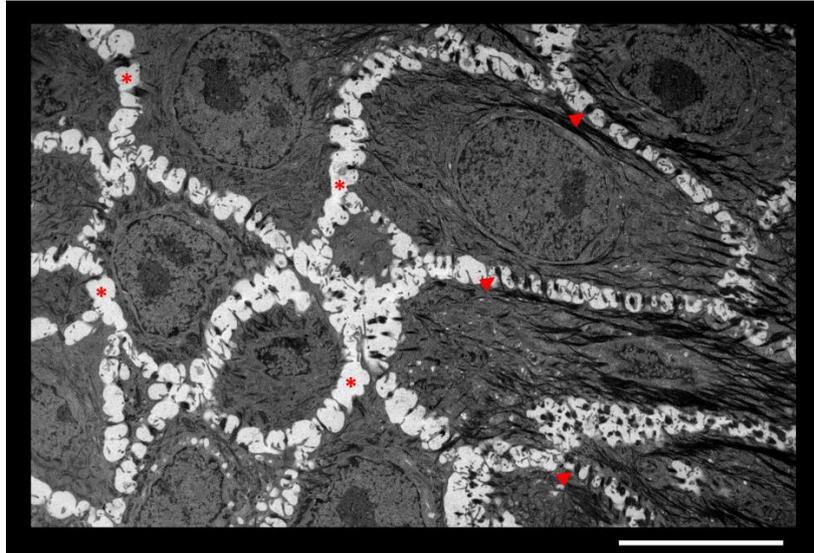


Figure 10 : Observation par microscopie électronique à transmission des espaces intercellulaires entre les kératinocytes de la couche granuleuse d'un RHE. Les kératinocytes adjacents sont séparés par la MEC (*) et attachés les uns aux autres par des desmosomes (têtes de flèche). Barre d'échelle = 10 μm

Jonction épidermo-dermique

La jonction épidermo-dermique (JED) joue un rôle pour assurer une fonction d'ancrage de l'épiderme sur le derme sous-jacent, une fonction de support mécanique face aux contraintes subies par l'épiderme et enfin, une fonction de barrière relative vis-à-vis de la plupart des cellules et des molécules de grande taille (Briggaman et Wheeler, 1975).

La JED est constituée par la collaboration des cellules de l'épiderme (les kératinocytes) et des cellules du derme (les fibroblastes). En effet, les kératinocytes fabriquent certaines protéines comme la laminine 332, les fibroblastes produisent d'autres molécules comme le nidogène 1 et 2 et les deux types cellulaires participent à la synthèse du perlécan et du collagène VII (Nystrom et al., 2019).

Les laminines sont des protéines composées de 3 polypeptides (α , β , γ) dont les associations donnent un nom aux différentes laminines. Les plus exprimées au niveau de la peau sont les laminines 332 (pour $\alpha 3\beta 3\gamma 2$), 311 et 511. Spécifique de la JED, la laminine 332 s'y trouve répartie de manière hétérogène. Elle interagit avec la laminine 311, avec le collagène XVII transmembranaire et avec les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$. Alors que le collagène XVII (précédemment appelé l'antigène de la pemphigoïde bulleuse de 180 kDa) est essentiel pour l'ancrage des kératinocytes à la lame basale, d'autres molécules de collagène sont également impliquées. Le collagène VII s'associe à la lame basale par affinité avec la laminine 332 et avec le collagène IV. Les fibres de collagène IV s'associent entre elles pour former un réseau dense et fort (Figure 11) (Nystrom et al., 2019) (Kleiser et Nystrom, 2020).

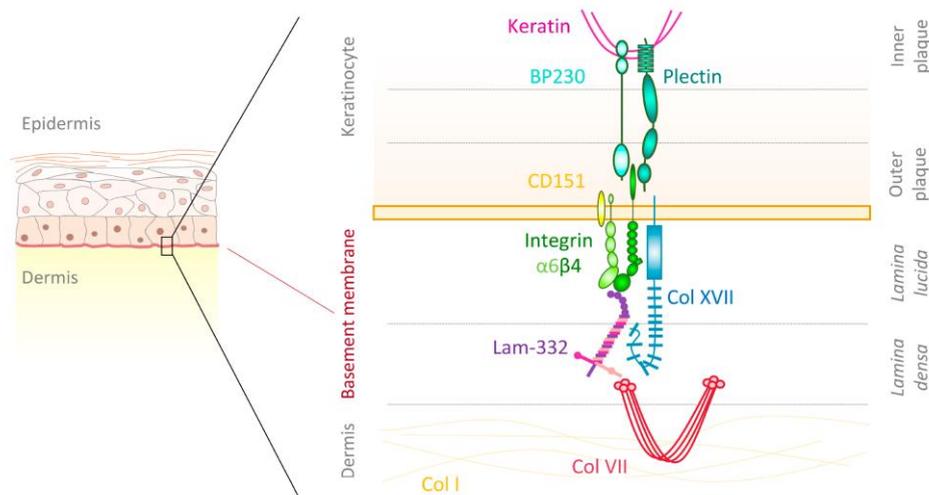


Figure 11 : Représentation schématique de l'association des molécules de laminine, intégrine et collagène impliquées dans la formation de la jonction épidermo-dermique (Kleiser et Nystrom, 2020).

La matrice est également renforcée et stabilisée par des protéoglycans, comme le perlécan (Figure 12), et par le nidogène qui possèdent tous deux une forte affinité pour les laminines et le réseau de collagène IV (Nystrom et al., 2019).

Matrice extracellulaire des couches vivantes de l'épiderme

Les espaces entre les kératinocytes des couches vivantes de l'épiderme sont de petite taille, suffisamment faible pour rendre difficile leur observation en microscopie optique. C'est notamment grâce à une coloration au bleu Alcian que la composition riche en saccharides de la MEC a été révélée (Montagna et al., 1951). La matrice épidermique est largement constituée de macromolécules glucidiques appelées glycosaminoglycans (GAG). De manière générale, il existe cinq types principaux de GAG : l'héparan sulfate, la chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate, le kératan sulfate et l'hyaluronan (Sandjeu et Haftek, 2009). Les GAG sont des polymères non ramifiés composés d'unités disaccharidiques répétées, elles-mêmes constituées par l'assemblage d'une hexosamine et d'un acide uronique. Les GAG sulfatés sont liés de manière covalente avec des résidus sérine de certaines protéines (*core-protein*), alors que les GAG non-sulfatés ne forment que des liaisons non-covalentes avec des protéines. L'association des GAG sulfatés avec des protéines donne naissance aux protéoglycans qui peuvent être membranaires ou sécrétés.

La matrice épidermique est formée de plusieurs protéoglycans, lesquels portent des noms différents en fonction du nombre et du type de GAG dont ils sont composés. En 1987, Tammi et al ont mis en évidence plusieurs GAG sulfatés. La majorité de ces GAG sont représentés par l'héparan sulfate

(environ 60%) et 20% d'entre eux sont des chondroïtines sulfates. En 1988, l'équipe de Tammi a mis en évidence l'hyaluronan (HA) dans la matrice de l'épiderme, le seul GAG non-sulfaté.

Plusieurs GAG et protéoglycans se trouvent dans la matrice épidermique (Figure 12). Les glypicans, composés d'héparan sulfate, sont accrochés à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl inositol) au niveau des kératinocytes de la couche basale. Ils pourraient participer au développement de l'épiderme (Sandjeu et Haftek, 2009). Comme les glypicans, les syndécans (1 à 4) sont composés d'héparan sulfates et ancrés à la membrane plasmique des couches basales et épineuses (Malgouries et al., 2008) (Sandjeu et Haftek, 2009). Le versican, lié à la chondroïtine sulfate est sécrété dans la MEC des couches les plus basales de l'épiderme. Finalement, l'HA est observé plutôt concentré dans les espaces intercellulaires de l'épiderme où il peut interagir avec des protéoglycans comme le versican (Sandjeu et Haftek, 2009) (Wight, 2017). L'ensemble de ces molécules crée un environnement péricellulaire essentiellement aqueux, favorable à la diffusion des nutriments, des facteurs de croissance et des cytokines (Sandjeu et Haftek, 2009) (Toole, 2001), mais aussi capable d'héberger des terminaisons nerveuses libres et d'offrir un espace pour la migration de cellules immunitaires.

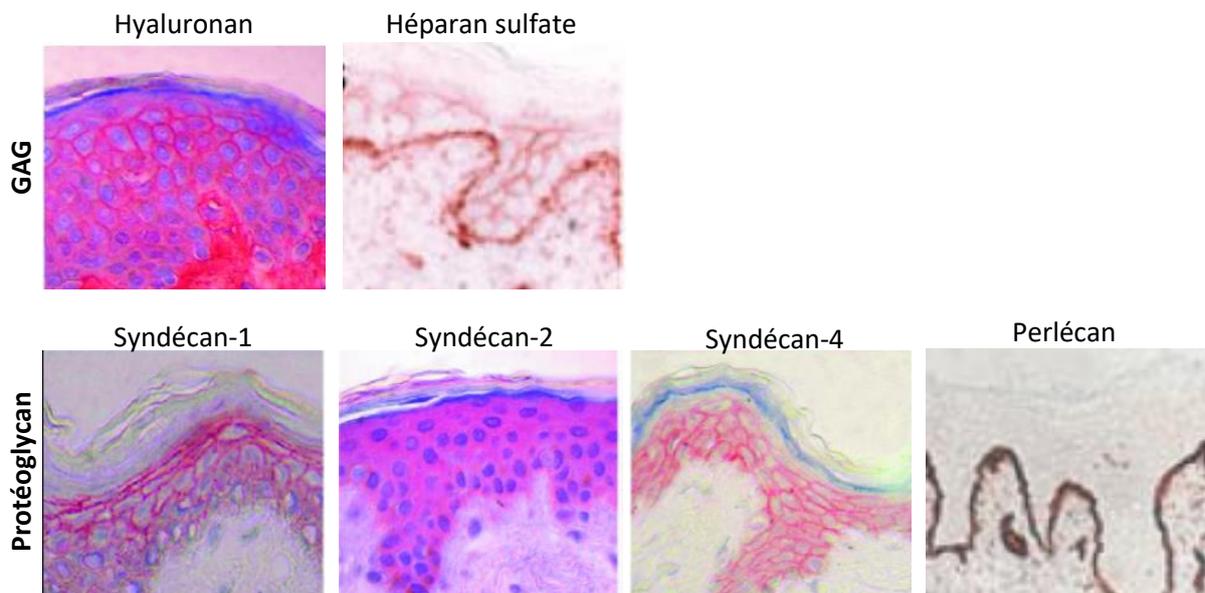


Figure 12 : Détection de GAG (hyaluronan et héparan sulfate) et de protéoglycans (syndécans 1, 2 et 4 et perlécane) dans la matrice de l'épiderme. La distribution de l'hyaluronan (rose), des syndécans (1-4) (rose) et de l'héparan sulfate (brun) apparaît péricellulaire alors que le perlécane (brun) apparaît localisé au niveau de la lame basale (Adapté de Malgouries et al., 2008 et Sandjeu et Haftek, 2009)

2. L'hyaluronan

2.1. Généralités

Découvert en 1934 par Karl Meyer, l'hyaluronan, nommé aussi acide hyaluronique (HA), est présent chez tous les vertébrés (Meyer et Palmer, 1934). On estime que l'HA représente 15 grammes pour un corps humain de 70 kg (Laurent et Fraser, 1992). L'HA appartient à la famille des glycosaminoglycans présents dans la matrice extra- et péri-cellulaire. Contrairement à la plupart des GAG, il n'est jamais sulfaté et est libre dans la MEC puisqu'il ne se trouve lié de façon covalente à aucune autre molécule de la MEC.

2.1.1. Structure

L'HA est composé d'unités disaccharidiques répétées : l'acide D-glucuronique (GlcUA) et le D-N-acétylglucosamine (GlcNAc). Ces saccharides sont liés entre eux par des liaisons β -1.3 et β -1.4 de sorte de former un long polymère $[\beta(1.4)\text{-GlcUA-}\beta(1.3)\text{-GlcNAc-}]_n$ (Figure 13) (Sakai et al., 2000). Contrairement aux autres GAG, la synthèse de l'HA n'a pas lieu dans l'appareil de Golgi mais à la face interne de la membrane plasmique des cellules (Weigel et al., 1997). Cette localisation transmembranaire des enzymes de synthèse permet de générer et d'extruder simultanément les polymères dans la matrice extracellulaire. Ce mécanisme permet la synthèse de molécules de haut poids moléculaire allant de 10^5 à 10^7 daltons et d'une longueur totale pouvant varier de 2 à 25 μm (Toole, 2004). Les polymères générés sont simples et linéaires (polymère non-ramifiés), ce qui confère à l'HA des capacités de liaisons faibles avec d'autres molécules matricielles (Fraser et al., 1997). Les molécules de liaison de l'HA sont communément appelées hyaladhérines. Certaines d'entre elles sont membranaires comme CD44 et RHAMM, les récepteurs de l'HA alors que d'autres hyaladhérines sont sécrétées dans la MEC. Notamment, la protéine TSG-6 qui intervient dans la réticulation de l'HA et sera étudiée en détails au point 3. Certains protéoglycans (aggrécan, versican) possèdent également la capacité de lier l'HA de façon non-covalente via leur domaine N-terminal (Toole, 2001) (Iozzo et al., 2015). L'association de l'HA avec ces autres macromolécules donne naissance à un réseau moléculaire complexe, capable d'une forte rétention d'eau et conférant à cette MEC ses propriétés viscoélastiques qui génèrent sa résilience mécanique (Laurent et Fraser, 1992) (Toole, 2004).

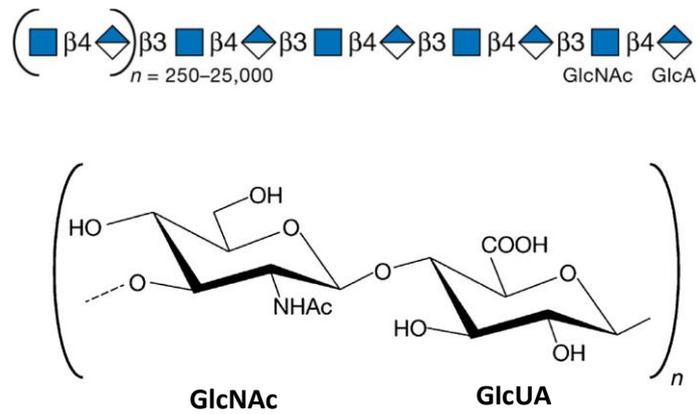


Figure 13 : Représentation d'un disaccharide d'hyaluronan au sein du polymère (Muto et al., 2019)

2.1.2. Fonctions générales de l'hyaluronan

Malgré sa structure simple, l'HA possède un nombre élevé de fonctions diverses :

Structuration de la MEC et hydratation : De par son association avec des protéoglycans et des protéines matricielles, l'HA contribue à la formation d'un réseau complexe composé de protéines et de sucres. En présence de fibres de collagène, la matrice se complexifie et forme un complexe supramoléculaire (Lee et Spicer, 2000). De plus, l'HA est une molécule chargée négativement et possède une grande affinité pour les molécules d'eau. A lui seul, l'HA peut retenir de grande quantité d'eau (jusqu'à 70% de son poids) conférant aux tissus qu'il occupe une forte capacité de déformation et de résilience (Nusgens et al., 2010). Dans les cartilages plus particulièrement, l'HA permet la lubrification des articulations (liquide synovial) et participe à l'amortissement des chocs.

Embryogenèse : L'HA est impliqué dès le développement des structures précoces des individus. En effet, il apparait présent au niveau des cellules cardiaques, des cellules de la crête neurale et des cellules impliquées dans la formation du squelette embryonnaire. Il a été montré qu'une déficience de la synthèse de l'HA lors de l'embryogenèse, dépendante de l'HA synthase 2 (HAS2), était létale (Camenisch et al., 2000). En effet, l'absence d'HA au niveau de la gelée cardiaque empêche la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses capables de migration (Markwald et al., 1978) (Zoltan-Jones et al., 2003). D'autre part, l'HA (synthétisé par la HAS2) induit la prolifération des cellules mésenchymateuses impliquées dans la morphogenèse du squelette (Vabres et al., 2010).

Signalisation intracellulaire : Les liaisons de l'hyaluronan à ses récepteurs membranaires CD44 et RHAMM entre autres activent des voies de signalisation qui induisent diverses réponses capables de modifier les fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration

(Bourguignon et al., 2014). En tant que hyaladhérines, ces récepteurs seront décrits au point 2.5. De manière intéressante, la taille du polymère d'HA interagissant avec un de ses récepteurs détermine le type de réponse cellulaire. Alors que les polymères de bas poids moléculaires favorisent la division, la prolifération, la migration, les fragments de haut poids moléculaires sont plutôt inhibiteurs de ces voies (Pure et Assoian, 2009) (Bourguignon et al., 2014).

Un même type de polymère peut montrer un effet favorable ou défavorable en fonction du contexte. Par exemple, les fragments de bas poids moléculaires favorisent la néovascularisation par activation de la prolifération des cellules endothéliales. Ce processus apparaît propice à l'organisme lors de l'embryogenèse ou lors de la réparation tissulaire (Deed et al., 1997), cependant ces mêmes fragments d'HA montrent aussi une capacité à promouvoir la néovascularisation, la prolifération et la migration de cellules tumorales malignes (Rooney et al., 1995), ce qui est délétère pour l'organisme concerné.

Inflammation et immunité : Dans un contexte inflammatoire, l'HA participe au recrutement des cellules immunitaires au site enflammé. De manière générale, les chémokines libérées en conditions inflammatoires augmentent l'expression des sélectines qui ralentissent les leucocytes circulants et des intégrines qui augmentent l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, ce qui facilite la migration des cellules immunitaires à travers la paroi endothéliale. Cette diapédèse est facilitée par l'HA. En effet, les polymères d'HA liés à leur récepteur CD44 en surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales offrent des sites d'amarrage pour les récepteurs CD44 exprimés par les leucocytes circulants, créant des interactions CD44-HA-CD44. Il a d'ailleurs été montré que l'absence de CD44 retarde l'infiltration des cellules immunitaires (Johnson et al., 2000).

De plus, un contexte inflammatoire génère des radicaux libres (anion superoxyde, H_2O_2 , OH^-) dans les tissus concernés, ce qui induit le clivage des polymères d'HA. Les polymères d'HA de bas poids moléculaire (< 250 kDa) sont pro-inflammatoires. En effet, ces petits fragments d'HA peuvent lier les TLR et démarrer une réponse immunitaire innée en stimulant la production de cytokines telles que l'IL- 1β et le TNF- α (Stern et al., 2006).

2.1.3. Localisation

D'abord mis en évidence dans la substance fondamentale de l'humeur vitrée de l'œil (Meyer et Palmer, 1934), l'HA est présent dans de nombreux tissus et organes adultes. La distribution de l'HA a été étudiée de manière détaillée et approfondie chez le rat et c'est sur cette base que la répartition de l'HA humain a été estimée (Tableau 1). Une certaine quantité d'HA se trouve dans les organes internes tels que les reins, les poumons, les intestins, le cerveau ou encore l'estomac, mais il est aussi localisé dans les muscles, les os et les tissus conjonctifs de soutien en général. Une concentration élevée est observée dans la gelée de Wharton du cordon ombilical, mais aussi dans les matrices cartilagineuses.

Pour l'ensemble de l'organisme, 50% de l'HA total se trouve dans la peau (Fraser et al., 1997) (Nusgens et al., 2010). La majorité de cet HA se localise bien évidemment dans le derme, mais une quantité non-négligeable occupe les espaces intercellulaires des couches vivantes de l'épiderme, c'est-à-dire principalement entre les kératinocytes de la couche basale, de la couche épineuse et partiellement de la couche granuleuse (Tammi et al., 1988). Toutefois, une fraction minimale de fragments d'HA (détectés sous forme de di- ou de tétra-saccharides) est par ailleurs localisée dans le compartiment intracellulaire des cornéocytes (Sakai et al., 2000).

	Weight (g)	Total HYA (mg)	HYA (%)
Whole rat	201	60.5	100
Skin	40.2	33.8	56
Muscles	35.7	4.69	8
Skeleton and supporting tissues	57.6	16.2	27
Intestines and stomach	15.8	0.50	1
Remaining internal organs	43.4	5.25	9

Tableau 1 : Répartition de l'hyaluronan (HYA) dans divers tissus et organes chez le rat, exprimé en pourcent (Fraser et al., 1997)

2.2. Synthèse

Comme précédemment mentionné, l'HA est synthétisé par des enzymes localisées à la face interne de la membrane plasmique des cellules. Ces enzymes, portant le nom de HA synthases (HAS), sont des glycosyltransférases qui transfèrent séquentiellement de l'uridine diphosphate (UDP)- N-acétyl-D-glucosamine (GlcAc) et de l'UDP- D-glucuronate (GlcUA) au niveau de l'extrémité réductrice du polymère en synthèse (Figure 14). L'ajout successif des monosaccharides s'accompagne de la sortie des polymères d'HA directement dans la MEC (Weigel et al., 1997).

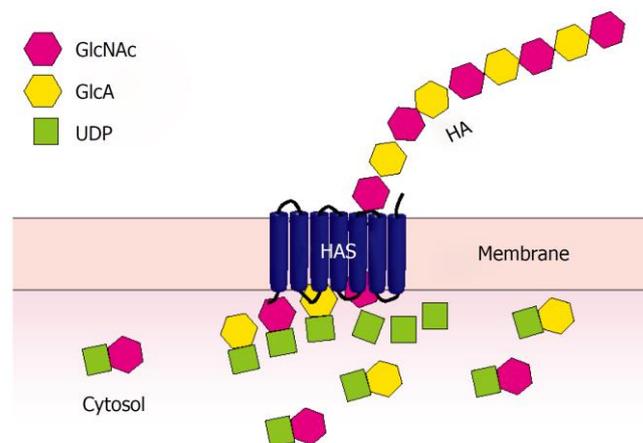


Figure 14 : Synthèse d'un polymère d'HA directement dans la MEC par ajout successif de GlcNAc et de GlcUA via une enzyme transmembranaire d'HA synthase (Triggs-Raine et al., 2015)

Les substrats des HAS, l'UDP-GlcNAc et l'UDP-GlcUA, sont produits à partir d'intermédiaires rendus disponibles par le métabolisme du glucose (Figure 15) (Weigel et DeAngelis, 2007).

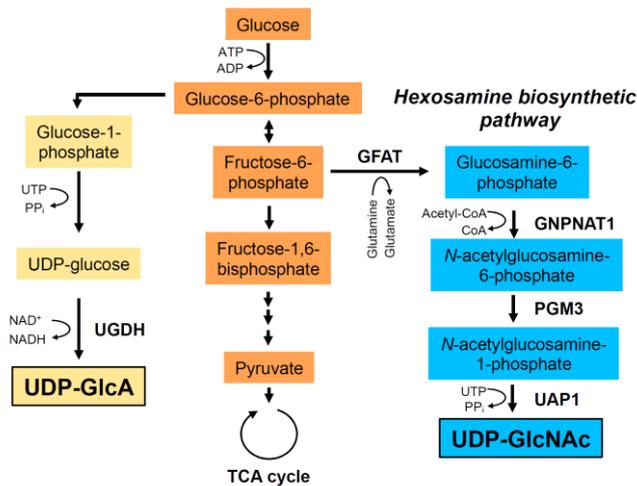


Figure 15 : Voie de synthèse des substrats UDP-GlcUA et UDP-GlcNAc à partir du glucose. UGDH : UDP-glucose déshydrogénase, GFAT : fructose-6-phosphate amidotransférase, GNPAT1 : glucosamine-phosphate N-acétyltransférase 1, PGM3 : phosphoglucomutase 3, UAP1 : UDP-GlcNAc pyrophosphorylase (Kobayashi et al., 2020)

Chez les mammifères, trois isoenzymes correspondant aux hyaluronan synthases ont été identifiées : HAS1, HAS2 et HAS3. Bien que codées par des gènes se trouvant sur des chromosomes différents (19q13.3 pour HAS1, 8q24.12 pour HAS2 et 16q22.1 pour HAS3 chez l'homme), ces enzymes sont très proches en termes de séquence d'acides aminés et de structure secondaire et tertiaire car elles partagent 55 à 70% d'identité (Spicer et al., 1998). Elles sont composées d'une région N-terminale, d'une région C-terminale et d'une région transmembranaire centrale présentant une similarité de 75 à 87 % (Itano et al., 1999). Les trois enzymes sont composées de sept domaines transmembranaires (Weigel et al., 1997) et possèdent des domaines de liaison distincts pour leurs deux substrats (Weigel et DeAngelis, 2007). Bien que structurellement similaires, les trois HAS sont caractérisées par une expression temporelle, une taille de polymère d'HA générés et une activité enzymatique très différents (Itano et al., 1999). L'activité des HAS dépend partiellement de la concentration du substrat UDP-GlcNAc disponible dans les cellules. Alors que la V_{max} ne montre pas de différence significative entre les trois enzymes, le K_m de la HAS1 est plus élevé que celui des HAS2 et 3, ce qui signifie que la HAS1 a une affinité plus faible pour son substrat que les deux autres enzymes (Itano et al., 1999). Par conséquent, la HAS1 nécessite une plus grande concentration en UDP-GlcNAc et en UDP-GlcUA pour former des polymères d'HA que les HAS2 et HAS3 (Rilla et al., 2013).

La **HAS1** est exprimée durant les phases précoces du développement embryonnaire (gastrulation et neurulation) (Spicer et al., 2003). Cette synthase produit des fragments de haut poids moléculaires ($2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ Da) (Itano et al., 1999). Au niveau de l'épiderme, il a été montré que cette enzyme était la plus exprimée durant la différenciation des kératinocytes (Malaisse et al., 2014).

La **HAS2** est essentielle durant le développement des individus et l'embryogénèse (Camenisch et al., 2000). Alors qu'elle apparaît très peu exprimée chez l'adulte, une surexpression de celle-ci provoque des modifications cutanées. Notamment, une surexpression de la HAS2 induit l'augmentation de la quantité et de l'épaisseur de la peau, ce qui est précisément le cas pour les chiens de la race Sharpei (Figure 16a) (Zanna et al., 2009). De façon intéressante, le rat-taupe nu présente quant à lui une HAS2 mutée provoquant une synthèse accrue d'HA de haut poids moléculaire (Figure 16b) (Tian et al., 2013). A l'inverse, chez les personnes âgées, la diminution d'épaisseur de la peau est accompagnée d'une expression amoindrie de la HAS2 (Terawaza et al., 2015). Cette enzyme génère des polymères d'HA de poids moléculaires inférieurs à ceux générés par la HAS1.

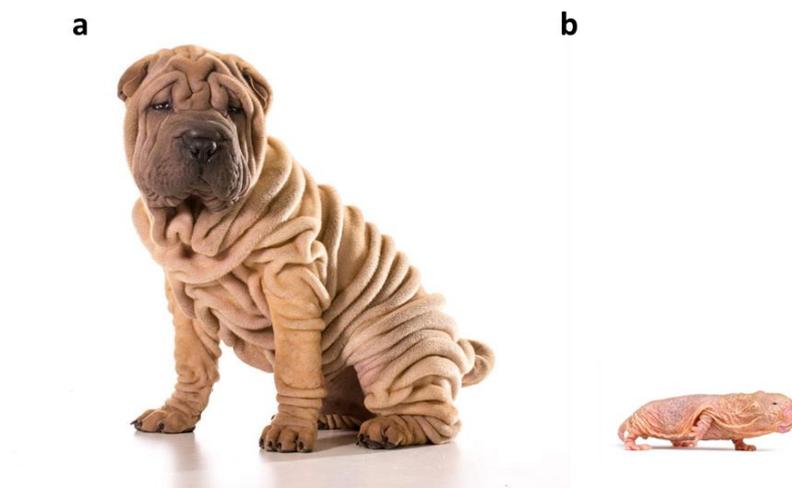


Figure 16 : Photos d'un (a) chien de race Sharpei (<https://www.omlet.fr/breeds/chiens/sharpei/>) et (b) rat-taupe nu (Shutterstock.com 1976046895).

La **HAS3** fabrique des polymères de bas poids moléculaires ($10^5 - 10^6$ Da) (Itano et al., 1999). Cette enzyme est majoritairement exprimée au cours de processus inflammatoires en général (Tavianatou et al., 2019), notamment au niveau de cellules de peaux enflammées (Barnes et al., 2012). Alors qu'en 2008, il avait été publié que la HAS3 était abondamment exprimée dans des kératinocytes sains (Kakizaki et al., 2008), Malaisse et al (2014) ont mis en évidence que la HAS3 est davantage surexprimée au niveau de peaux lésionnelles de dermatite atopique, tandis que la HAS1 est surtout exprimée par les kératinocytes présents dans un épiderme sain.

L'activité des HAS peut être modifiée par des facteurs de croissance et des cytokines comme le KGF (keratinocyte growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le TNF- α , le TGF- β et les BMP (bone morphogenetic protein) ainsi que l'UTP extracellulaire (Stern et al., 2006) (Pienimaki et al., 2001) (Jokela et al., 2017). Des modifications post-traductionnelles des enzymes peuvent également modifier leur activité (Tammi et al., 2011). La phosphorylation (Bourguignon et al., 2007) (Kasai et al., 2020) et la O-GlcNAcylation (Moretto et al., 2015) des HAS peuvent provoquer une augmentation de leur activité, cependant le lien entre les modifications post-traductionnelles et les modifications d'activités n'est pas encore connu. Finalement la mono-ubiquitination de la HAS2 pourrait être impliquée dans son activité enzymatique (Karousou et al., 2010).

2.3. Dégradation

Les polymères d'HA sont caractérisés par une vitesse de renouvellement élevée rendue possible grâce à l'activité d'enzymes de dégradation. De manière générale, il est estimé qu'un tiers de l'HA corporel total est remplacé chaque jour. En effet, le temps de demi-vie des molécules d'HA est relativement court, pouvant aller de 2-3 semaines dans le cartilage à seulement quelques minutes dans le compartiment sanguin. Dans l'épiderme, la vitesse de renouvellement de l'HA est de 1 à 2 jours (Fraser et al., 1997) (Stern, 2003).

La dégradation des polymères d'HA est assurée à différents niveaux. En contexte normal, le réseau lymphatique assure 85% de la dégradation et la circulation sanguine achemine les fragments d'HA vers le foie et les reins (Triggs-Raine et al., 2015). En contexte inflammatoire, la présence de radicaux libres s'ajoute pour participer à la dégradation de l'HA (Stern et al., 2006). Les principales enzymes responsables de la dégradation de l'HA sont des endoglycosidases et des exoglycosidases. Les hyaluronidases (HYAL) font partie de la famille des endoglycosidases et clivent spécifiquement la liaison $\beta(1.4)$ des polymères (Figure 17). Les oligosaccharides résiduels sont alors hydrolysés par les exoglycosidases β -D-glucuronidases et β -N-acétyl-D-hexosaminidases (Linker et al., 1955).

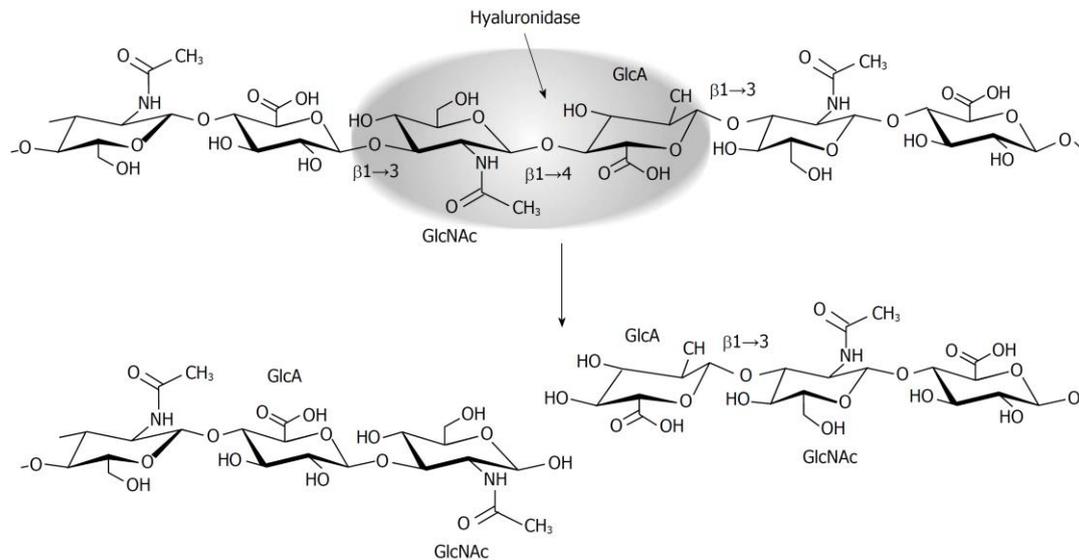


Figure 17 : Dégradation des polymères d'HA par l'action d'une hyaluronidase qui clive la liaison β -1.4 (Triggs-Raine et al., 2015)

Chez l'humain, six gènes codants pour des hyaluronidases ont été identifiés. Ces gènes présentent 40% d'homologie les uns aux autres mais diffèrent en termes d'expression et de localisation des protéines. Les gènes codants pour les HYAL1, 2 et 3 sont tous trois localisés sur le chromosome 3 alors que les gènes exprimant HYAL4, PHYAL1 et SPAM1 se trouvent sur le chromosome 7 (Csoka et al., 2001).

La **hyaluronidase 1** est responsable du clivage des polysaccharides en di- ou tétra-saccharides. Elle est fortement exprimée dans des organes tels que le cœur, le foie, la rate et les reins, et est également présente dans le sang et les urines (Csoka et al., 2001). En termes de localisation subcellulaire, il a été montré que HYAL1 est présente sous une forme précurseur dans les endosomes (environ 57 kDa) et une forme mature (environ 45 kDa) dans les lysosomes, notamment dans les macrophages (Puissant et al., 2014) et dans le foie (Boonen et al., 2014). Un pH acide (environ 3.7) est nécessaire à la maturation protéolytique et l'activité de dégradation de HYAL1. Une déficience en HYAL1 se traduit par la mucopolysaccharidose de type IX associée à des problèmes articulaires (Triggs-Raine et al., 1999) (Imundo et al., 2011). Les souris *Hyal1^{-/-}* présentent une accumulation d'HA dans les tissus périphériques et dans le sérum qui semble ne pas produire de conséquence au niveau hépatique (Bourguignon et al., 2016). Au niveau rénal, l'enzyme Hyal1 est responsable du clivage de l'HA intracellulaire, alors que l'enzyme Hyal2 est responsable de la digestion de l'HA extracellulaire, mais aucune des deux enzymes ne semble impliquée dans la fonction du rein en tant que tel. Néanmoins, une déficience en Hyal1 ou en Hyal2 provoque une accumulation d'HA dans les cellules rénales qui aggrave la réponse inflammatoire dans le cas d'une ischémie-reperfusion (Colombaro et al., 2015a et 2015b). Finalement, il a été montré que l'enzyme Hyal1, en dégradant l'HA du glycocalyx endothélial

provoque des dysfonctions de l'endothélium et participe à la pathogenèse du diabète (Dogné et al., 2016 et 2018).

La **hyaluronidase 2** est structurellement similaire à la HYAL1 mais présente une activité et une localisation différente. En effet, la protéine HYAL2 est ancrée à la membrane plasmique des cellules par une ancre GPI et fragmente l'HA en oligosaccharides de 20kDa (Harada et Takahashi, 2007) (Girish et Kemparaju, 2007). Cette enzyme apparait essentielle lors de l'embryogenèse car son absence provoque des problèmes de développement cardiaque et du squelette (Chowdhury et al., 2013). Les souris adultes *Hyal2^{-/-}* présentent également des défauts congénitaux dans la formation des os frontonasaux et vertébraux, faisant penser à un nouveau type de mucopolysaccharidose IX (Jadin et al., 2008). En absence de Hyal2, une grande quantité d'HA de haut poids moléculaire se retrouve dans la lymphe et le sang. Dans ce cas, la taille des polymères d'HA altère leur endocytose et dès lors la dégradation d'HA dans le foie (Jadin et al., 2008) (Bourguignon et al., 2016). De plus, les souris *Hyal2^{-/-}* présentent une microangiopathie thrombotique chronique avec anémie hémolytique (Onclinx et al., 2015). L'expression de Hyal2 par les plaquettes sanguines est nécessaire à la régulation de l'extravasation des leucocytes dans les premiers stades de la colite (Petrey et al., 2019).

La **hyaluronidase 3** est essentiellement détectée dans les testicules et la moelle osseuse, suggérant qu'elle soit impliquée dans la régulation des cellules souches étant donné que ces tissus conservent des cellules souches durant toute la vie de l'organisme. Cependant aucune activité enzymatique n'a encore été associée à la HYAL3 (Csoka et al., 2001).

La **hyaluronidase 4** est exprimée dans le placenta et au niveau du muscle squelettique. Bien que nommée « hyaluronidase », la HYAL4 ne dégrade pas l'HA et est en fait une chondroïtinase (Csoka et al., 2001).

PHYAL1 est un pseudogène non fonctionnel chez l'Homme. En effet, suite à deux délétions dans le gène, un codon stop prématuré rend le gène non codant. Cependant, chez la souris, ce gène est intact, fonctionnel et actif (Csoka et al., 2001).

SPAM1, également appelé PH-20, est une hyaluronidase testiculaire impliquée dans la fécondation. Cette enzyme se localise spécifiquement au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes et permet la dégradation de l'HA qui constitue la matrice extracellulaire et la zone pellucide de l'ovocyte (Girish et Kemparaju, 2007).

Parmi ces 6 enzymes, seules HYAL1, HYAL2 et SPAM1 présentent une réelle activité de dégradation de l'acide hyaluronique. Alors que SPAM1 possède une activité restreinte aux spermatozoïdes, HYAL1 et HYAL2 sont présentes et actives dans divers tissus et notamment au niveau de l'épiderme. Un modèle

de dégradation de l'HA basé sur la coopération de ces deux enzymes a été proposé au début des années 2000 (Figure 18) (Tammi et al., 2001) (Stern, 2003) : Les polymères d'HA constituent la MEC entourant les cellules où l'HA péri-cellulaire se lie à son récepteur membranaire CD44. L'enzyme HYAL2 se trouve également ancrée à la membrane des cellules, à proximité des chaînes d'HA physiquement rapprochées par leur interaction avec CD44. L'enzyme HYAL2 dégrade les polymères d'HA en oligosaccharides de 20kDa environ qui sont simultanément internalisés dans des endosomes. Ces endosomes, contenant les fragments d'HA fusionnent avec des lysosomes où se localise HYAL1. L'acidité des endolysosomes permet la maturation protéolytique de HYAL1 et la rend plus active ce qui permet la digestion de l'HA en di- ou tétra-saccharides. Les fragments résiduels d'HA sont alors pris en charge par les exoglycosidases β -D-glucuronidases et β -N-acétyl-D-hexosaminidases afin de générer les deux sucres de base.

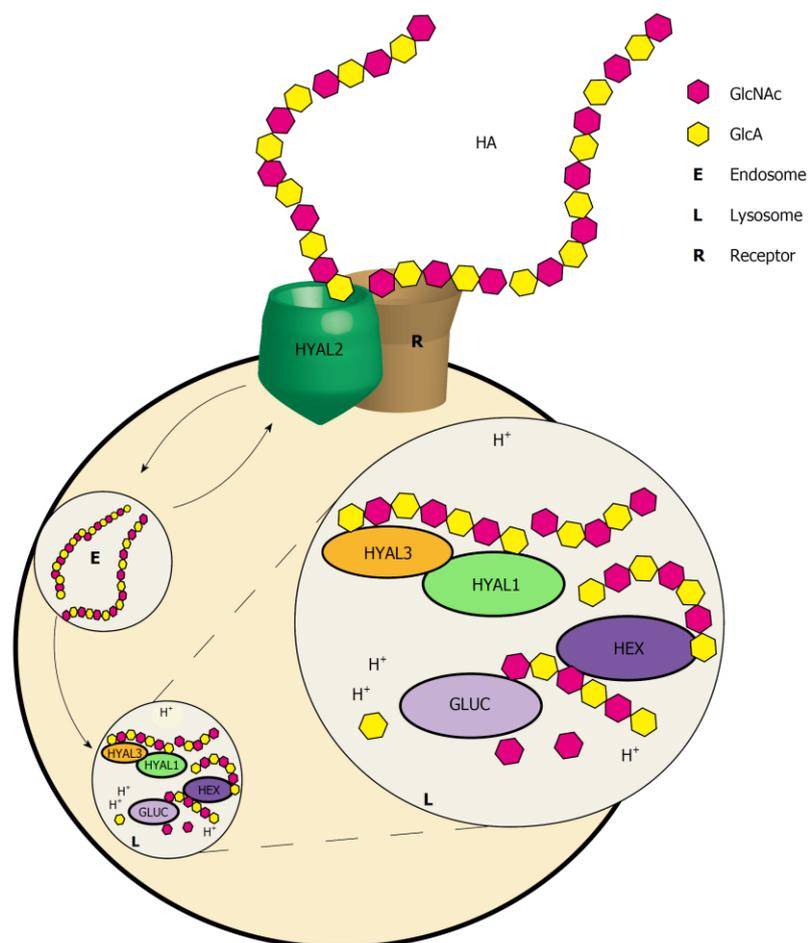


Figure 18 : Modèle de dégradation de l'HA par coopération de CD44, HYAL2 et HYAL1. La liaison de l'HA à son récepteur le rapproche de la membrane plasmique à laquelle est ancrée la HYAL2 qui dégrade l'HA en oligosaccharides simultanément à son internalisation. Suite à la fusion des endosomes et les lysosomes, l'HA est dégradé en disaccharides par HYAL1 et peut ensuite être clivé par des hexosaminidases (Triggs-Raine et al., 2015)

Plus récemment, une autre hyaluronidase a été identifiée, nommée **KIAA1199**, mais aussi CEMIP (cell-migration inducing protein) ou encore HYBID (HA-binding protein involved in HA depolymerization). Elle dégrade l'HA de haut poids moléculaire (10 000 kDa) en fragments de bas poids moléculaires (10 à 100 kDa) via l'endocytose médiée par la clathrine (Figure 19). Cette dégradation a lieu de manière indépendante de la coopération HYAL1/HYAL2/CD44. KIAA1199 est notamment exprimée dans le derme et le cartilage (Shimizu et al., 2018) (Yoshida et al., 2018). Cette hyaluronidase est impliquée dans la régulation de l'inflammation dans le derme liée à une infection car il a été montré que son absence augmente l'inflammation et l'activité antimicrobienne précisément dans ce tissu dermique (Dokoshi et al., 2020).

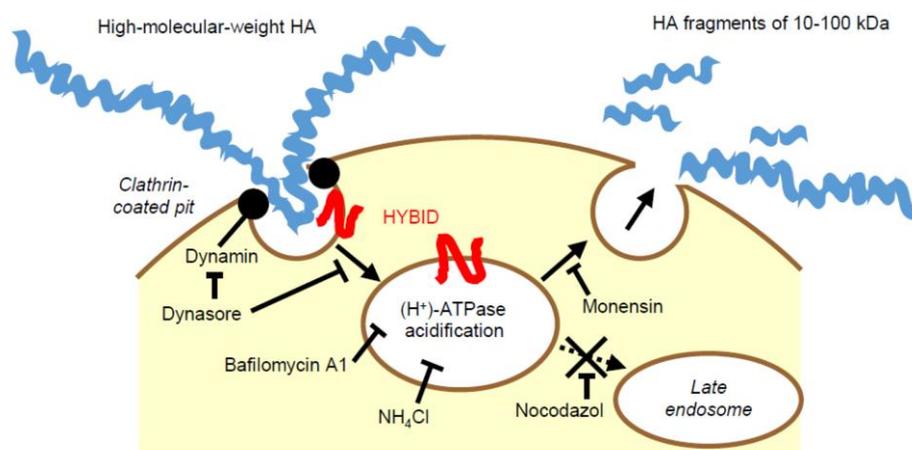


Figure 19 : Représentation de la dégradation de l'HA par KIAA1199 via l'endocytose de l'HA dans des vésicules recouvertes de clathrine (Yoshida et Okada, 2019)

2.4. Fonctions de l'HA épidermique

Alors que l'HA dermique a pour fonction majeure l'hydratation et l'amortissement des chocs, l'HA épidermique plus discret serait impliqué dans la régulation de plusieurs processus directement dépendants de la matrice extracellulaire, bien que certains rôles précis soient encore méconnus, voire encore controversés.

2.4.1. Régulation de la prolifération des kératinocytes

Comme mentionné plus haut dans cette introduction de thèse, en se liant à son récepteur CD44, l'HA active des voies de signalisation qui peuvent entre autres induire la migration et la prolifération des kératinocytes (Purée et Assoian, 2009).

Il a été démontré, déjà en 1991, qu'une mise en place rapide de l'HA à la surface des kératinocytes nouvellement produits par divisions cellulaires intervient et crée un lien entre la production accrue

d'HA et le processus de division cellulaire lui-même (Tammi et al., 1991). Plus tard, le même groupe a montré que le traitement d'épidermes avec l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) stimule la prolifération des kératinocytes simultanément à une augmentation de la production d'HA (Pasonen-Seppanen et al., 2003). De manière cohérente avec ces résultats, il a été rapporté qu'une application topique cutanée d'HA lié à de la phosphatidyléthanolamine (pour permettre le passage de la barrière hydrophobe) induit la prolifération des kératinocytes et l'épaississement de l'épiderme (Symonette et al., 2014). Toujours en accord avec ces informations, *in vivo*, l'injection d'HA dans le derme profond de peaux préalablement à une lésion accélère la réépithélialisation, sans modifier le processus inflammatoire (Nyman et al., 2019). Lorsque les kératinocytes sont traités au 4-méthylumbellifère (4-MU), un inhibiteur de la synthèse de l'HA, la réduction de la production d'HA s'accompagne d'un arrêt de la prolifération et une diminution de la migration des kératinocytes due à des modifications du cytosquelette (Rilla et al., 2004). Cependant, lors d'une série d'expérimentations réalisées par l'équipe de notre laboratoire, le 4-MU a été identifié comme étant une molécule inadéquate pour l'étude de la prolifération cellulaire car elle inhibe directement la prolifération des kératinocytes épidermique de manière indépendante à la présence ou non d'HA (Malaisse et al., 2016). Néanmoins, d'autres études ont montré une certaine implication de l'HA sur la prolifération cellulaire, mais sans avoir recours à l'utilisation du 4-MU. Par exemple, l'ajout d'HA exogène à une culture organotypique provoque l'induction de la prolifération accompagnée d'un épaississement de l'épiderme, mais en plus, l'expression de molécules intervenant dans la jonction épidermo-dermique se trouve également augmentée (Gu et al., 2010). Plus récemment en 2020, le traitement d'épidermes avec la molécule 1-éthyl- β -N-acétylglucosamine (β -NAG2), un substrat pouvant être converti en UDP-N-acétylglucosamine par la cellule, a stimulé la production d'HA tout en augmentant la prolifération des cellules basales (Endo et al., 2020).

Cependant, malgré toutes ces études montrant un lien entre la production d'HA et la prolifération des kératinocytes, Malaisse et al (2016) n'ont pas trouvé de lien de cause à effet entre ces deux événements. Par exemple, ni un traitement des épidermes reconstruits avec une hyaluronidase exogène provenant d'une bactérie du genre *Streptomyces* (StrepH), ni le blocage de la synthèse de l'HA par réduction de l'expression (*knock-down*) de l'UGDH (UDP-glucose 6-déhydrogénase), n'ont eu pour conséquences des modifications de la prolifération des kératinocytes épidermiques.

2.4.2. Régulation de la différenciation des kératinocytes

D'autres équipes de recherche se sont plus particulièrement intéressées aux liens éventuels qui existent entre l'HA et le processus de différenciation des kératinocytes.

Certaines publications qui s'intéressent à ces questions montrent l'HA comme répresseur du processus de différenciation. En 2003, une étude réalisée sur des kératinocytes de rats a mis en évidence qu'un traitement avec du KGF (Keratinocyte Growth Factor) induisait une accumulation d'HA par activation des HAS2 et HAS3. Or, parallèlement à cette augmentation de la quantité d'HA, l'expression de marqueurs de différenciation tels que la kératine 10 suprabasale, et dans une moindre mesure la filaggrine, était diminuée dans de telles conditions (Karvinen et al., 2003). Un an plus tard, des épidermes reconstruits à partir de cellules immortalisées de rat ont été traités avec une hyaluronidase exogène StrepH. A la suite de la dégradation spécifique de l'HA induite de cette manière, l'expression des marqueurs de différenciation précoces (kératine 10) et tardifs (filaggrine) a semblé légèrement augmentée (Passi et al., 2004). Une autre étude, basée sur l'utilisation de StrepH sur des épidermes de souris, a produit des observations qui ont conduit à tirer des conclusions similaires. La présence de StrepH dégrade l'HA et provoque la réduction de moitié de l'épaisseur de l'épiderme. Cependant, l'expression de la kératine 10 et l'expression de la filaggrine apparaissent davantage stimulées qu'en présence d'HA (Maytin et al., 2004). Une explication proposée serait que les kératinocytes dépourvus d'HA péricellulaire par le traitement via la hyaluronidase exogène peuvent entrer de manière précoce en différenciation, produisant en conséquence un épiderme reconstruit plus fin que les contrôles pourvus d'HA dans leur voisinage.

A l'inverse, d'autres études réalisées par Farwick et al. (2011) et Endo et al. (2020) ont mis en évidence l'effet activateur de l'HA sur la différenciation épidermique. Alors que les tailles des polymères d'HA peuvent exercer des effets opposés sur les voies de signalisation, ils peuvent aussi réguler l'expression de marqueurs de différenciation. Une augmentation de la quantité des fragments d'HA induit une augmentation de l'expression de marqueurs tardifs de différenciation et notamment des protéines impliquées dans la constitution des jonctions serrées (claudine et occludine) (Farwick et al., 2011). Récemment, des épidermes humains traités avec du 1-éthyl- β -N-acétylglucosamine (β -NAG2) ont présentés une production d'HA accrue accompagnée d'une augmentation de la stratification de l'épiderme et par la même occasion de l'expression de la filaggrine et de la transglutaminase 1. Cette accélération de la différenciation peut cependant être rétablie à son niveau basal en bloquant l'enzyme de conversion du substrat β -NAG2 (Endo et al., 2020).

D'autre part, la stimulation de la différenciation par l'HA passe entre autres par son interaction avec son récepteur CD44. Bourguignon *et al.* (2004) ont mis en évidence que l'interaction HA-CD44 est

impliquée dans le recrutement de la protéine kinase N-γ (PKN) qui stimule la voie de signalisation Rac1 et induit la phosphorylation de la phospholipase C (PLC). L'augmentation de l'activité de la PLC augmente la concentration cytoplasmique en ions Ca²⁺ et induit par conséquent la différenciation des kératinocytes. Parallèlement, l'ajout d'HA induit l'augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation tardif comme l'involucrine et la transglutaminase (Bourguignon et al., 2004). En accord avec ces résultats, l'ajout d'HA exogène provoque l'augmentation de l'expression de la kératine 10, de l'involucrine et de la profilaggrine sous la dépendance de CD44 (Bourguignon et al., 2006). De manière cohérente, l'absence de CD44 dans l'épiderme empêche ce phénomène et provoque même une diminution de l'expression de la kératine 10 et de la filaggrine (Shatirishvili et al., 2016). Une autre étude basée sur l'ajout d'HA (sous forme tétra-saccharidique) à des cultures de kératinocytes a montré l'expression accrue de la kératine 10 simultanément avec la phosphorylation de CD44 et avec une augmentation de la concentration en ions Ca²⁺ cytosolique (Kage et al., 2014).

Finalement, les études menées par Malaisse *et al.* (2016) dans notre laboratoire ont conduit à conclure que la présence de l'HA au voisinage des cellules épidermiques d'une part et le processus de différenciation de ces cellules d'autre part sont deux événements indépendants. En effet, les traitements d'épidermes reconstruits humains par le 4-MU, ou la StrepH, n'ont montré aucun impact sur l'expression de la kératine 10, la filaggrine et l'involucrine. De même que des kératinocytes déficients pour l'enzyme de synthèse UGDH n'ont montré aucune régulation de la différenciation (Malaisse et al., 2016).

2.4.3. Participation à la barrière épidermique

L'étape ultime de la différenciation des kératinocytes est la kératinisation qui correspond à la formation des cellules mortes constituant notamment la couche cornée de l'épiderme (voir point 1.3.2.). Lors de cette étape, les cornéocytes se retrouvent enveloppés dans une matrice lipidique qui contribue à la barrière étanche rencontrée en surface de l'épiderme. Pour rappel, les lipides sont sécrétés dans la MEC par les cellules de la couche granuleuse lors de l'excrétion des corps lamellaires. Lorsque le métabolisme de ces lipides est perturbé, l'intégrité de la barrière est rapidement altérée.

L'HA et son récepteur CD44 sont impliqués dans la mise en place de cette barrière cutanée. Il est à noter que l'interaction HA-CD44 transmet de l'information dans les deux directions : la présence d'HA influence l'expression de CD44 (Gruber et al., 2021). Et inversement en absence de CD44, une moindre quantité d'HA est détectée dans les épidermes et ceux-ci apparaissent plus fins (Bourguignon et al., 2006).

L'HA et CD44 interviennent dans la formation et la polarisation de la sécrétion des corps lamellaires. En effet, il a été démontré qu'en absence de CD44 (souris *knock-out*), le contenu et la polarisation de

la sécrétion des corps lamellaires étaient perturbés. Alors qu'en conditions normales les lipides sont exclusivement sécrétés au pôle apical des kératinocytes de la couche granuleuse, à l'interface avec les cornéocytes, l'absence de CD44 provoque une sécrétion baso-latérale des corps lamellaires qui s'ajoute à la sécrétion apicale habituelle (Figure 20). De plus, la synthèse du cholestérol stimulée par la présence de l'HA est bloquée. Ces défauts de polarisation des kératinocytes granuleux et de synthèse de lipides affectent la structure et la fonction de la barrière épidermique (Bourguignon et al., 2006). En accord avec ces observations, il a été montré que l'ajout d'HA (tétra-saccharidique) permet d'augmenter le niveau d'expression des enzymes de synthèse des céramides, ainsi que le contenu intracellulaire en céramides. Cette amélioration du contenu lipidique médié par l'HA permet l'amélioration de la rétention d'eau dans la couche cornée, tout en diminuant la perte d'eau transépithéliale (Kage et al., 2016).

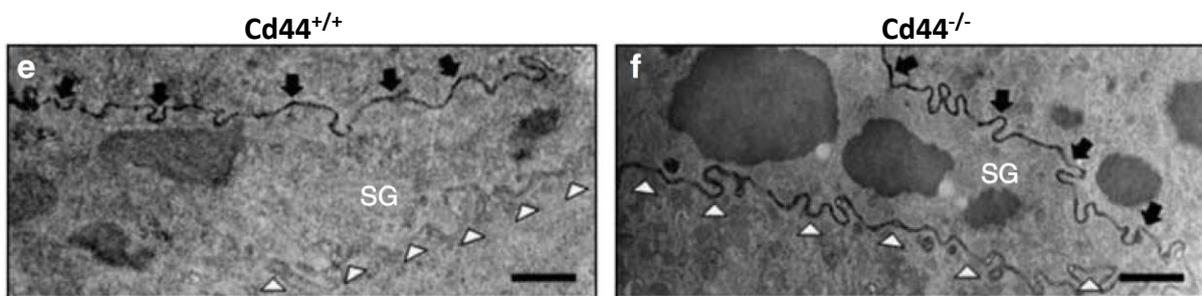


Figure 20 : Images de microscopie électronique à transmission mettant en évidence la sécrétion des corps lamellaires au pôle apical dans les épidermes Cd44^{+/+} et aux pôles apical et basal dans les épidermes Cd44^{-/-}. Les flèches blanches pointent le pôle basal et les flèches noirs pointent le pôle apical des cellules de la couche granuleuse (Bourguignon et al., 2006)

L'absence de CD44 a également un impact sur la formation des jonctions serrées. Il a été démontré en effet que les souris Cd44^{-/-} présentent un retard transitoire d'un jour dans l'établissement de la barrière cutanée au 18.5^{ème} jour d'embryogenèse. Ce retard coïncide avec une altération des protéines constituant les jonctions serrées (Kirschner et al., 2011).

Tous ces défauts de barrière mènent à la formation d'épidermes plus fins et présentant des délais dans la récupération d'une barrière fonctionnelle suite à une blessure.

2.4.4. Cicatrisation et inflammation

La peau est constamment soumise à de nombreuses contraintes et dommages, notamment des blessures, des brûlures, des coups de soleil, etc. Tous ces événements provoquent des réactions inflammatoires et impliquent à différents égards l'acide hyaluronique.

Processus de cicatrisation cutanée

Le processus de cicatrisation consiste à restaurer l'épiderme et ses fonctions de barrières après une blessure qui abîme les structures cutanées. La cicatrisation se déroule en 4 phases successives :

L'**hémostase** est la première phase et prend place directement après la blessure. Elle vise à réduire immédiatement la perte de sang par la formation d'un caillot fibrineux qui démarre par l'adhésion des plaquettes au collagène par l'intermédiaire de la fibronectine et du facteur de von Willebrand et l'agrégation des plaquettes entre elles via le fibrinogène et se prolonge par la coagulation sanguine. Ce caillot, appelé aussi clou plaquettaire, est composé d'un réseau riche en fibrine, en fibronectine, et en thrombospondine et enferme des cellules sanguines dont de nombreux globules rouges. Au niveau du clou plaquettaire, les plaquettes libèrent des cytokines et des facteurs de croissance comme le TGF- α , le PDGF, l'EGF, etc, qui recrutent des cellules impliquées dans la réparation tissulaire comme des macrophages et des fibroblastes (Ghatak et al., 2015).

La phase d'**inflammation** est caractérisée par le recrutement de cellules du système immunitaire, comme les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes par attraction chimiotactique (ex : la chémokine CXCR2, l'IL-8, etc.). Les neutrophiles sont responsables du « nettoyage » de la plaie en libérant des enzymes (lysozymes, hydrolases acides, etc.) et des ROS visant à détruire les éventuels microbes et bactéries. Les neutrophiles libèrent également des cytokines (IL-1 α et IL-1 β , IL-6) qui vont à leur tour attirer d'autres cellules immunitaires. Les macrophages terminent l'action des neutrophiles en phagocytant ces derniers et en éliminant les débris restants (Ghatak et al., 2015).

La **prolifération et la migration cellulaires** sont ensuite induites via la sécrétion de cytokines (IL-1, TNF- α , interféron) et facteurs de croissance (FGF, VEGF, TGF- α) par les macrophages. Cela stimule la néo-angiogenèse ainsi que le recrutement de fibroblastes et de kératinocytes. La migration des cellules dans la MEC fibreuse est favorisée par l'action des métalloprotéinases matricielles (MMP), endopeptidases qui dégradent les molécules de la matrice. Les fibroblastes sécrètent collagène et fibronectine de sorte qu'ils élaborent une nouvelle matrice extracellulaire riche en glycosaminoglycans (chondroïtine, dermatan et héparan sulfates) qui facilite la migration des cellules. Les kératinocytes migrent et prolifèrent à partir du fond de la plaie et adhèrent à la lame basale nouvellement établie par la coopération des kératinocytes et des fibroblastes (Gall, 2010) (Ghatak et al., 2015).

Lors de la phase de **remodelage**, l'inflammation diminue grâce à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, par les mastocytes notamment. La MEC dermique est remodelée et les fibroblastes se différencient en myofibroblastes sous l'action du TGF- β (Simpson et al., 2009). Ces cellules contractiles participent activement à la fermeture des berges. Quant à l'épiderme, le caractère hyper-prolifératif des kératinocytes s'interrompt et leur production revient à un rythme normal (Gall, 2010).

Durant ce processus long et complexe, l'acide hyaluronique intervient de manière très variée durant les différentes étapes successives.

Au cours de la cicatrisation, la production d'acide hyaluronique augmente sous l'influence de nombreux facteurs de croissance. En effet, de l'EGF, du KGF, du TGF- β et du HB-EGF sont produits, d'abord au niveau du clou plaquettaire et ensuite par les macrophages recrutés au niveau du site lésé. En conditions normales, le précurseur de l'HB-EGF se trouve initialement inséré dans la membrane plasmique, mais lors d'une blessure, il se trouve clivé par l'action de métalloprotéinases (notamment ADAM17) qui libèrent l'HB-EGF sous une forme soluble (Hiratsuka et al., 2015). Le KGF et l'EGF sont connus pour cibler les gènes des HAS2 et HAS3 et ainsi induire une production accrue d'HA, lequel exerce un effet pro-migratoire sur les kératinocytes (Karvinen et al., 2003) (Pasonen-Seppanen et al., 2003). Simultanément, la présence d'EGF stimule la production du récepteur CD44 par les cellules de la couche basale de l'épiderme. De manière intéressante, CD44 est localisé dans les membranes plasmiques au niveau des radeaux lipidiques, comme le récepteur de l'EGF (EGFR) (Pasonen-Seppanen et al., 2003). La liaison de l'EGF ou de l'HB-EGF à l'EGFR induit les voies de signalisation des ERK/MAP kinases, des PI3 Kinases / AKT et des STAT qui stimulent l'expression des HA synthases (Figure 21) (Lee et al., 2019) (Monslow et al., 2009). L'augmentation de la quantité d'HA influence la migration cellulaire mais aussi la prolifération des cellules endothéliales, ce qui favorise la néo-angiogenèse (Gall, 2010). De plus, CD44 apparait plus exprimé. L'interaction HA-CD44 au niveau des cellules endothéliales permet, comme précédemment mentionné, de faciliter le recrutement des cellules inflammatoires. En absence de CD44, une moins grande quantité d'HA s'accumule au site lésionnel et la prolifération des kératinocytes sous l'influence des facteurs de croissance diminue (Kaya et al., 1997). Ajoutons enfin qu'il a été démontré récemment que la cicatrisation se trouve retardée en absence de CD44 (Shatirishvili et al., 2016).

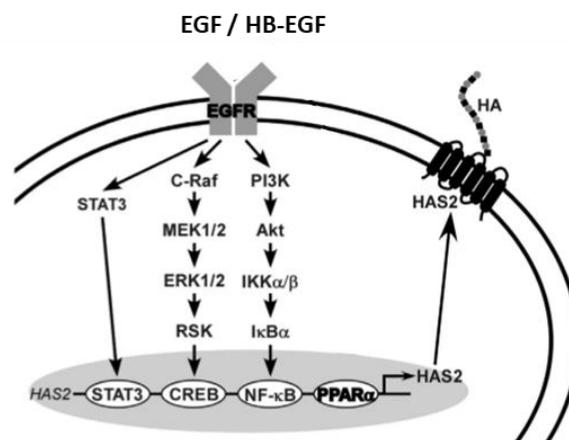


Figure 21 : Voies de signalisation activées par la liaison de l'EGF ou de l'HB-EGF à l'EGFR et menant à l'expression des HAS (Adapté de Lee et al., 2019)

Au début du processus de cicatrisation, l'HA initialement synthétisé est de haut poids moléculaire. Cet HA se trouve au niveau du clou plaquettaire et permet une forte rétention d'eau, favorisant par conséquent la formation d'un œdème (Frenkel, 2014). L'importante matrice temporaire régule la migration des cellules vers le site inflammatoire (Muto et al., 2019). L'interaction HA-CD44 participe à la formation d'une matrice péricellulaire organisée qui facilite le recrutement des neutrophiles au site de lésion. Cependant les cellules inflammatoires vont à leur tour sécréter des cytokines de type TNF- α , IL1- β et IL-8 (Chen et al., 1999). La stimulation des kératinocytes par ces molécules pro-inflammatoires change l'organisation de l'HA péricellulaire et induit la formation de câbles d'HA (Jokela et al., 2008). D'autres protéines, de type hyaladhérines telles que la protéine TSG-6 (*TNF α -stimulated gene 6*), sont surexprimées et impliquées dans l'organisation de cette matrice lors de la cicatrisation. Les leucocytes adhèrent aux câbles d'HA et se retrouvent « séquestrés », ce qui les empêche de lier leur récepteur et d'induire une réaction inflammatoire plus forte. Les câbles d'HA séquestrent également d'autres médiateurs pro-inflammatoires (Day et al., 2005) (Wang et al., 2011). Dans ce contexte, l'HA exerce donc des propriétés anti-inflammatoires.

Le contexte inflammatoire génère également des ROS et une surexpression des hyaluronidases (HYAL1 et HYAL2), ainsi qu'une surexpression des hexosaminidases. Les polymères d'HA se retrouvent alors fragmentés en oligomères de bas poids moléculaires. Ces fragments sont potentiellement reconnus comme des antigènes par les TLR 2 et 4, ce qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β) médiées par l'activation de NF κ B. Ces cytokines activent en retour la transcription des HAS qui produisent massivement de nouveaux polymères d'HA et génèrent un cercle vicieux inflammatoire (Figure 22) (Ghatak et al., 2015) (Kavasi et al., 2017). Il a été montré que l'absence de TLR 2 et 4 protège contre la mise en place d'une inflammation aiguë (Jiang et al., 2005). De plus, en absence de TLR 4, les niveaux d'expression des HAS 1 et 3 sont diminués, ce qui réduit la quantité détectée d'HA péricellulaire (Kavasi et al., 2019).

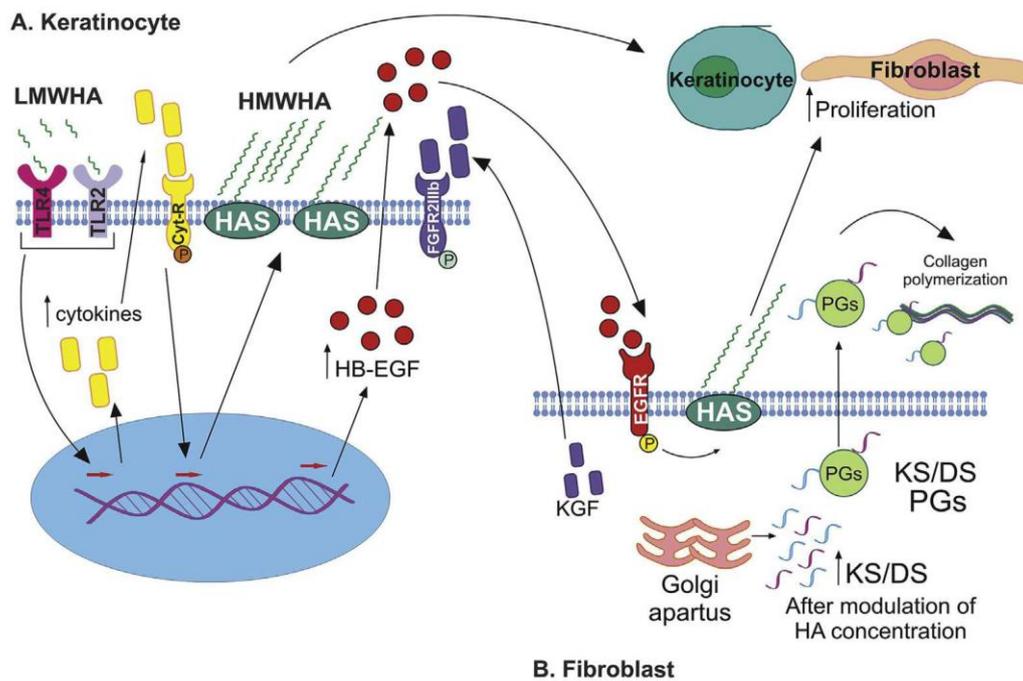


Figure 22 : Représentation schématique de l'implication de l'HA dans la cicatrisation. La présence de HA de bas poids moléculaires générés par le contexte inflammatoire active la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, l'expression des HAS et augmente la production d'HB-EGF. Le HA de haut poids moléculaire et l'HB-EGF, par liaison avec l'EGFR, augmente la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes (Kavasi et al., 2017)

De manière intéressante, les souris double *knockout* Has1/Has3 possèdent moins d'HA et présentent une cicatrisation, une migration des leucocytes et une restauration de la MEC qui sont plus rapides (Mack et al., 2012). Ce phénotype pourrait s'expliquer car l'absence d'HA rend le derme moins hydraté, ce qui favorise sa contraction. De plus, une quantité accrue de TGF- β provoque une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes efficace et referme donc rapidement les bords de la plaie (Maytin, 2016).

Inflammation

Le métabolisme de l'acide hyaluronique est régulé lors de processus inflammatoires. En retour, l'acide hyaluronique va également moduler la réponse inflammatoire.

Dans un épiderme enflammé, comme lors d'un eczéma sévère, les kératinocytes surexpriment la HAS3, provoquant une accumulation d'HA dans la MEC et une réduction des cadhérines, et augmentant l'entrée d'eau dans l'épiderme qui fait apparaître la spongieuse (Ohtani et al., 2009). La surexpression des HAS s'accompagne d'une surexpression de CD44, lequel serait exprimé en grande quantité pour recapter l'HA synthétisé en surplus et permettre la résolution de l'inflammation (Barnes et al., 2012). La surexpression de la HAS3 a également été observée dans une autre pathologie cutanée, la dermatite

atopique (DA) (Malaisse et al., 2014). Dans la DA, les interleukines 4 et 13 ont été identifiées comme responsables au niveau des kératinocytes des altérations de la barrière (voir 1.3.3.). Ces interleukines sont également impliquées dans la surexpression de la HAS3 (Malaisse et al., 2014). La HAS3, par son activité enzymatique rapide, génère des polymères d'HA de bas poids moléculaire. Parallèlement, les ROS et hyaluronidases sont actives dans un contexte inflammatoire et participent donc à la formation de molécules de HA de bas poids moléculaire, lesquels sont reconnus par les TLR 2 et 4 comme des DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) (Figure 23). Les TLR, par activation de NFκB, activent la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'expression des HAS3 (Ghatak et al., 2015).

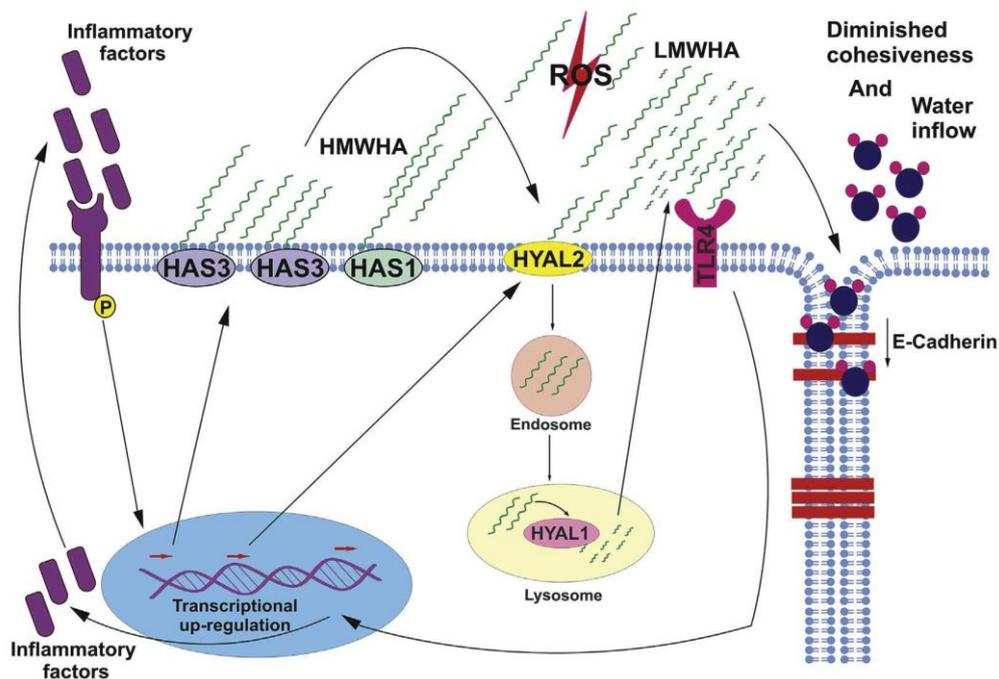


Figure 23 : Représentation schématique de l'HA dans l'inflammation de l'épiderme. L'augmentation de la synthèse de l'HA simultanément à sa dégradation en fragments de bas poids mène à l'altération de la barrière épidermique (Kavasi et al., 2017)

De manière intéressante, les rats-taupes nus sont connus pour une longévité peu commune (presque 30 ans, soit 9 fois plus longtemps que les rongeurs de même taille) (Buffenstein, 2008) et une absence étonnante du développement de tumeurs malignes (Delaney et al., 2013). En 2013, Tian et ses collaborateurs ont montré que les peaux de rats-taupes nus produisent un HA de très haut poids moléculaire et une enzyme de dégradation Hyal2 moins active que dans les autres espèces de rongeurs. La résistance de ces animaux à la tumorigenèse, processus complexe nettement favorisé par un contexte influencé par des conditions inflammatoires, semble s'expliquer par la production de cet HA de haut poids moléculaire et suggère en contrepartie que la production d'HA de bas poids moléculaire est en partie liée aux conditions défavorables créées au cours de phénomènes

inflammatoires. Cette observation largement médiatisée à l'époque a cependant été remise en question suite à l'incapacité à reproduire ces résultats. En effet, le poids moléculaire de l'HA dans les peaux des rats-taupes nus ne semble pas aussi exceptionnel que proclamé en 2013, même si sa taille est néanmoins plus élevée que chez le cochon d'inde (Del Marmol et al., 2021).

2.5. Hyaladhérines

Bien que libre dans la MEC, l'HA est capable d'interagir (adhérer) avec un grand nombre de molécules regroupées sous l'appellation de hyaladhérines. Ces partenaires de l'HA sont généralement extracellulaires, et éventuellement ancrés sur la membrane plasmique des cellules (Figure 24) (Toole, 2004). Parmi les partenaires cellulaires de l'HA, les plus connus sont les récepteurs CD44 et RHAMM.

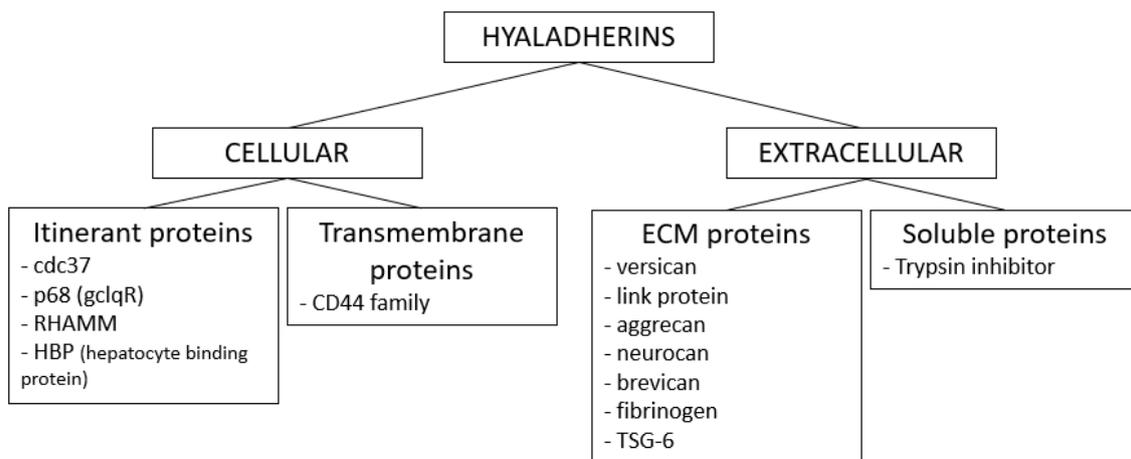


Figure 24 : Arbre représentant la famille des hyaladhérines et les différents membres (Adapté de Turley et al., 1999)

CD44 (Cluster of Differentiation 44) est une glycoprotéine transmembranaire codée par 19 exons qui possède de nombreuses isoformes qui résultent à la fois d'épissages alternatifs et de modifications post-traductionnelles (Bourguignon, 2014). Dans l'épiderme, 18 transcrits différents ont été identifiés (Teye et al., 2016). Tous ces variants possèdent un domaine extracellulaire capables de lier l'HA ainsi que d'autres molécules telles que des GAG (héparan sulfate, dermatan sulfate, chondroïtine sulfate) en fonction de l'épissage. Il a notamment été montré que la liaison de GAG à CD44 peut améliorer la présentation des facteurs de croissance à leur récepteur (Teye et al., 2016). Les modifications post-traductionnelles, O- et N-glycosylations du domaine extracellulaire et phosphorylations et acétylations du domaine cytoplasmique, semblent également moduler l'affinité de CD44 pour l'HA (Tammi et al., 1998) (Jokela et al., 2015). L'interaction HA-CD44 contribue à former une matrice péricellulaire (Pasonen-Seppanen et al., 2012), se trouve impliquée dans la régulation de la différenciation des kératinocytes (Bourguignon et al., 2014) ainsi que dans l'établissement de la barrière épidermique via la formation des jonctions serrées au niveau de la couche granuleuse (Kirschner et al., 2011). La liaison

de l'HA à CD44 active diverses voies de signalisation dépendantes de la taille des polymères d'HA. En effet, les HA de hauts poids moléculaires se lient à leur récepteur CD44 via des ponts hydrogènes forts et activent les voies de signalisation telles que les RhoGTPases de type RhoA qui stimulent la prolifération et la migration des kératinocytes. En revanche, les HA de bas poids moléculaires forment des ponts hydrogènes moins forts car dépendants de la concentration en HA et activent les voies de signalisation de type Rac1 qui stimulent davantage l'adhésion et la différenciation des kératinocytes (Figure 25) (Bourguignon et al., 2014) (Tavianatou et al., 2019).

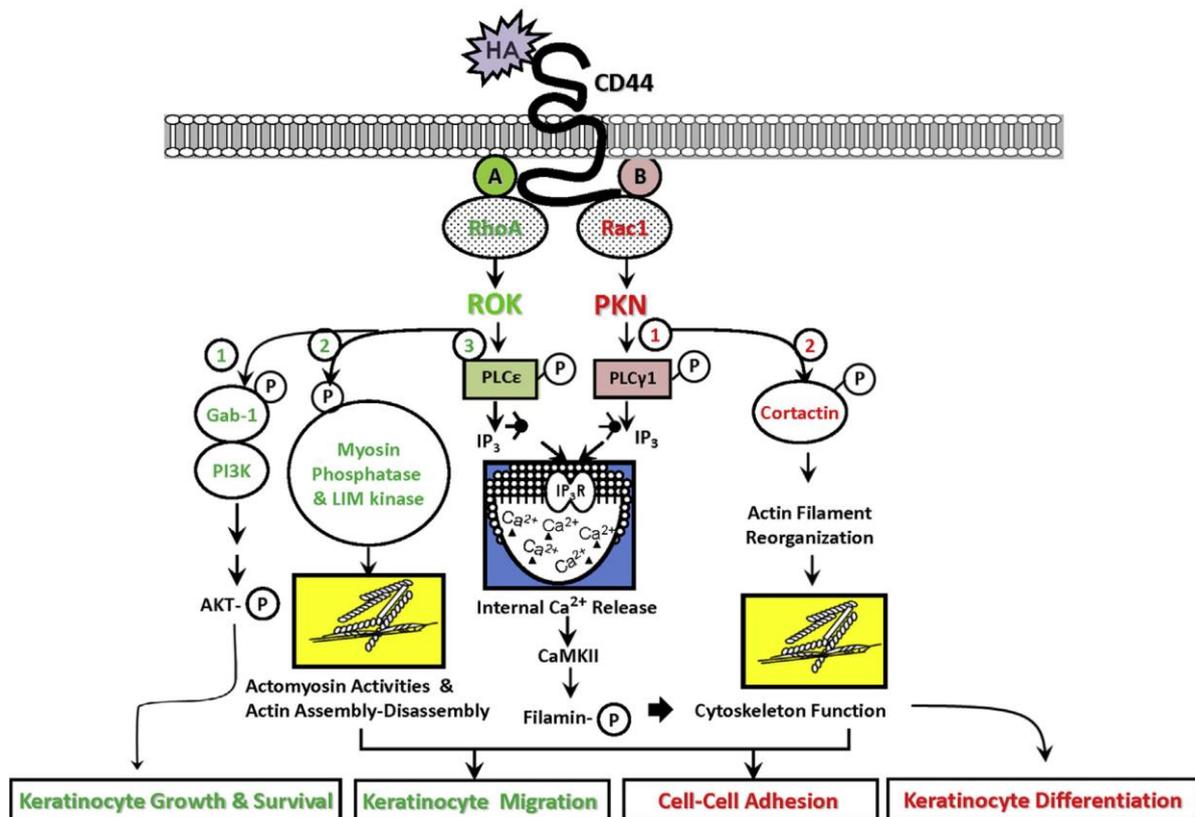


Figure 25 : Représentation des voies de signalisation déclenchées par l'interaction de CD44 et des polymères d'HA et haut poids ou de bas poids moléculaire (Bourguignon et al., 2014)

RHAMM (Receptor for HA-mediated mobility) est un autre récepteur de l'HA, caractérisé par plusieurs isoformes qui se localisent soit en membrane, soit dans le cytosol. Peu exprimé dans des conditions physiologiques, il est surexprimé par les cellules cancéreuses ou encore par les cellules normales mais dans des conditions inflammatoires. Ce récepteur peut interagir avec CD44 entre autres pour activer la voie de signalisation des MAP Kinases, induisant dans ce cas la migration cellulaire (Kavasi et al., 2017) (Tavianatou et al., 2019).

Dans la catégorie des hyaladhérines extracellulaires, on trouve de nombreux protéoglycans que nous ne détaillerons pas ici. On trouve aussi une protéine anti-inflammatoire encore assez méconnue au

démarrage de cette thèse et nommée protéine **TSG-6** pour TNF α -stimulated gene-6, car initialement identifiée parmi des produits de gènes stimulés en présence du TNF α . La protéine TSG-6 est capable de lier directement l'HA, mais elle se comporte aussi comme une enzyme qui médie la translocation sur l'HA des chaînes lourdes de l'inter- α -trypsine-inhibiteur permettant de réticuler l'HA en un réseau.

3. TSG-6

3.1. Généralités

La protéine TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene 6) est codée par le gène *TNFAIP6* (TNF- α -induced protein 6) localisé sur le chromosome 2q23.3 humain. Notons qu'un miRNA (mir4773) et un miscRNA (RN7SL124P) se trouvent dans les introns du gène *TNFAIP6* ; leur présence sera discutée dans la section « Discussion » de ce manuscrit. Ce gène *TNFAIP6* de 22,45 kb est composé de six exons (Figure 26a). La protéine TSG-6, sécrétée dans la MEC, est formée de 277 acides aminés présentant un peptide signal clivable, ce qui suggère que la protéine est sécrétée dans la matrice par exocytose, un domaine de liaison à l'HA nommé LINK et un domaine CUB (complement component C1r/C1s, Uegf, et bone morphogenetic protein BMP-1), typique des protéines de la MEC (Figure 26b) (Day et Milner, 2019).

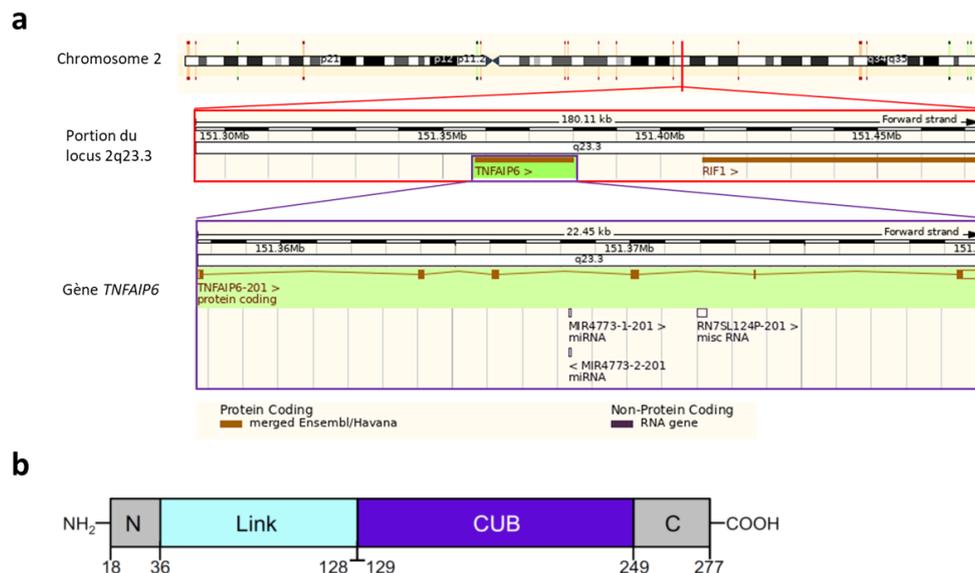


Figure 26 : (a) Représentation du chromosome 2, locus q23.3 au niveau duquel se trouve le gène *TNFAIP6* ainsi qu'un miRNA et un miscRNA dans les introns du gène (ensembl.org). (b) Représentation schématique de l'organisation des domaines du TSG-6 humain avec dénombrement des acides aminés (Day et Milner, 2019)

Les fonctions associées au **domaine CUB** de la protéine sont peu connues mais le fait qu'il soit hautement conservé entre les espèces suggère qu'il exerce un rôle essentiel, du moins pour la bonne fonction de la protéine TSG-6 (Milner et Day, 2003). En effet, l'activité de la protéine TSG-6 en tant qu'enzyme impliquée dans la réticulation des chaînes d'HA par l'intermédiaire de l'inter- α -trypsine inhibiteur (ITI) nécessite la protéine entière et pas seulement le domaine LINK (Getting et al., 2002). En 2008, le domaine CUB a été identifié comme exerçant une fonction de liaison avec la fibronectine,

ce qui peut impliquer la protéine TSG-6 dans la régulation d'interactions de la fibronectine avec d'autres composants matriciels (Kuznetsova et al., 2008).

Le **domaine LINK** de la protéine est caractéristique des hyaladhérines et concerne la capacité à lier l'HA (Tammi et al., 2002). De ce fait d'ailleurs, la protéine TSG-6 peut être utilisée comme HABP (hyaluronan binding protein) afin de détecter l'HA sur coupes histologiques à des fins de recherche (Jadin et al., 2014). Le domaine LINK de la protéine TSG-6, très similaire à celui du récepteur CD44, peut également lier d'autres molécules (glycosaminoglycans) de la matrice extracellulaire comme la chondroïtine-4-sulfate, le dermatan sulfate, l'héparan sulfate et l'aggrecan (Milner et Day, 2003) (Park et al., 2016). De manière particulière, il a été mis en évidence que le domaine LINK de la protéine TSG-6 change de conformation lorsque l'HA s'y lie. L'HA se lie de manière spécifique au niveau de 7 résidus du domaine LINK : Lys¹¹, Tyr¹², His⁴⁵, Tyr⁵⁹, Phe⁷⁰, Tyr⁷⁸ et Arg⁸¹ (Blundell et al., 2003) (Milner et al., 2007) (Higman et al., 2014). La liaison TSG-6-HA est médiée par la combinaison d'interactions ioniques et aromatiques (Blundell et al., 2003) (Higman et al., 2014). Ces interactions sont plus fortes que les ponts hydrogène et les forces de van der Waals qui s'établissent entre l'HA et son récepteur membranaire CD44, ce qui explique que l'affinité TSG-6-HA est supérieure à l'affinité CD44-HA (Higman et al., 2014). Cependant, on observe que, suite à sa liaison à la protéine TSG-6, l'HA voit son affinité pour CD44 augmentée (Baranova et al., 2013) (Lesley et al., 2004). En effet, il a été montré que l'interaction de TSG-6 avec l'HA induit l'oligomérisation de TSG-6 sous forme de dimères, provoquant la réticulation des chaînes d'HA, c'est-à-dire que la protéine TSG-6 forme des liaisons avec l'HA, ce qui provoque une condensation, une stabilisation et une rigidification de la matrice d'HA (Figure 27). Cette organisation induit le rapprochement physique des polymères d'HA près des récepteurs membranaires (Baranova et al., 2011).

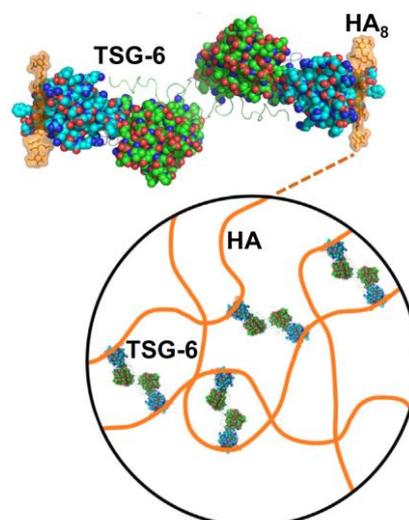


Figure 27 : Modélisation du complexe HA – TSG-6. La liaison de l'HA à TSG-6 induit l'oligomérisation de ce dernier via le domaine CUB et la réticulation des chaînes d'HA (Day et Milner, 2019)

En plus de sa liaison à l'HA, la protéine TSG-6 est capable d'interagir avec de nombreuses autres molécules se trouvant dans la MEC telles que certains glycosaminoglycans (e.g. héparan sulfate, chondroïtine sulfate), des protéines matricielles (fibronectine, pentraxine, thrombospondine, etc.), des BMP et des chémokines. Ces interactions et leur description sont amplement développées dans la *review* publiée en 2019 par Day et Milner, 2019.

3.2. Fonctions de la protéine TSG-6

Les fonctions de la protéine TSG-6 dans les tissus sont nombreuses et dépendent des interactions avec les autres composants matriciels. En tant que protéine sécrétée dans la MEC, TSG-6 est très impliquée dans l'organisation et le remodelage de celle-ci, ce qui lui confère par conséquent un impact au moins indirect sur la régulation cellulaire (métabolisme, différenciation, signalisation) et celle de la réponse immunitaire (Figure 28). Pour ce faire, la protéine TSG-6 est capable d'interagir avec un large éventail des molécules qu'elle rencontre dans son voisinage.

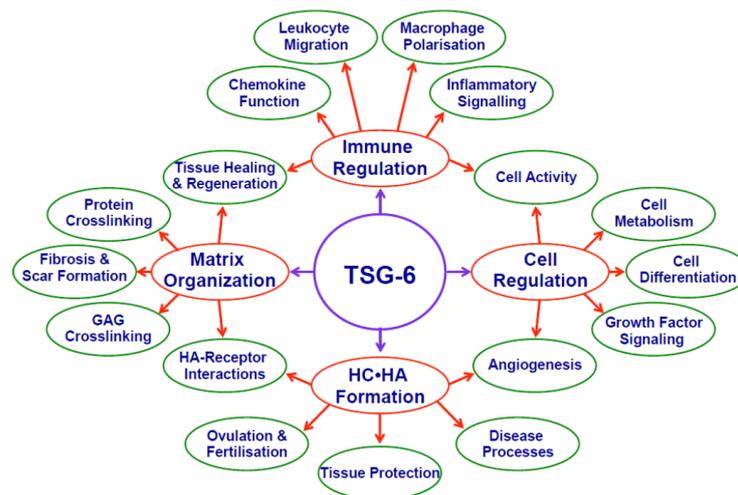


Figure 28 : Regroupement des fonctions de TSG-6 par catégories : organisation de la MEC, formation de complexes HA/HC, régulations cellulaire et immunitaire (Day et Milner, 2019)

3.2.1. Organisation de la matrice extracellulaire

La protéine TSG-6 lie la fibronectine pour organiser la MEC (Kuznetsova et al., 2008). Cette interaction, d'abord caractérisée au niveau du domaine CUB de la protéine, est également possible via le domaine LINK. La thrombospondine est également impliquée dans l'organisation de la matrice par une interaction directe avec TSG-6 mais aussi par ses propriétés de régulateur positif de l'activité enzymatique de TSG-6 (Kuznetsova et al., 2005).

La protéine TSG-6 lie aussi des GAG sulfatés comme la chondroïtine sulfate (Park et al., 2016) et l'héparan sulfate, tous deux impliqués dans le remodelage de la matrice. Bien que les sites de liaison de l'héparan sulfate et de l'HA soient distincts, le changement de conformation du domaine LINK suite à la liaison de l'HA empêche la liaison TSG-6-héparan sulfate simultanément à la liaison TSG-6-HA (Blundell et al., 2003) (Higman et al., 2007).

Lorsque l'HA interagit avec la protéine TSG-6, il y a oligomérisation de cette dernière et la formation de dimères de TSG-6 permet une réticulation de l'HA sous forme d'une matrice dense (Baranova et al., 2011). Cette matrice dense modifie les propriétés mécaniques et l'hydratation du tissu et est importante pour la cicatrisation (Wight, 2018). Cependant, l'affinité de TSG-6 pour l'HA est moindre que pour l'**inter- α -trypsine inhibiteur** (ITI). En effet, la réticulation des chaînes d'HA et l'organisation de la MEC a lieu également par l'intermédiaire de l'ITI. L'ITI est une glycoprotéine plasmatique appartenant à la famille des inhibiteurs de protéases. Synthétisée par les hépatocytes, l'ITI circule dans le plasma sanguin et va rejoindre les tissus lors d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, par exemple lors d'une réaction inflammatoire. L'ITI est composé de deux chaînes lourdes (HC) liées par des liens ester à une chondroïtine sulfate et à une bikunine. Lorsque l'ITI se localise au même endroit que l'HA et la protéine TSG-6, cette dernière peut former une liaison covalente HC-HA (Figure 29). Cette réaction se déroule en deux temps. Tout d'abord, une chaîne lourde de l'ITI est transférée sur TSG-6 par une première réaction de transestérification. Ensuite, la chaîne lourde est transférée sur un résidu N-acétyl-glucosamine de l'HA. Ces deux réactions successives nécessitent la présence d'ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} , dont le site de liaison se trouverait au niveau du domaine CUB. Après la deuxième réaction de transfert, la protéine TSG-6 se retrouve libre dans la MEC pour jouer à nouveau son rôle éventuel d'enzyme (Rugg et al., 2005). Pour une *review* sur l'ITI, consulter Lord et al. (2020).

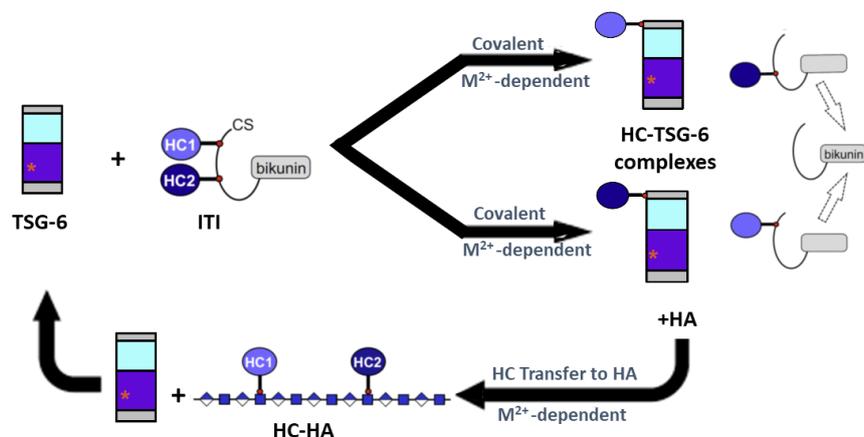


Figure 29 : Mécanisme de transfert des HC (Heavy Chains) sur l'HA via la protéine TSG-6 (Adapté de Day et Milner, 2019).

Six chaînes lourdes de l'ITI ont été identifiées. Les HC1 et 2 ont été détectées dans les épidermes humains normaux (Tan et al., 2011). La chaîne lourde majoritairement exprimée dans la peau humaine (au niveau dermique) est la HC5, dont l'expression est augmentée dans des pathologies inflammatoires de la peau, par exemple durant une dermatite allergique de contact (Huth et al., 2015). Il a aussi été montré que cette HC5 lie l'HA pour le stabiliser et pour participer à la formation de la MEC cutanée (Huth et al., 2020).

Ces complexes HC-HA forment un réseau d'HA plus répandu et plus hydraté que les complexes HA-TSG-6 (Baranova et al., 2013). Comme l'HA lié directement à TSG-6, les complexes HC-HA montrent une plus grande affinité pour CD44 que l'HA libre. L'interaction de l'HA avec CD44 peut alors activer les voies de signalisation de ce récepteur impliquées dans de nombreuses réponses cellulaires (prolifération, différenciation, migration). De plus, la liaison des complexes HC-HA avec CD44 améliore l'infiltration de leucocytes (Zhuo et al., 2006). A l'inverse, une autre étude a montré que les complexes HC-HA capturent et bloquent les leucocytes (Abbadi et al., 2016).

3.2.2. Régulation cellulaire et régulation immunitaire

La protéine TSG-6 est impliquée dans la **différenciation** de certains types cellulaires. Notamment, elle intervient, avec l'ITIHC5, dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes en formant une matrice péricellulaire riche en HA (Martin et al., 2016). Dans le contexte de l'os, la protéine TSG-6 est capable d'interagir avec des BMP (bone morphogenetic protein), les empêchant de jouer leur rôle dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes (Mahoney et al., 2008). Toujours dans ce contexte osseux, TSG-6 interfère avec l'**activité cellulaire** en se liant à RANKL et, de ce fait, en inhibant la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes. Il a d'ailleurs été montré que les os longs des souris *Tsg-6^{-/-}* saines présentent une masse osseuse plus importante, suggérant l'implication de TSG-6 dans l'homéostasie de l'os (Mahoney et al., 2008 et 2011). La protéine TSG-6 régule aussi l'**angiogenèse** en se liant à la pentraxine 3. De manière générale, la pentraxine 3 se lie au FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), ce qui inhibe son action pro-angiogène. Lorsque TSG-6 est sécrétée, elle peut lier la pentraxine 3 et libère dès lors le FGF-2 et son activité angiogène (Leali et al., 2012).

Au niveau du système et des réponses immunitaires, la protéine TSG-6 est impliquée dans la **polarisation des macrophages** via la formation de complexes HC-HA. En effet, la protéine TSG-6 provoque le changement de polarisation des macrophages du phénotype M1 pro-inflammatoire vers le phénotype M2 anti-inflammatoire (Mittal et al., 2016) (Liu et al., 2021). De plus, elle diminue les voies de signalisation impliquant NFκB dans les macrophages (Choi et al., 2011) et diminue la sécrétion de TNF-α par les macrophages activés (Qi et al., 2014). Afin de contenir la réaction immunitaire, TSG-

6 se lie à diverses **chémokines**, ce qui diminue leur disponibilité vis-à-vis des cellules et des molécules de la matrice (Dyer et al., 2016). Par exemple, en se liant à CXCL8, TSG-6 empêche la chémokine de se lier aux glycosaminoglycans (héparan sulfate) se trouvant à la surface des cellules endothéliales et inhibe de ce fait la migration trans-endothéliale des neutrophiles (Getting et al., 2002) (Dyer et al., 2014) (Yang et al., 2021). De plus, la **migration des leucocytes** est également régulée par les interactions HA-CD44, interactions favorisées par la protéine TSG-6 (Lesley et al., 2004).

3.3. Expression tissulaire de la protéine TSG-6

La protéine TSG-6 a été découverte en 1990, produite par des fibroblastes stimulés au TNF- α . Après ce type de traitement, l'expression de TSG-6 était en effet augmentée de 100 fois environ par rapport aux fibroblastes non traités. L'augmentation d'expression rapide (2 à 4h après le traitement), suivie d'une diminution graduelle de celle-ci, a mis en évidence l'action directe du TNF- α sur sa cible (Lee et al., 1990). C'est pourquoi la protéine a été nommée « TNF- α stimulated gene ». Depuis lors, il a été démontré que la protéine TSG-6 est sécrétée par d'autres types cellulaires que les fibroblastes, y compris en réponse à divers stimuli pro-inflammatoires. Malgré l'association de cette protéine avec des processus inflammatoires, elle a également été mise en évidence dans des conditions physiologiques.

3.3.1. Expression de la protéine TSG-6 induite par l'inflammation

TSG-6 semble être une protéine anti-inflammatoire, sécrétée par les cellules en réponse à un stress afin de protéger les tissus des effets délétères de l'inflammation. Elle est également exprimée dans des conditions inflammatoires physiologiques associées à un remodelage de la MEC.

Hors conditions pathologiques, seule la souris *Tnfaip6*^{-/-} femelle montre un phénotype particulier (pour un récapitulatif des phénotypes de la souris TSG-6^{-/-}, voir le Tableau 2). En effet, la souris *Tnfaip6*^{-/-} femelle est stérile. Chez les individus sauvages, la protéine TSG-6 est sécrétée par les cellules de la granulosa et du cumulus oophorus en réponse à des hormones folliculostimulantes et à la prostaglandine E2 (Ochsner et al., 2003). En absence de protéine TSG-6 et par conséquent de son activité enzymatique de translocation des chaînes lourdes de l'ITI sur l'HA, la matrice extracellulaire qui entoure l'ovocyte apparaît désorganisée et déficiente pour l'ovulation (Figure 30) (Fulop et al., 2003). La présence de l'inter- α -trypsine inhibiteur est également requise pour maintenir la fertilité car l'absence de cet inhibiteur impacte également la fertilité des souris (Zhuo et al., 2001).

Système/organe	Challenge/pathologie induite	Phénotype(s) observé(s) de la souris TSG-6 ^{-/-}	Références
Ovocyte	NA	- Matrice entourant le follicule préovulatoire ↓ - Stérilité de la femelle	Fulop et al., 2003
Trachée	Exposition à l'ozone ou à l'HA de bas poids moléculaire pour mimer l'hyperréactivité des voies respiratoires	Résistance à l'hyperréactivité des voies respiratoires	Stober et al., 2017
Poumon	Lésion induite par lipopolysaccharide (LPS)	- Lésion pulmonaire ↑ - Séquestration des neutrophiles ↑ - Mortalité ↑	Mittal et al., 2016
Poumon	Inflammation pulmonaire allergique aiguë	- Éosinophiles des voies respiratoires (typique de l'asthme) ↓ - Résistance à l'hyperréactivité des voies respiratoires - Concentration en HA pulmonaire ↓	Swaiani et al., 2013
Poumon	Lésion aiguë induite par une infection respiratoire (<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ou LPS)	Augmentation légère des cellules inflammatoires	Ni et al., 2018
Cartilage	Arthrite induite (PGIA)	- Progression et sévérité de la maladie ↑ - Infiltration des neutrophiles ↑ - Libération de cytokines inflammatoires (ex: IL-6) ↑ - Dégénération des cartilages, érosion osseuse, ankylose et déformations articulaires	Szanto et al., 2004
Cartilage	Lésion du ligament ménisco-tibial médial	Dégénération du cartilage ↑	Zhu et al., 2020
Os	NA	Masse des os longs ↑	Mahoney et al., 2008
	Conditions inflammatoires (type arthrite)	Érosion de la dentine ↑ car activation des ostéoclastes	
Cerveau	NA	- Nombre d'astrocyte mature ↓ - Pas d'altération phénotype ou morphologique	Coulson-Thomas et al., 2016
Cerveau	Lésion du cortex frontal droit	- Activation des astrocytes ↑ - Infiltration de cellules inflammatoires ↑ - Expression de cytokines inflammatoires ↑	Mutoji et al., 2021
Système circulatoire	Endotoxémie intrapéritonéale induite par LPS = choc endotoxique	Mortalité ↑	Ni et al., 2019
Peau	Blessure	- Retard de cicatrisation - Recrutement des neutrophiles dans la cicatrisation précoce ↓ - Recrutement des neutrophiles dans la cicatrisation tardive ↑	Shakya et al., 2020
Cellules souches de l'épithélium cornéen	Blessure	- Retard de cicatrisation - Inflammation ↑	Gesteira et al., 2017
Cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse	NA	- Changement d'organisation du cytosquelette - Taille des vésicules extracellulaires ↓ - Prolifération et capacité de différenciation ↓	Romano et al., 2019

Tableau 2 : Récapitulatif des phénotypes observés chez la souris TSG-6^{-/-} dans divers organes et en conséquence de diverses pathologies induites

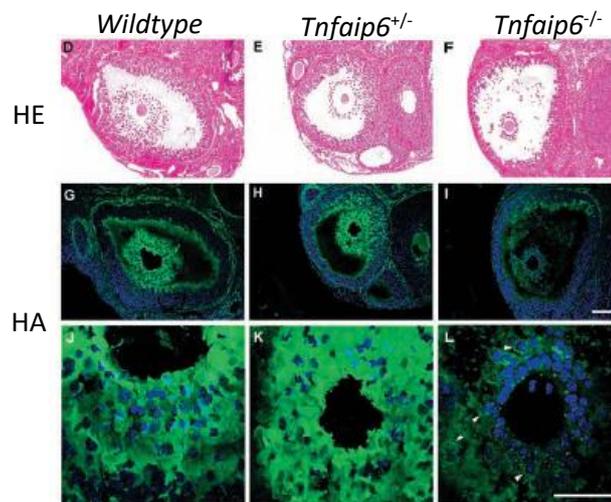


Figure 30 : Morphologie (coloration Hémalum/Eosine) et détection fluorescente de l'HA (vert) au niveau du follicule ovarien (Adapté de Fulop et al., 2003)

En conditions pathologiques, chaque type cellulaire sécrète la protéine TSG-6 en réponse à différentes cytokines pro-inflammatoires et/ou facteurs de croissance. Par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages expriment TSG-6 en réponse au LPS (Maina et al., 2008). Les ostéoclastes répondent à l'IL-1, l'IL-6 et au TNF- α (Mahoney et al., 2011). Dans le poumon, les cellules des glandes de la sous-muqueuse sont stimulées par l'IL-1 et le TNF- α (Forteza et al., 2007). Le Tableau 2 ci-dessous montre une liste non-exhaustive des stimuli provoquant la sécrétion de TSG-6 en fonction du type cellulaire

(Tableau 3) (Milner et Day, 2003). Récemment, il a été démontré, au travers d'une analyse transcriptomique sans a priori (*microarray*), que le traitement d'épidermes humains reconstruits par les interleukines 4, 13 et 25 pendant 48 h induit l'expression des transcrits codant pour la protéine TSG-6 (Hubaux et al., 2018) (Park et al., 2021).

Cell/tissue type	Species	Stimulus	mRNA*	Protein*	Maximal mRNA expression	Onset of mRNA expression	Reference	
Foreskin fibroblast cell line	Human	No treatment	0	0			Lee et al., 1990; Lee et al., 1992; Lee et al., 1993a; Wisniewski et al., 1993	
		TNF	+++	+++	4 hours	1.5 hours		
		IL-1	++++	++++	4 hours			
		TGFβ	+/-	+/-	4 hours			
		PMA	+					
		A23187	+					
		Poly(I).poly(C)	+					
		IL-6	0					
		EGF	0					
PDGF	0							
Cultured gingival fibroblasts	Human	No treatment	++				Han and Amar, 2002	
Skin fibroblast cell line	Human	No treatment	0				Seidita et al., 2000	
		γ-irradiation	0					
		PALA	+++					
PBMCs	Human	No treatment	0				Lee et al., 1992; Lee et al., 1993a; Lee et al., 1993b; Wisniewski et al., 1993	
		TNF	++	++	4 hours			
		LPS	++++	++++				
		IL-1	0	0				
		ConA	++					
		PHA	+++					
THP-1-derived macrophages	Human	No treatment	0			1 hour	Mikita et al., 2001	
		LPS	++++					
Neutrophils	Human	No treatment	0				Fessler et al., 2002; Malcolm et al., 2003	
		LPS		+++				
Cultured immature myeloid dendritic cells	Human	No treatment	0				Le Naour et al., 2001	
		TNF	++++					
Renal proximal tubular epithelial cell line	Human	No treatment	0	0			Janssen et al., 2001	
		IL-1	+++	+++	3 hours			
		D-glucose	+++	+++	48 hours			
Microvascular endothelial cell line	Human	No treatment	0				Coombes and Mahony, 2001	
		<i>Chlamydia pneumoniae</i>	++					
Cultured articular chondrocytes	Human	No treatment	+/-	0			Maier et al., 1996; Margerie et al., 1997	
		TNF	+++	++	>32 hours	2 hours		
		IL-1	+++	+++	16 hours			4 hours
		TGFβ	++	++				
		PDGF-AA	+++					
		IL-6	++					
		FGF	+					
		IL-1+TGFβ	+++++	+++				
		PMA	++++					
		A23187	+++					
Cultured cartilage explants	Human	TNF		+++				
		IL-1		+++				
Cultured articular synoviocytes	Human (RA)	No treatment	++	++			Wisniewski et al., 1993	
		IL-1	++++	+++				
		TNF	++++	+++				
		TGFβ	++	++				
Cultured arterial smooth muscle cells	Human	No treatment	0				Lee et al., 2001	
		Mechanical strain	++++					
Cultured cervical smooth muscle cells	Human	No treatment	0	0			Fujimoto et al., 2002	
		TNF	+++++	+++	6 hours	0.5 hours		
		PGE ₂	+	+	24 hours			6 hours
Vascular smooth muscle cells	Rabbit	Serum	+++++		4 hours		2 hours	
		FGF-1	+++		2-4 hours	n.d.		
		EGF	+++		4 hours	2 hours		
		TGFβ	++		24 hours	6 hours		
		PDGF-BB	+/-		n.d.	n.d.		
		IL-1	+++		4 hours	2 hours		
		TNF	0					
Vascular smooth muscle cells	Rat	Uninjured		0			Ye et al., 1997	
		Injured		++++	2 weeks			
Ovarian cancer cell lines	Human	No treatment	0				Wu et al., 2002	
		p53 transduction	0					
		p21 ^{WAF1/CIP1} transduction	++					
Cumulus oocyte complex	Mouse	hCG-induced ovulation	++++	++++	3 hours	1 hour	Fulop et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 2001; Carrette et al., 2001	
Ovary (cumulus mass and granulosa cells)	Rat	hCG-induced ovulation	++++		4 hours	2 hours	Yoshioka et al., 2000	
Skeletal muscle	Rabbit foetus (25 day gestation)		+++++				Feng and Liau, 1993	
Oesophagus			+++++					
Heart			+					
Lung			+++					
Liver			0					
Kidney			+++++					
Aorta			+					
Brain			0					
Placenta			0					

*Values are consistent within each respective study.

Tableau 3 : Expression de TSG-6 dans différents organes et tissus en réponse à divers stimuli (Milner et Day, 2003)

En tant que protéine anti-inflammatoire, TSG-6 est bénéfique et permet de limiter les effets de l'inflammation dans la plupart des maladies, ainsi que cela est résumé dans le Tableau 4 (Day et Milner, 2019). Cependant il arrive qu'à la place d'avoir une fonction protectrice, la protéine renforce la maladie elle-même dans le contexte d'inflammation chronique, notamment au cours d'une ostéoarthrite. En effet, il a été montré qu'une haute activité de TSG-6 est corrélée avec une progression rapide de la maladie chez des patients atteints d'ostéoarthrite (Wisniewski et al., 2014).

System/indication	^a MSC	^b Protein (route)	Outcome & mechanism/signalling pathway	f
Cardiovascular				
Atherosclerosis	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Stabilised vulnerable plaques, reduced IL-1, IL-6, TNF, ^c CRP Reduced atherosclerotic lesion & inflammation in ApoE ^{-/-} mice; reduced M1 MØ; reduced cholesterol	
Myocardial infarction	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Reduced infarct size, reduced inflammation & PMN infiltration	
Restenosis		rhTSG-6 (i.v.)	Reduced MØ/SMC proliferation, fibrosis & cytokine production; inhibition of p38/JNK signalling	
Eye				
AMD (dry)		rhTSG-6 (i.vit)	Reduced retinal lesions, reduced IL-17A	
AMD (wet)		rhTSG-6 (i.vit)	Reduced CNV, reduced VEGF, CCL2 & CCR2 ⁺ cells (e.g. MØ)	
Corneal allograft rejection	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Graft survival prolonged, reduced inflammation & APC activation	
Corneal wounding		rhTSG-6 (a.c.)	Reduced corneal opacity, vascularization & PMN infiltration; reduced inflammatory cytokines, chemokines & MMPs	
Dry eye		rhTSG-6 (topical)	Reduced epithelial lesions, inflammatory cytokines; in Sjogren's (NOD.B10 mouse) suppressed Th2 immunity	
Gastroenterology				
Colitis	✓	rmTSG-6 (i.p.)	Reduced colitis, reduced inflammation (cytokines, PMN & CD45 ⁺ cells); increased regulatory M2 MØ & regulatory T cells	
Peritonitis	✓ ^{oe}	rhTSG-6 (i.p.)	Reduced inflammation (reduced NF-κB) & TNF production by MØ	
Metabolic				
Acute liver injury	✓ ^{oe}		Improved repair; reduced inflammatory cytokines; reduced fibrosis	
Chronic liver damage		rhTSG-6 (i.p.)	Reduced liver damage; increased autophagy; decreased apoptosis	
Kidney transplant rejection	✓	rhTSG-6 (i.a.)	Prolonged graft survival; reduced rejection; decreased T cells	
Pancreatitis (acute)	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Reduced pathology; reduced inflammation (e.g. IL-1, IL-6, TNF)	
Type-1 diabetes	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Delayed onset; inhibited T cell activation; increased Tregs & tolerogenic APCs	
Musculoskeletal				
Peridontitis	✓ ^{oe}		Reduced bone resorption; reduced inflammation (IL-1, TNF)	
Rheumatoid arthritis		rhTSG-6 (i.v.) rmTSG-6 (i.v.)	Reduced disease incidence, pannus formation & cartilage erosion Reduced oedema, cartilage degradation & bone erosion	
Neurology				
Traumatic brain injury	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Reduced lesion size & BBB leakage; increased memory & new born neurons; reduced PMNs & MMPs Improved neurological recovery; reduced NF-κB	
Respiratory				
Acute lung injury				
Bleomycin	✓	rhTSG-6 (i.p.)	Reduced inflammation, reduced NF-κB	
Blunt trauma	✓		Reduced injury score, reduced inflammatory cytokines & cells	
LPS-induced		rhTSG-6 (tracheal)	Increased survival of TSG-6 ^{-/-} mice; switch of MØ from M1 to M2 suppression of NF-κB	
Wound healing				
Cutaneous (excisional)	✓		Accelerated healing; reduced fibrosis & inflammation (TNF); switch from high to low TGFβ1/TGFβ3 ratio	
Cutaneous (severe burn)	✓	rhTSG-6 (i.v.)	Reduced excessive acute local & systemic inflammation; inhibited p38/JNK signalling	
Diabetic corneal wounds	✓	rhTSG-6 (s.con)	Improved epithelial healing & stimulation of corneal MSCs; reduced inflammation; polarised MØ to M2 phenotype	
Gingival wound	✓	rhTSG-6 (local)	Improved repair; reduced inflammation (cytokines & PMNs)	
Hypertrophic scarring		rhTSG-6 (i.d.)	Reduced inflammation (cytokines & PMNs); reduced collagen synthesis	

Tableau 4 : Effets thérapeutiques de TSG-6 dans diverses maladies (Day et Milner, 2019)

3.3.2. Expression constitutive de la protéine TSG-6

La protéine TSG-6 est exprimée de manière constitutive dans des organes à forte activité métabolique, comme le cerveau et les îlots de Langerhans du pancréas, ainsi qu'au niveau d'organes exerçant une fonction de barrière, tels que la membrane amniotique, les poumons et la peau (Day et Milner, 2019). En cas d'inflammation de ces organes, la sécrétion de TSG-6 est accrue dans la plupart des cas.

Dans le **cerveau**, TSG-6 est exprimée par les astrocytes matures du système nerveux central (SNC) chez l'adulte. Ces cellules sont responsables du maintien de l'homéostasie du système nerveux central où elles représentent un support pour les neurones en stabilisant les synapses, en maintenant la barrière hémato-encéphalique, et en produisant l'équivalent cérébral de la matrice extracellulaire. TSG-6 semble impliquée dans la maturation des astrocytes étant donné que les souris *Tnfrsf10*^{-/-} présentent un nombre réduit d'astrocytes matures, même si aucune altération phénotypique ou morphologique du SNC n'a été remarquée (Coulson-Thomas et al., 2016). Néanmoins, lors d'une lésion cérébrale, l'absence de la protéine TSG-6 se traduit par une inflammation plus sévère (Mutoji et al., 2021). En effet, lors d'une hémorragie cérébrale, la protéine TSG-6 régule l'activité des astrocytes afin de protéger la barrière hémato-encéphalique (Tang et al., 2021). De plus, après une blessure, l'expression cérébrale de TSG-6 est fortement augmentée et participe à la cicatrice gliale en stabilisant la matrice péricellulaire riche en HA (Coulson-Thomas et al., 2016). D'autre part, l'ajout de TSG-6 recombinant permet de restaurer la mémoire de souris après un traumatisme cérébral (Watanabe et al., 2013).

Le pancréas, plus particulièrement les **îlots de Langerhans** présentent une sécrétion de TSG-6 par les cellules α et β . TSG-6 avec l'HA et d'autres molécules matricielles serait impliquée dans la communication cellules-cellules qui existe au sein des îlots (Hull et al., 2012). Même si un lien direct de cause à effet n'a pas été établi, il est à noter qu'une diminution de l'expression de TSG-6 par les cellules endocrines est observée en cas de diabète de type 1 (Bogdani et al., 2014).

Dans la **membrane amniotique**, l'HA est massivement présent et TSG-6 joue un rôle protecteur en diminuant à la fois inflammation, cicatrisation et angiogenèse par l'intermédiaire de l'ITI (He et al., 2009). De plus, les cellules souches de la membrane amniotique sécrètent la protéine TSG-6 qui est capable de diminuer les NET (neutrophils extracellular trap) qui contribuent, lorsqu'ils sont sécrétés de manière excessive, au développement de maladies auto-immunes ou à l'établissement de maladies inflammatoires chroniques (Magana-Guerrero et al., 2017).

L'expression de TSG-6 est également observée dans les **poumons**, et plus particulièrement dans des poumons enflammés comme ceux de fumeurs ou de patients atteints d'asthme, une maladie inflammatoire de type Th2 qui lui donne des similarités avec la dermatite atopique (Forteza et al., 2017). Alors que la plupart des études montrent un effet protecteur de TSG-6 vis-à-vis du

développement d'une inflammation pulmonaire (Danchuk et al., 2011) (Mittal et al., 2016), Stober et al (2017) ont mis en évidence que la présence de TSG-6 dans les poumons rend l'organe plus susceptible aux effets de l'ozone.

Finalement, TSG-6 est présente dans la **peau**, en faible quantité dans le derme et majoritairement dans l'épiderme, à l'inverse de l'HA. Il a été montré que, dans les cicatrices chéloïdes, il existe une diminution d'abondance de la protéine TSG-6 dermique et une désorganisation de l'HA, suggérant qu'ils sont ensemble impliqués dans le processus de cicatrisation (Tan et al., 2011). Dans des cicatrices hypertrophiques de lapin, l'injection de TSG-6 intradermique a permis de diminuer l'inflammation et la synthèse de molécules matricielles de type collagène, permettant *in fine* de réduire le dépôt de ces molécules qui conduisent à la formation de cicatrices hypertrophiques (Wang et al., 2015). La protéine TSG-6 agirait comme inhibiteur de la prolifération des fibroblastes chéloïdes en provoquant leur apoptose (Li et al., 2021). De la même manière, sur un modèle de peau murine, la sécrétion de TSG-6 (par des cellules souches mésenchymateuses) a permis de diminuer la sécrétion de TNF- α par les macrophages activés et a limité la fibrose et l'inflammation, permettant de ce fait une cicatrisation plus rapide (Qi et al., 2014) (Jiang et al., 2020). Récemment, Shakya et al (2020) ont mis en évidence un retard de cicatrisation chez les souris knock-out *Tnfaip6^{-/-}*, accompagné d'une dérégulation du recrutement des neutrophiles qui met en évidence l'importance de TSG-6 dans les processus inflammatoires et les processus de cicatrisation cutanée. Dans les peaux présentant une réaction inflammatoire provoquée en réponse à une brûlure sévère, l'ajout de la protéine TSG-6 a permis de réduire l'inflammation en réduisant l'activation des voies de signalisation des MAP kinases p38 et JNK impliquées dans ce type de réaction inflammatoire (Liu et al., 2016). Chez les personnes âgées, l'expression de TSG-6 apparaît diminuée, ainsi que la production d'HA. Une telle situation induit une diminution de l'expression du TGF- β et une réduction de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui entraîne par conséquent des problèmes de cicatrisation (Simpson et al., 2009). Il est aussi à noter qu'au cours de maladies inflammatoires de la peau, une surexpression de l'ITIH5 a été rapportée (Huth et al., 2020). Les HC5 permettent de condenser l'HA et de stabiliser la MEC, tout en jouant un rôle de protection contre les ROS, ce qui évite ainsi la dégradation de l'HA (Huth et al., 2020). Finalement, dans un modèle *in vitro* d'épiderme humain infecté par *Trichophyton rubrum*, il a été mis en évidence par notre équipe de recherche qu'une sécrétion massive de TSG-6 simultanée à l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires apparaît quatre jours après l'infection (Faway et al., 2019). De façon similaire, le traitement d'épidermes humains reconstruits par des interleukines pro-inflammatoires (IL-4, IL-13, IL-25) mimant la dermatite atopique provoque l'expression de TSG-6 (Tableau 5) (Park et al., 2021).

Th2-Induced RHE vs. RHE

Genes	Fold Change	p Value	Genes	Fold Change	p Value
ABCA1	0.33	0.0035	AHR	1.67	0.0118
CASP14	0.49	0.0177	CA2	6.38	0.0002
CCL26	0.43	0.0378	CAPN14	134.80	0.0000
CDHR1	0.33	0.0001	CCL2/MCP1	3.86	0.0062
CERS3	0.59	0.0126	CCL27	2.49	0.0141
CLDN8	0.24	0.0003	CCL5/RANTES	5.02	0.0018
CNR1	0.51	0.0346	CH25H	4.34	0.0043
CXCL10	0.23	0.0061	CTSC	4.50	0.0023
DGAT2	0.52	0.0081	DUOX1	2.39	0.0279
EDN1	0.39	0.007	FZD10	7.23	0.0062
FA2H	0.23	0.0162	IL13RA2	8.07	0.0012
FASN	0.66	0.0498	IL2R	14.60	0.001
FLG	0.53	0.0321	NELL2	3.99	0.0112
LCE4A	0.58	0.0283	POSTN	8.60	0.0013
LPIN1	0.54	0.0454	TNC	13.13	0.0034
OCLN	0.68	0.0477	TNFAIP6	465.19	0.0086
SEMA3A	0.51	0.0336			
SULT1E1	0.46	0.0431			
TAC1	0.51	0.014			
TRPV1	0.38	0.0195			

Tableau 5 : Liste des gènes significativement dérégulés (vert) et régulés positivement (rouge) dans une analyse *MicroArray* d'épidermes reconstruits traités aux interleukines 4, 13 et 25 par rapport aux épidermes non traités (Park et al., 2021)

3.3.3. Interaction HA-TSG-6 en contexte inflammatoire

La protéine TSG-6 intervient dans des maladies inflammatoires pour réguler et diminuer l'inflammation. Il a en effet été montré que l'ajout de la protéine TSG-6 recombinante ou de cellules souches mésenchymateuses sécrétant du TSG-6 permet de diminuer les effets délétères typiques de la maladie, par exemple en cas d'infarctus du myocarde (Lee et al., 2009), de cicatrisation cutanée (Wang et al., 2015) ou d'arthrite (Bardos et al., 2001). La protéine TSG-6 est d'ailleurs utilisée comme marqueur précoce de l'arthrite.

Dans un contexte inflammatoire, TSG-6 est sécrétée massivement, la production d'HA augmente et l'expression de CD44 se trouve également augmentée (Barnes et al., 2012) (Day et Milner, 2019). TSG-6, en se liant aux polymères d'HA, provoque leur réticulation soit par liaison directe HA-TSG-6, soit par la formation de complexes HC-HA médiée par les propriétés enzymatiques de TSG-6. La réticulation de l'HA stabilise les polymères de manière collapsée (Baranova et al., 2011). Cette organisation matricielle est essentielle pour certains processus, par exemple lors de l'ovulation et dès lors par extension pour maintenir la fertilité (Fulop et al., 2003). Elle semble également importante pour obtenir une bonne cicatrisation cutanée (Qi et al., 2014) (Shakya et al., 2020). De plus, cette matrice collapsée rapproche physiquement les molécules d'HA de leur récepteur CD44 membranaire (Baranova et al., 2011 et 2013) et la réticulation de l'HA induit l'activation de CD44 par regroupement des récepteurs (Wright et Day, 2005). La formation d'un réseau péri-cellulaire de surface forme une sorte de barrière de protection qui empêche la dégradation de la matrice et qui agit comme un échafaudage transitoire favorisant la

régénération de la matrice (Day et al., 2005). D'une part, la formation d'une matrice dense en HA par les chaînes lourdes de l'ITI protège l'HA de la fragmentation provoquée par les ROS (Fries et al., 2003) (Huth et al., 2020), parallèlement à l'inhibition de l'activité des métalloprotéases matricielles (responsables de la digestion des molécules de la MEC, notamment lors de la cicatrisation) exercée par TSG-6 (Watanabe et al., 2013). D'autre part, la matrice transitoire d'HA péri-cellulaire change d'organisation suite à la libération de cytokines pro-inflammatoires et forme des « câbles » d'HA liés d'une part aux cellules par CD44 et réticulés d'autre part par la protéine TSG-6 (Jokela et al., 2008).

Les leucocytes exhibent une forte affinité pour ces câbles d'HA (Jokela et al., 2008). Lors d'un processus inflammatoire, le recrutement des leucocytes est un point-clé de l'inflammation et de la réparation tissulaire. Ces cellules traversent en effet la paroi endothéliale pour rejoindre le site enflammé, suite à leur attraction par des chémokines. Cependant, la migration de ces cellules doit rester régulée afin d'éviter une extravasation trop importante des cellules immunitaires qui pourrait *in fine* provoquer des lésions tissulaires (Wang, 2018). La matrice extracellulaire riche en HA et TSG-6 apparaît impliquée dans la régulation du recrutement et l'infiltration des leucocytes. Elle est, tantôt pro-extravasation, tantôt anti-extravasation.

Certaines études ont montré que la matrice composée de chaînes d'HA liées à CD44 facilite le recrutement des cellules inflammatoires en favorisant le roulement des leucocytes à travers l'endothélium pour rejoindre le site enflammé (Lesley et al., 2004) (Zhuo et al., 2006). A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence que, les leucocytes ayant une forte affinité pour la matrice, ces cellules s'y retrouvent « séquestrées », ce qui les empêche d'activer leurs récepteurs et d'induire une réaction inflammatoire plus forte, prévenant ainsi les dommages éventuellement causés aux tissus concernés (Getting et al., 2002) (Cao et al., 2004) (Abadi et al., 2016). Il a d'ailleurs été mis en évidence qu'en absence de TSG-6, l'infiltration des neutrophiles est exacerbée (Szanto et al., 2004), mettant en avant cet effet inhibiteur de la matrice sur la migration des neutrophiles. De manière intéressante, lors de la cicatrisation de la peau de souris *Tsg-6^{-/-}*, les neutrophiles présentent une cinétique de recrutement déficiente (Shakya et al., 2020). En effet, au cours des premières heures qui suivent la blessure, les neutrophiles migrent en moins grand nombre vers le site de lésion que chez les souris capables d'exprimer la protéine TSG-6, probablement à cause de l'absence des complexes HC-HA à la surface des cellules endothéliales des souris mutantes. Inversement, dans les stades plus tardifs de la cicatrisation, les neutrophiles se retrouvent en plus grand nombre que chez les souris sauvages. Une explication serait que les neutrophiles sont massivement attirés par les cytokines pro-inflammatoires sans être « séquestrés » dans la matrice d'HA. De plus, les câbles d'HA séquestrent également des médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Dyer et al., 2014 et 2016). Chez la souris *Tsg-6^{-/-}*, ce chimio-attractant se retrouve libre et induit donc le recrutement des neutrophiles (Shakya et al., 2020).

Ajoutons encore que dans la peau, la protéine TSG-6 régule également l'activité des macrophages et leur sécrétion de TNF- α pour diminuer la réaction inflammatoire (Qi et al., 2014). Enfin, il a également été montré que TSG-6 diminue la production de TNF- α par les cellules de la peau (fibroblastes et kératinocytes), alors que c'est le TNF- α lui-même qui induit l'expression de TSG-6 selon l'identification initiale de cette protéine. Shakya et al. (2020), suggèrent dès lors qu'il pourrait exister une boucle de rétroaction entre TSG-6 et le TNF- α .

OBJECTIFS

L'hyaluronan (HA) a été l'objet de nombreuses études durant les trois dernières décennies, plus spécifiquement pour le rôle joué par ce glycosaminoglycan dans la matrice extracellulaire de l'épiderme. Les rôles potentiels de l'HA au cours des processus de prolifération et de différenciation des kératinocytes épidermiques et ses implications particulières dans l'établissement, le maintien, et la réparation de la barrière épidermique humaine ont suscité l'intérêt des chercheurs dans les domaines de la dermatologie et de la cosmétologie. Pourtant, les rôles attribués à l'HA pour réguler prolifération et différenciation des kératinocytes restent encore controversés (Malaisse et al., 2016). L'étude du métabolisme de l'HA dans l'épiderme a mis en évidence que l'HA épidermique est majoritairement synthétisé par les enzymes HAS1 et HAS3, respectivement en conditions saines et en conditions inflammatoires (Malaisse et al., 2014).

C'est dans ce contexte initié par la recherche de Jérémy Malaisse dans notre laboratoire que nous nous sommes intéressés dans un premier temps à **la dégradation de l'HA épidermique**, plus particulièrement à la localisation et l'activité de l'enzyme HYAL1 au sein de l'épiderme. Ensuite, la mise en évidence de la protéine TSG-6, un partenaire de l'HA connu comme étant sécrété en conditions inflammatoires, dans l'épiderme humain sain (Tan et al., 2011) et la surexpression de cette protéine dans un modèle d'épiderme humain mimant la dermatite atopique (Park et al., 2021) ont orienté nos investigations sur une autre caractéristique de l'HA : ses interactions avec les hyaladhérines et plus particulièrement **la protéine TSG-6** codée par le gène *TNFAIP6*.

Pour étudier ces questions, nous avons utilisé un modèle de reconstruction d'épiderme humain (RHE) en 3D (Frankart et al., 2012a). L'utilisation de RHE apporte les avantages de l'utilisation de cellules *in vitro*, tout en conservant un modèle le plus proche possible de *in vivo*. En effet, par rapport au modèle de culture de kératinocytes en monocouche (Minner et al., 2010), le modèle de RHE permet de recréer les différentes couches de l'épiderme, de la couche basale à la couche cornée, à partir de kératinocytes qui s'organisent pour se trouver simultanément à des stades de différenciation différents, impliquant des caractéristiques biochimiques et morphologiques différentes. Cependant, ce modèle présente certaines limitations. Notamment, la présence d'un seul type cellulaire (les kératinocytes) empêche d'étudier les potentielles interactions existantes entre les kératinocytes et les autres cellules épidermiques, les cellules immunitaires, ou même les fibroblastes du compartiment dermique, normalement sous-jacent à l'épiderme. Cette absence de fibroblastes limite d'ailleurs la formation d'une lame basale complète étant donné que celle-ci est formée par l'interaction conjointe du tissu épithélial et du tissu conjonctif ; cette lame basale incomplète et ses conséquences sera discutée en particulier au point 2.1. de la section « Discussion ». Néanmoins, l'absence de compartiment dermique (présent dans les peaux *in vivo* et dans les épidermes reconstruits sur équivalent dermique) rend plus

facile l'étude de la sécrétion de protéines, lesquelles diffusent dans le milieu de culture sous-jacent au RHE.

Afin de comprendre le rôle de la protéine TSG-6 dans le tissu épidermique, aussi bien en conditions physiologiques qu'en conditions inflammatoires, mais aussi pour apporter simultanément des connaissances nouvelles sur les rôles de l'HA dans la MEC de l'épiderme humain, nous avons généré des épidermes déficients pour la protéine TSG-6. Dans ce but, une lignée de kératinocytes humains immortalisés, nommés kératinocytes N/TERT, a été manipulée pour éditer son ADN via la technique CRISPR/Cas9 et déléter ainsi le gène *TNFAIP6* qui code pour la protéine TSG-6. D'autre part, les modèles disponibles dans notre laboratoire pour modéliser la dermatite atopique ou les dermatophytoses au niveau d'épidermes humains reconstruits en culture ont été modifiés et adaptés aux kératinocytes N/TERT. Ces conditions expérimentales nous ont permis d'analyser et de contribuer à identifier les fonctions liées à la protéine TSG-6 quand des conditions inflammatoires sont imposées à un épiderme.

Sur base du matériel biologique disponible et développé pour cette étude :

Notre premier objectif a été de **caractériser l'expression et la sécrétion de la protéine TSG-6 dans des épidermes normaux et de les comparer aux observations réalisées avec des épidermes exposés à des conditions inflammatoires**. Deux modèles très différents ont été utilisés pour créer ces conditions particulières. D'une part, des épidermes reconstruits ont été incubés avec les interleukines 4 et 13 afin de mimer l'exposition de l'épiderme aux cytokines de type Th2 qui altèrent la barrière épidermique au cours de la dermatite atopique (modèle développé par De Vuyst et al., 2016 et Do Nascimento Pedrosa et al., 2017). D'autre part, des épidermes reconstruits ont été infectés par des arthrospores de dermatophytes (*Trichophyton rubrum*), lesquels provoquent une réponse des kératinocytes qui dans ces conditions produisent et sécrètent des cytokines telles que le TNF α , ainsi que des peptides antimicrobiens (modèle développé par Faway et al., 2017).

Notre deuxième objectif a été d'analyser **le rôle de la protéine TSG-6 épidermique** en comparant les caractéristiques des épidermes déficients pour cette protéine, exposés ou non à des conditions inflammatoires, avec les épidermes normaux capables d'exprimer TSG-6.

Nos observations ont montré que la protéine TSG-6 est exprimée et sécrétée à un faible niveau dans les épidermes étudiés en conditions physiologiques et que des conditions inflammatoires entraîne une surexpression de TSG-6. Simultanément, notre étude a observé que cette hyaladhérine participe au maintien de l'HA dans la MEC des épidermes sains et que ce rôle est d'autant plus important dans les épidermes exposés à un stress.

RESULTATS

PARTIE 1 : Implication de la hyaluronidase 1 dans la dégradation de l'HA épidermique

Dans le contexte de l'étude de la régulation du métabolisme de l'acide hyaluronique dans l'épiderme, il a été mis en évidence que la HAS1 est l'enzyme de synthèse majoritairement exprimée quand on compare son niveau d'expression avec ceux des HAS2 et HAS3 dans les épidermes sains. Dans des conditions inflammatoires, notamment dans les peaux lésionnelles de dermatite atopique, une redistribution des niveaux d'expression des HAS est observée. La HAS3 est alors surexprimée alors que le niveau d'expression de la HAS1 est diminué (Malaisse et al., 2014). L'HA ayant comme caractéristique une vitesse de renouvellement rapide dans l'épiderme (environ 1 jour), l'enzyme de dégradation HYAL1 a également été étudiée pour comprendre la physiologie de l'HA dans l'épiderme. C'est ainsi que la couche épidermique au niveau de laquelle l'enzyme est présente et spécifiquement active a été mise en évidence. Ces observations ont été publiées, en 2015, dans une lettre à l'éditeur portant le titre « **Hyaluronidase-1 is mainly functional in the upper granular layer, close to the epidermal barrier** » (J. Malaisse, C. Evrard, D. Feret, V. Colombaro, S. Dogné, M. Haftek, C. Lambert de Rouvroit, B. Flamion et Y. Poumay). Dans ce travail, ma contribution personnelle a été l'analyse de la distribution de l'HA et de HYAL1 au niveau des RHE, la détection par Western blot et la zymographie de HYAL1 extrait des RHE, ainsi que l'analyse de la souris *Hyal1^{-/-}*, c'est-à-dire le dosage de l'HA dans la couche cornée, l'étude de la distribution des marqueurs de différenciation, l'étude de la barrière épidermique (pH, TEER, perméabilité au bleu de toluidine) et l'analyse de l'expression relative en ARNm des Hyal et β -hexosaminidases.

Brièvement, il a été montré, dans un modèle d'épidermes humains reconstruits *in vitro*, que l'abondance et l'activité de l'enzyme HYAL1 sont relativement stables durant le processus de reconstruction et donc par extension lors de la différenciation épidermique, cette enzyme se trouvant plus précisément localisée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. Quant à l'HA présent dans les espaces intercellulaires du tissu, il est principalement détecté autour des kératinocytes qui constituent les couches basale et épineuse, excluant toute possibilité de colocalisation entre l'HA et HYAL1. Cette localisation très précise de HYAL1 a été confirmée *in vivo*, en analysant des biopsies de peaux humaines normales.

Parallèlement, alors que leur peau présente une localisation normale des marqueurs de différenciation épidermique, l'étude des peaux de souris *knockout* (KO) pour *Hyal1* a mis en évidence une accumulation d'HA de haut poids moléculaire ($> 1 \times 10^5$ Da) dans les cornéocytes, alors que la détection du HA au niveau de la couche cornée des souris sauvages est restée impossible.

Ces approches, réalisées *in vitro* chez l'humain et *in vivo*, suggèrent que l'HYAL1 épidermique dégrade l'HA en petits fragments de bas poids moléculaire ($< 6 \times 10^4$ Da) durant la différenciation des kératinocytes au niveau de la couche granuleuse. Ces fragments d'HA contribueraient alors à l'hydratation de la couche cornée, au même titre que les facteurs d'hydratation naturel (NMF).

effects, which may not be evident in short-term management. Switching from second-line therapies to third-line treatments and not to systemic corticosteroids may prove to be more economic, decreasing health-care services utilization.

In conclusion, our observations suggests that the use of third-line therapies should be augmented at the outset of antihistamine treatment failure among patients with CU in the community setting. The use of safer and more efficient drugs after antihistamine treatment failure is warranted in patients with CU.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr Katie Palmer, PhD, who has supported us in reviewing the epidemiological aspects of the article.

Author contributions

GS, DC, and ADC had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: GS, ADC, and NA-L. Acquisition, analysis, and interpretation of data: GS, ADC, NA-L, and DC. Drafting of the manuscript: GS, ADC, NA-L, and DL. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: GS, DL, ADC, NA-L, HB, and AN. Statistical analysis: DC, ADC, and GS. Obtained funding: ADC. Administrative, technical, or material support: GS, ADC, NA-L, HM, AN, and DC. Study supervision: ADC and NA-L.

**Guy Shalom^{1,2,3}, Dennis Linder^{4,5},
Doron Comaneshter³,
Alexandra Nathan⁶, Haim Bitterman^{6,7},
Nancy Agmon-Levin^{6,8,10} and
Arnon D. Cohen^{3,9,10}**

¹Department of Dermatology and Venereology, Soroka Medical Center, Beer-Sheva, Israel;

²Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel;

³Department of Quality Measurements and Research, Chief Physician's Office, Clalit Health Services, Tel Aviv, Israel; ⁴Section of Biostatistics, University of Oslo, Oslo, Norway;

⁵Medical University of Graz, Graz, Austria;

⁶Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; ⁷Chief Physician's Office, Clalit Health Services, Tel Aviv, Israel;

⁸The Zabudowicz Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Tel Aviv, Israel and ⁹Division of Community Health, Sial Research Center for Family Medicine and Primary Care, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

E-mail: Guyshallom1234@Hotmail.com

¹⁰These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

Bernstein JA, Lang DM, Khan DA et al. (2014) The diagnosis and management of acute and chronic urticaria: 2014 update. *J Allergy Clin Immunol* 133:1270–7

Di Lorenzo G, D'Alcamo A, Rizzo M et al. (2008) Leukotriene receptor antagonists in monotherapy or in combination with antihistamines in the treatment of chronic urticaria: a systematic review. *J Asthma Allergy* 2:9–16

Grattan CEH, Francis DM, Barlow RJ et al. (1992) Plasmapheresis for severe, unremitting, chronic urticaria. *Lancet* 339: 1078–80

Grattan CEH, O'Donnell BF, Francis DM et al. (2000) Randomized double-blind study of cyclosporine in chronic "idiopathic" urticaria. *Br J Dermatol* 143:365–72

Jiang X, Lu M, Ying Y et al. (2008) A case report of double-filtration plasmapheresis for the resolution of refractory chronic urticaria. *Ther Apher Dial* 12:505–8

Makris M, Maurer M, Zuberbier T (2013) Pharmacotherapy of chronic spontaneous urticaria. *Expert Opin Pharmacother* 14: 2511–9

Mitzel-Kaoukhov H, Staubach P, Müller-Brenne T (2010) Effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment in therapy-resistant chronic spontaneous urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 104:253–258

Orden RA, Timble H, Saini SS (2014) Efficacy and safety of sulfasalazine in patients with chronic idiopathic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 112:64–70

Perez A, Woods A, Grattan CE (2010) Methotrexate: a useful steroid-sparing agent in recalcitrant chronic urticaria. *Br J Dermatol* 162:191–4

Pho LN, Eliason MJ, Regruto M et al. (2011) Treatment of chronic urticaria with colchicine. *J Drugs Dermatol* 10:1423–8

Zuberbier T (2012) Chronic urticaria. *Curr Allergy Asthma Rep* 12:267–72

Zuberbier T, Aberer W, Asero R et al. (2014) The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. *Allergy* 69:e1–29

Hyaluronidase-1 Is Mainly Functional in the Upper Granular Layer, Close to the Epidermal Barrier

Journal of Investigative Dermatology (2015) 135, 3189–3192; doi:10.1038/jid.2015.299; published online 20 August 2015

TO THE EDITOR

Hyaluronan (HA), a major component of the extracellular matrix, is a polysaccharide of high molecular mass (10^5 – 10^7 Da). Half of HA in human body is found in skin, mostly in dermis (Meyer and Stern, 1994). In epidermis, HA mainly localizes to basal and spinous layers (Tuhkanen et al., 1998), whereas a low amount of

smaller-size ($<6 \times 10^4$ Da) HA is found in stratum corneum (Sakai et al., 2000). HA has variously been reported to regulate keratinocyte proliferation, differentiation, and migration (Maytin et al., 2004; Passi et al., 2004; Farwick et al., 2011). Yet, its actual functions in epidermis remain unclear. HA is synthesized at the plasma membrane by three different synthases

called hyaluronan synthases 1–3 (HAS1, HAS2, and HAS3). During spontaneous differentiation of keratinocytes, HA of high molecular mass accumulates simultaneously with increased HAS1 and decreased HAS2/3 expressions (Malaise et al., 2014). Under physiological conditions, HA catabolism is mainly because of hyaluronidases (HYALs). Only three out of the six *HYAL* genes in the human genome encode an active enzyme: PH20 in the sperm, and HYAL1 and HYAL2 in somatic tissues. In somatic tissues HYAL1 is by far the most active enzyme, whereas

Abbreviations: HA, hyaluronan; HAS, hyaluronan synthase; HYAL, hyaluronidase; RHE, reconstructed human epidermis; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative PCR; TEER, transepithelial electric resistance; WT, wild type

Accepted article preview online 27 July 2015; published online 20 August 2015

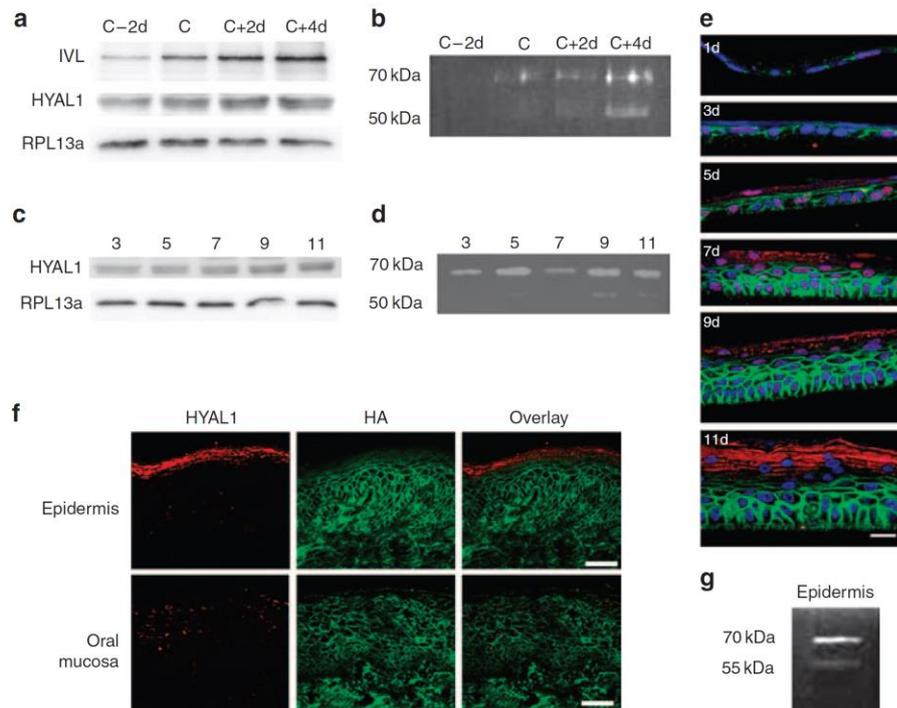


Figure 1. Hyaluronidase-1 (HYAL1) abundance, activity, and distribution in monolayers of cultured human keratinocytes, in reconstructed human epidermis (RHE) and in human epidermis. (a and b) Proteins were extracted every 48 hours, starting 2 days before confluence (C–2d) of keratinocyte monolayers, until 4 days after confluence (C+4d). (a) HYAL1 abundance detected using western blots. RPL13a was used as loading control and involucrin (IVL) as a control of epidermal differentiation. (b) HYAL1 activity revealed using zymography. Brighter stripes correspond to HYAL1 enzymatic activities. (c and d) Proteins were extracted from RHE on days 3, 5, 7, 9, and 11. Day 1 corresponds to exposure of RHE to air–liquid interface. (c) HYAL1 protein detected by western blot analysis. RPL13a is used as loading control. (d) Brighter stripes correspond to enzymatic activities of HYAL1 detected by zymography. (e) RHEs were processed for histology and fluorescent detection of HA (green), HYAL1 (red), and nuclei (blue). Scale bar = 25 μ m. (f) Human skin and oral mucosa were fixed, processed for histology, and stained for HYAL1 (red) and HA (green). Scale bars = 50 μ m. (g) HYAL1 activity detected in total protein extract from normal human epidermis using zymography.

the *HYAL2* gene product displays a very faint activity (Vigdorovich *et al.*, 2005). This study aimed at characterizing the distribution and role of HYALS in epidermis.

For studies with cultured cells, normal abdominal keratinocytes were obtained from abdominoplasties of patients after written informed consent, with the approval of the Medical Ethics Committee of Clinic St Luc and in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. Using human keratinocyte monolayers we found HYAL1 becomes more abundant and active upon confluence, concurrently with epidermal differentiation (Supplementary Figure S1 online). Although *HYAL2* mRNA is expressed in human keratinocytes (Mattiuzzo *et al.*, 2011; Malaise *et al.*, 2014), the encoded

protein could not reliably be assessed because of a lack of efficient specific antibodies. However, parallel increases in HYAL1 protein abundance and hyaluronidase activity suggests a minor role, if any, for HYAL2.

We then turned to reconstructed human epidermis (RHE), a more reliable 3D model to study epidermal morphogenesis *in vitro*. We found that HYAL1 expression and activity remain relatively stable during RHE growth but HYAL1 localization (immunofluorescence) becomes progressively condensed in the granular layer (Figure 1a–e). Simultaneously, HA is increasingly detected between keratinocytes of basal and spinous layers (Malaise *et al.*, 2014). Interestingly, HYAL1 and HA never colocalize and HA cannot be detected in granular and cornified

layers because of HYAL1-dependent HA degradation.

Histological sections of healthy human skin confirm HYAL1 signal is prominent in the granular layer, whereas HA mostly surrounds basal and spinous keratinocytes (Figure 1e). HYAL1 cannot be detected in oral mucosal epithelium (Figure 1f) that lacks a granular layer (Presland and Jurevic, 2002). HYAL1 activity is also clearly demonstrated using zymographic analysis of human epidermis extracts (Figure 1g). Together, these results suggest specific overexpression of active HYAL1 enzyme once keratinocytes become part of the granular layer.

In macrophages and liver extracts, the processed forms of HYAL1 are localized in lysosomes (Boonen *et al.*, 2014; Puissant *et al.*, 2014). In accordance,

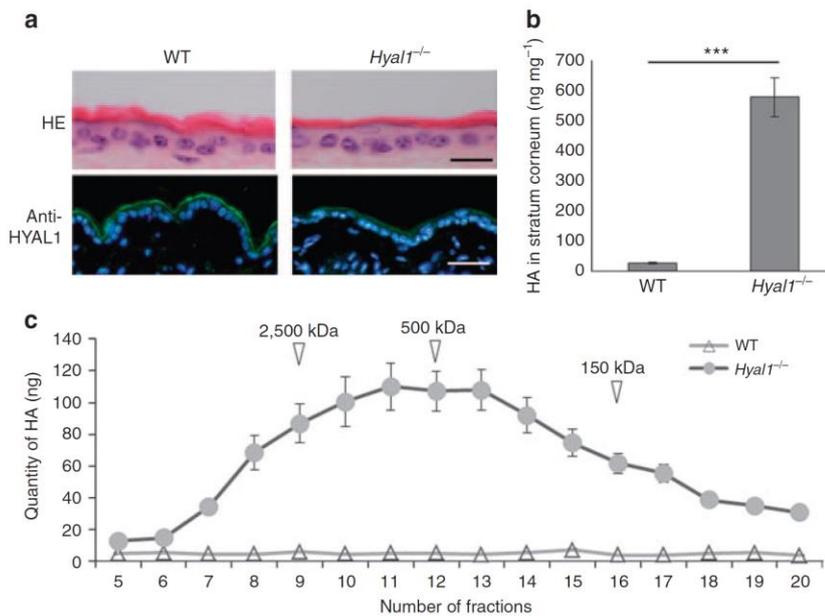


Figure 2. Skin histology, and hyaluronan (HA) concentration and size distribution in *Hyal1*^{-/-} versus wild-type (WT) mice. (a) Skin biopsies were processed for histology, stained using hemalun/erythrosine (HE), or labeled for hyaluronidase-1 (HYAL1; green) and nuclei (blue). Bar=20 μm. (b) HA content in stratum corneum of WT and *Hyal1*^{-/-} mice was measured and normalized to weight of stratum corneum ($n=10$, mean ± SEM, Mann–Whitney Test, *** $P<0.001$). (c) Each HA sample was compared on Sephacryl S-1000 column with 2500, 500, and 150 kDa HA fragments. The amount of HA measured in each fraction is represented by mean ± SEM ($n=10$, two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$). Fractions containing maximal detection of reference fragments are indicated (∇).

our data confirm colocalization between HYAL1 and lysosomal proteins cathepsins B and D inside granular keratinocytes (Supplementary Figure S2 online). This suggests that HA has to be internalized in order to reach HYAL1 for degradation.

To investigate the role of HYAL1 in HA processing in the skin, we took advantage of HYAL1-deficient (*Hyal1*^{-/-}) mice. These animals are viable and fertile with no gross anomalies (Martin *et al.*, 2008). Skin histology, epidermal stratification, and distribution of differentiation markers indeed appear normal in *Hyal1*^{-/-} mice (Figure 2a and Supplementary Figure S3 online). However, we found that large-size (0.3–3.0 × 10⁶ Da) HA accumulates in their stratum corneum, in clear distinction to wild-type (WT) mice (Figure 2b and c). Together, these data strongly suggest that epidermal HYAL1 degrades HA into smaller fragments during the differentiation and migration pro-

cesses of keratinocytes through the granular layer.

Enhanced impermeability of the epidermis mainly relies on its hydrophobic components (Bouwstra *et al.*, 2000) as well as on tight junctions. Nevertheless, generation of hydrophilic HA fragments in the upper layer of the epidermis is believed to contribute to outside-in hydration (Sakai *et al.*, 2000). However, we found that outside-in permeability, superficial pH, and transepithelial electric resistance (TEER) are unaffected in *Hyal1*^{-/-} mice compared with WT animals despite large differences in the size of superficial epidermal HA (Supplementary Figure S4 online). Other enzymes such as β-hexosaminidase could compensate for the deficiency in HA degradation (Gushulak *et al.*, 2012), although the relative gene expressions of HYAL2, HYAL3, and subunits of β-hexosaminidases A and B, measured using reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), are similar

in WT and *Hyal1*^{-/-} mice (Supplementary Figure S5 online).

What is the importance of these new observations? A classical model for HA degradation is first proposed in cultures of rat keratinocyte monolayers (Tammi *et al.*, 2001). These authors showed HA turnover involves endocytosis of ~25% of newly synthesized HA, suggesting a balance between HA synthesis and degradation is important in epidermal keratinocyte homeostasis. Our results in human and mouse keratinocytes suggest the bulk of HA degradation, which is dependent on the presence of active HYAL1, takes place mostly in the granular layer where keratinocytes lose intra- and pericellular HA as they are pushed upward in the tissue. The high level of active HYAL1 restricted to stratum granulosum suggests this lysosomal enzyme is a gate-keeper preventing high-molecular-mass HA from slipping into the corneal layer. HYAL1 thereby generates HA fragments in stratum corneum. The role of these fragments in the uppermost layer of the skin remains to be explored.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B Balau, V De Glas, K De Swert, and D Vlan Vlaender for expert technical assistance. Financial support was provided by FRFC 2.4522.10F and FNRS 1.5.003.06F to YP.

Jérémy Malaisse¹, Céline Evrard¹, Damien Feret¹, Vanessa Colombaro¹, Sophie Dogné¹, Marek Haftek², Catherine Lambert de Rouvroit¹, Bruno Flamion¹ and Yves Poumay¹

¹URPHYM, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, Namur, Belgium and ²University of Lyon, EA4169 Laboratoire de Recherche Dermatologique, Lyon, France
E-mail: yves.poumay@unamur.be

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

Boonen M, Puissant E, Gilis F *et al.* (2014) Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1. *Biochem Biophys Res Commun* 446:1155–60

- Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS et al. (2000) The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl* 208:23–30
- Farwick M, Gauglitz G, Pavicic T et al. (2011) Fifty-kDa hyaluronic acid upregulates some epidermal genes without changing TNF-alpha expression in reconstituted epidermis. *Skin Pharmacol Physiol* 24:210–7
- Gushulak L, Hemming R, Martin D et al. (2012) Hyaluronidase 1 and beta-hexosaminidase have redundant functions in hyaluronan and chondroitin sulfate degradation. *J Biol Chem* 287:16689–97
- Malaise J, Bourguignon V, De Vuyst E et al. (2014) Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol* 134:2174–82
- Martin DC, Atmuri V, Hemming RJ et al. (2008) A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. *Hum Mol Gen* 17:1904–15
- Mattuzzo NR, Toulza E, Jonca N et al. (2011) A large-scale multi-technique approach identifies forty-nine new players of keratinocyte terminal differentiation in human epidermis. *Exp Dermat* 20:113–8
- Maytin EV, Chung HH, Seetharaman VM (2004) Hyaluronan participates in the epidermal response to disruption of the permeability barrier in vivo. *Am J Pathol* 165:1331–41
- Meyer LJ, Stern R (1994) Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol* 102:385–9
- Passi A, Sadeghi P, Kawamura H et al. (2004) Hyaluronan suppresses epidermal differentiation in organotypic cultures of rat keratinocytes. *Exp Cell Res* 296:123–34
- Presland RB, Jurevic RJ (2002) Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ* 66:564–74
- Puissant E, Gilis F, Dogne S et al. (2014) Sub-cellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages. *Traffic* 15:500–15
- Sakai S, Yasuda R, Sayo T et al. (2000) Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol* 114:1184–7
- Tammi R, Rilla K, Pienimäki JP et al. (2001) Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem* 276:35111–22
- Tuhkanen AL, Tammi M, Pelttari A et al. (1998) Ultrastructural analysis of human epidermal CD44 reveals preferential distribution on plasma membrane domains facing the hyaluronan-rich matrix pouches. *J Histochem Cytochem* 46:241–8
- Vigdorovich V, Strong RK, Miller AD (2005) Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2. *J Virol* 79:79–86

SASH1 Is Involved in an Autosomal Dominant Lentiginous Phenotype

Journal of Investigative Dermatology (2015) 135, 3192–3194; doi:10.1038/jid.2015.292; published online 13 August 2015

TO THE EDITOR

Skin pigmentation disorders are among the most recognizable human diseases, strongly impacting both health and quality of life. Lentigines are small, hyperpigmented skin macules, histologically containing increased numbers of melanocytes, typically producing elevated amounts of melanin. Most lentigines are caused by UV radiation and appear with increasing age. However, lentigines can also be inherited in an autosomal dominant pattern; in these cases, lentigines typically appear in childhood (see review Bauer and Stratakis, 2005). We previously reported autosomal dominant inheritance of a unique lentiginous pigmentation disorder (Pacheco et al., 2002, 2004). Here, we report identification of a variant associated with this lentiginous phenotype in the *SASH1* gene, with additional histological analysis of the patients' skin. All blood samples, biopsies, photographs, and information from subjects obtained after written informed patient consent were approved

by the relevant institutional review boards (including permission to publish images).

Our previous linkage analysis of this family mapped the disease locus to a 10-Mb interval between 6q24.2-q25.2 (Pacheco et al., 2002, 2004). Linkage analyses of two Chinese families also mapped a similar pigmentation disorder to the same region (Xing et al., 2003). The overlapping linkage interval of these three families is flanked by markers D6S1703 and D6S441.

In the current family, candidate genes within the linkage interval were screened for mutations, including all exons, 100 bp of introns, and 2 kb of the flanking promoter region. DNA sequence analysis of 17 affected and 18 unaffected family members identified a heterozygous missense substitution in *SASH1*, in exon 13, c.1556 G->A, p. S519N (Figure 1a and b). This variant was the only one that co-segregated perfectly with disease, and was not observed in 150 ethnically matched normal controls, 20 melanoma patients with lentigines, or in the UCSC Genome, Ensembl, HapMap, NCBI

dbSNP, or the Japanese SNP variant databases.

All affected family members exhibited a similar phenotype of dark brown macules of lentigines (Figure 1c and d), typically presenting in the first decade of life, most prominent in sun-exposed areas. In some cases, lentigines covered the face, trunk, and extremities, and in other case, occurred principally over the face and distal extremities (Figure 1c and d).

The diagnosis of lentigines is based on the presence of increased melanin pigmentation, higher density of melanocytes, and characteristic elongation of rete ridges—the inward projections of the epidermis into the dermis (Figure 2a) (Montagna et al., 1980). Tissue sections stained with the melanocyte marker MART1 showed an ~2-fold increase in melanocyte number per mm of skin biopsy in both the hyper-pigmented lesional and adjacent non-lesional skin of affected patients (Figure 2). However, only lesional skin has a dramatic increase in melanin (Figure 2a). Sections stained with the proliferation marker, Ki67, showed that patients had ~2-fold more proliferating cells in both lesional and non-lesional

Accepted article preview online 23 July 2015; published online 13 August 2015

Supplementary Materials:

Material and methods :

Chemicals and antibodies

Mouse anti-human involucrine and streptavidin-FITC (S3762) came from Sigma-Aldrich (Bornem, BE). Monoclonal mouse anti-KRT10 antibody came from DAKO (Glostrup, Denmark). Polyclonal rabbit anti-CLD1, anti-OCL and anti-ZO1 antibodies were obtained from Life Technologies (Carlsbad, CA, US). Polyclonal rabbit anti-LOR antibody came from Abcam (Cambridge, UK). Monoclonal mouse anti-KRT14 and monoclonal mouse anti-HYAL1 (1D10) were purchased from Santa Cruz (Carlsbad, California, USA). HABP was a kind gift from Prof. Tammi (University of Kuopio, FI). Anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG antibodies coupled with a fluorochrome were from Life Technologies (Carlsbad, CA, US). Polyclonal rabbit anti-human RPL13A, anti-mouse and anti-rabbit HRP-antibodies were obtained from Cell Signalling (Leiden, NL).

Human keratinocyte cultures

Normal abdominal keratinocytes were obtained from abdominoplasties of consenting patients with the approval of the Medical Ethics Committee of Clinic St. Luc and in accordance with the Declaration of Helsinki. Proliferating primary keratinocytes were detached with 0.025% trypsin and either seeded in culture dishes at 7000 cells/cm² to grow keratinocytes in monolayer or plated on polycarbonate filters for reconstruction of an epidermis (human reconstructed epidermis [RHE]).

Keratinocyte cultures were grown in autocrine culture conditions as described earlier (Minner *et al.*, 2010) and in polycarbonate culture inserts for reconstructed human epidermis (RHE) models described earlier (Frankart *et al.*, 2012).

Western blots

Proteins from monolayers and RHE were extracted with a lysis buffer containing 8.7% glycerol, 2% SDS, 0.2% dithiothreitol, and 62.5mM Tris-HCl. Electrophoresis was performed on a 10% polyacrylamide gel, and proteins were transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (GE Healthcare Bio-Sciences, Diegem, BE). Membranes were blocked in a PBS/0.1% Tween solution containing 5% powdered milk and incubated with primary antibodies against Hyal1 (1:1000), IVL (1:5000), or RPL13a (1:2000) diluted in the blocking solution. After 3 washes membranes were incubated with a HRP-conjugated secondary antibody (1:1000) diluted in the blocking solution. POD Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Vilvoorde, BE) and ImageQuant LAS 4000 mini system (GE Healthcare Bio-Sciences, Diegem, BE) were used to reveal and visualize Western blot signals.

HYAL1 zymography

Proteins from monolayers, RHE, or epidermal samples were extracted with 100µl of sucrose buffer (Merck, Darmstadt, Germany) containing protease inhibitors (Complete cocktail,

Boehringer, Mannheim, Germany). Protein concentrations were measured using Pierce kit (Thermo Scientific, Rockford, USA). Twenty μg of proteins were separated on 10% polyacrylamide gel containing 0.17 mg/ml hyaluronan (HA) from rooster crest (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). After electrophoresis, the gel was washed and incubated in a 3% Triton X-100 solution (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for 2h. This solution was removed and the gel was incubated at 37°C for 48h in 0.1M formate buffer, pH 3.7, containing 0.1M NaCl. After incubation, the gel was washed and incubated in 20mM Tris/HCl with 0.1mg/ml Pronase (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) at 37°C for 2h to remove interfering protein bands. Finally, the gel was washed and stained with 0.05% Stains-All (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) dissolved in 50% formamide. After 1 day in the dark, the gel was washed again in water and photographed with a digital camera on a transilluminator.

Mice

Experiments were performed with C57BL/6 wild-type (*Hyal1*^{+/+}) or *Hyal1*^{-/-} mice initially obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC, University of California, Davis, USA). The Animal Ethics Committee of the University of Namur approved the experiments. Mice were euthanized and ears removed for histological analysis.

Trans-epithelial electrical resistance measurements

Trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of mice skin were performed using Millicell electrical resistance system (Millipore). Skins were taken and placed on cell crown (Scaffdex, Finland) in six-well plates containing 3 ml of culture medium and overlaid with 500 μl of PBS.

Skin surface pH

The pH at the skin surface was measured with a pH electrode (Courage+Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany).

Outside-in permeability assay

Embryos were killed on ice and incubated in 25, 50, 75% and 100% methanol/PBS for dehydration. They were incubated for 1 min successively in 75%, 50% and 25% methanol/PBS for rehydration. Staining was performed during 30 min in 0.1% toluidine blue/PBS. After washes, dye penetration reveals barrier status (Hardman *et al.*, 1998).

HA extraction and assay

Stratum corneum was isolated from the epidermis of 3-day-old mice after incubation in trypsin solution of one hour. After mechanic dissociation, cells and stratum corneum were isolated with a filter (EASYstrainer 70 μm , greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). This material was lyophilized before being resuspended and allowed to boil for 20 min in 300 μl of 50mM Tris-HCl, pH 7.8 (Acros Organics, USA). The samples were then incubated in 1% pronase (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) at 40°C during one week.

HA concentration in the medium or in tissue extracts was quantified using Hyaluronan DuoSet kit (DY3614, R&D systems, Abigdon, UK). Using a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), the optical density was determined at 450nm and HA concentration was calculated on the basis of a standard curve with the SoftMax Pro 5.2 program. HA concentration level was normalized with respect to total cell protein concentration.

Measurement of HA molecular mass profile using size exclusion chromatography

HA from stratum corneum was eluted at 70 μ l/min with 0.15M sodium acetate, 0.1% CHAPS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) on a Sephacryl S-1000 column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). After chromatography, HA was assayed in each fraction as described above. In controls, HA samples of known molecular mass were chromatographed on the same columns.

Immunocytochemistry and immunohistochemistry

RHE and samples of human and mouse skins were fixed in 4% formalin in 70% ethanol and 5% glacial acetic acid and processed for histology. Sections were first deparaffinized with toluol and rehydrated with methanol. Sections were then rinsed three times in PBS and three times in 0.1M glycine before being blocked for one hour in PBS/2% BSA. Primary antibodies used were anti-KRT14 (1:50), anti-KRT10 (1:100), anti-LOR (1:100), anti-CLD1 (1:50), anti-OCL (1:50), anti-ZO1 (1:50), anti-HYAL1 (1:1000) and biotin-HABP (1:25), all diluted in PBS/BSA/0.01% Triton and incubated in a moist chamber. Sections were then washed with PBS/BSA/Triton and incubated with a secondary antibody marked with Alexa (1:500) or streptavidin (1:1000) before being washed in PBS/BSA/Triton. Sections were finally incubated with Hoechst 33258 to reveal nuclei and mounted with Mowiol (Sigma-Aldrich, Bornem, BE) for observation with a confocal microscope.

Quantitative PCR

The High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Vilvoorde, BE) was used to extract total RNA. The RNA concentration was measured with NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Rockford, USA). cDNA was obtained with Super Script III RNase H-reverse transcriptase kit (Invitrogen, Merelbeke, BE). cDNA was amplified in the presence of primers (Table 1) and Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Vilvoorde, BE). Quantitative PCR was performed with a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Lennik, BE).

Table 1

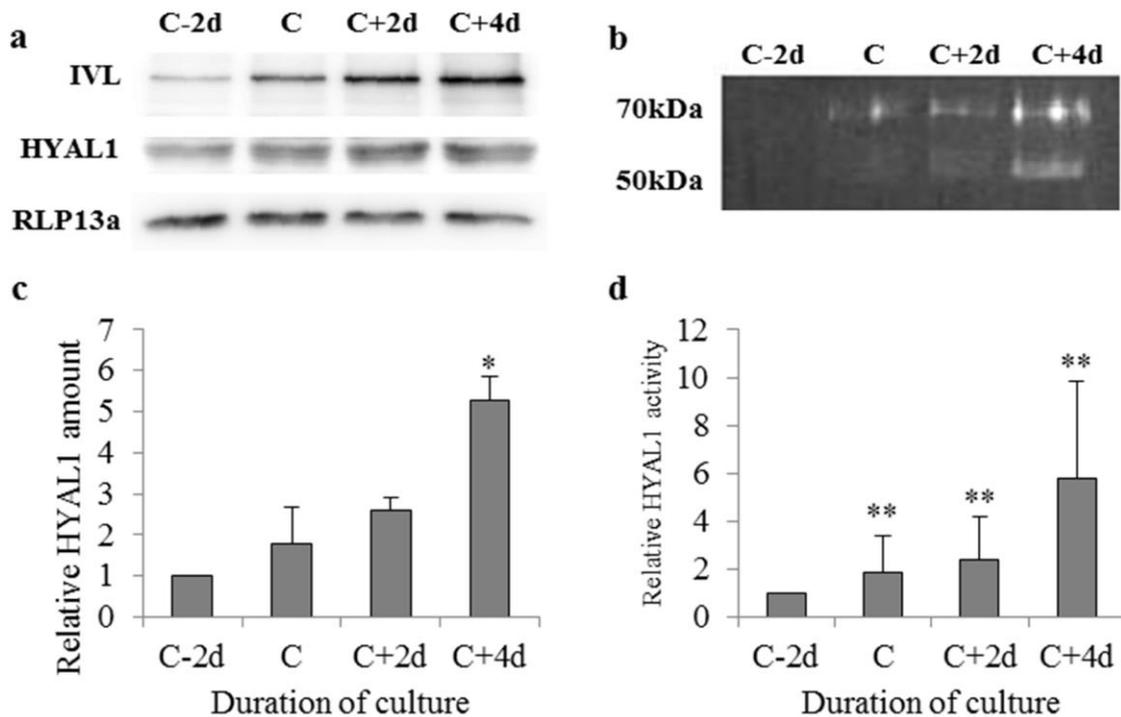
Gene	Forward(5'-3')	Reverse (5'-3')
UGDH	GAGGTAGCAACAGCGATTGGA	ACCCAACACTGGCTTTTAGAAACT
CD44	CATTGCAGTCAACAGTCGAAGAA	ATTGCCACTGTTGATCACTAGCTT
RPLP0	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
TBP	TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT	CCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGA
mGapdh	AATGTATCCGTTGTGGATCT	CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
mHyal1	CAGCATGCTCAGAAAGTTTG	TGAGCAAGGTGGGTAACCAG

mHyal2	CGAGGACTCACGGGACTGA	GGCACTCTCCCGATGGTAGA
mHyal3	CCGGAGCTCTGGGAGATTC	GCGGCACTCACTCCAATAGTC
mHexA	TTCAAGCAGCTGGAGTCCTTCT	CCCTTGTCATAATCAGAGACGATGT
mHexB	ACCACTTTTCCTGAGCTAAGCAA	GGACATCGTTTGGTGTATAGACATG

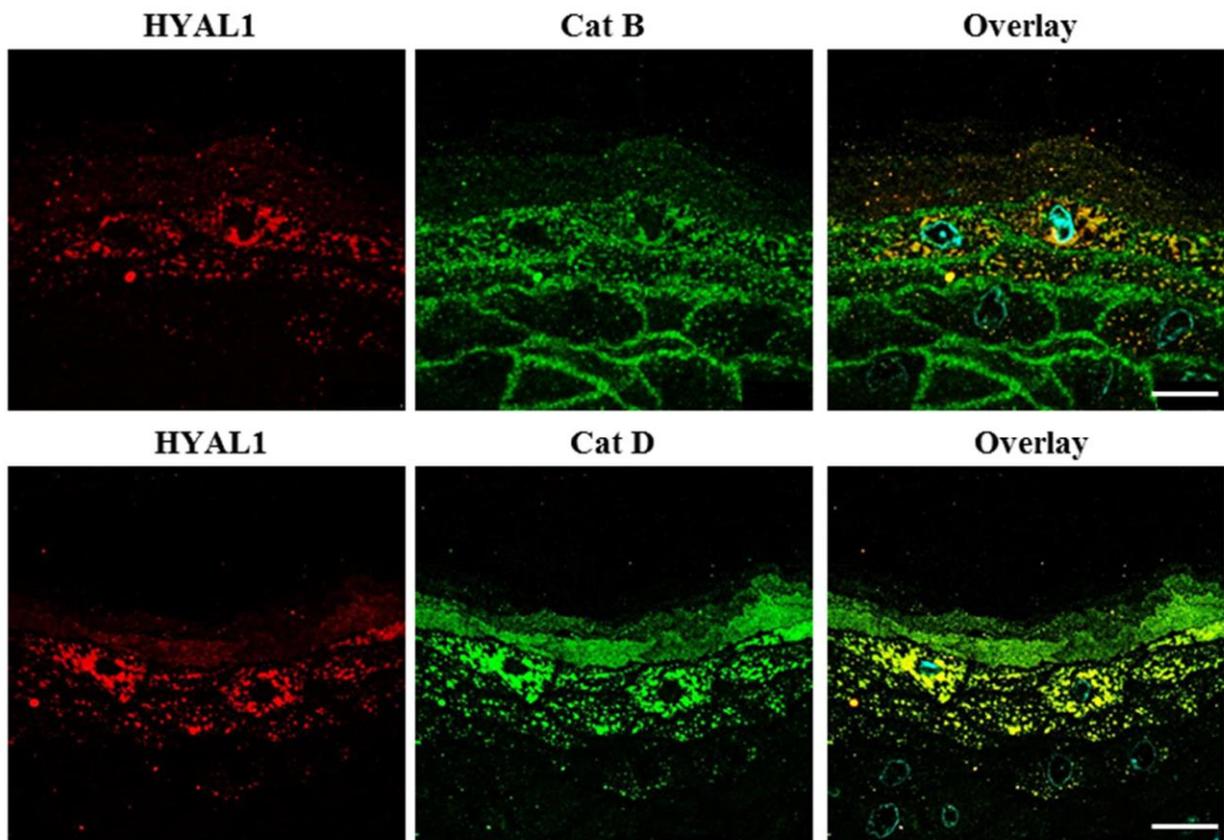
Statistics

Statistics on quantitative Western blot and zymography data were performed using Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks on results obtained in three independent experiments analysing each *in vitro* model. Statistical analyses regarding HA concentrations and mRNA expression levels were performed using Mann–Whitney test, and those regarding HA size distribution using Two Way Repeated Measurements ANOVA.

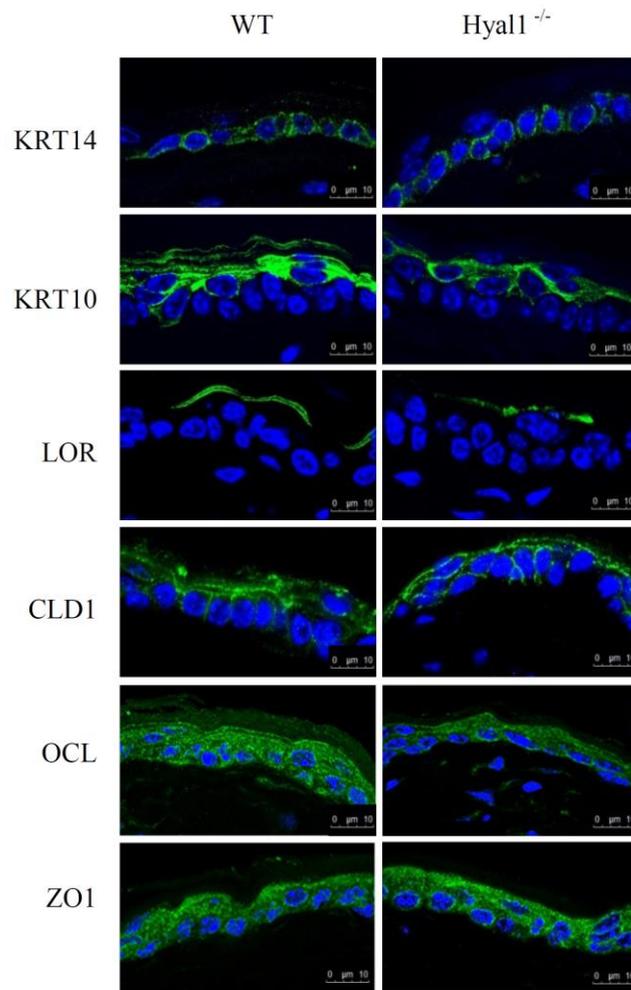
Supplementary Figures



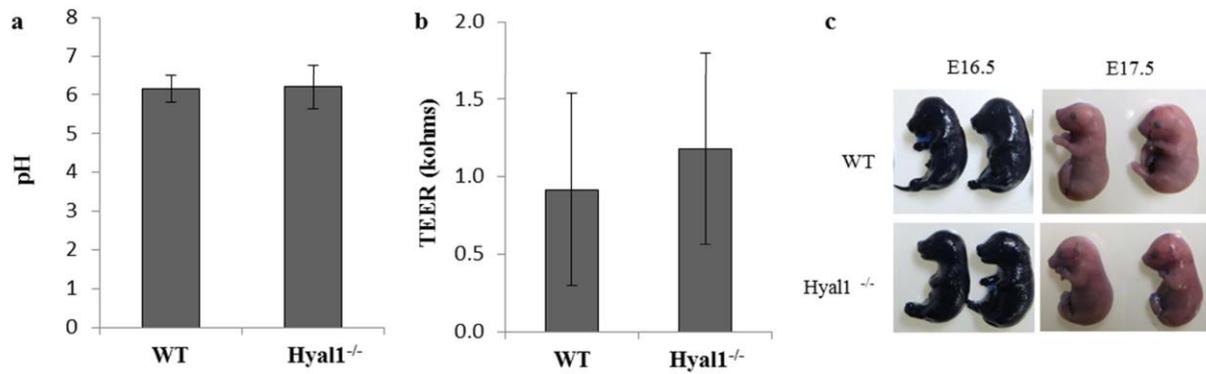
Supplementary Figure S1: HYAL1 abundance and activity in monolayers of cultured human keratinocytes. Proteins were extracted every 48h, starting two days before confluence (C-2d) until four days after confluence (C+4d). **(a)** HYAL1 abundance detected using Western blots. RPL13a was used as loading control and involucrin (IVL) as a control of epidermal differentiation. **(b)** HYAL1 activity analysed using zymography. Brighter stripes correspond to HYAL1 enzymatic activities. **(c)** Relative quantitation of HYAL1 expression calculated using Western blot detection normalized to detection of RPL13a. C-2d values were arbitrarily fixed at 1. **(d)** Relative quantitation of zymography, C-2d values being arbitrarily fixed at 1. Error bars represent standard deviations (n=4, Friedman Test; * p<0.05, ** p<0.01)



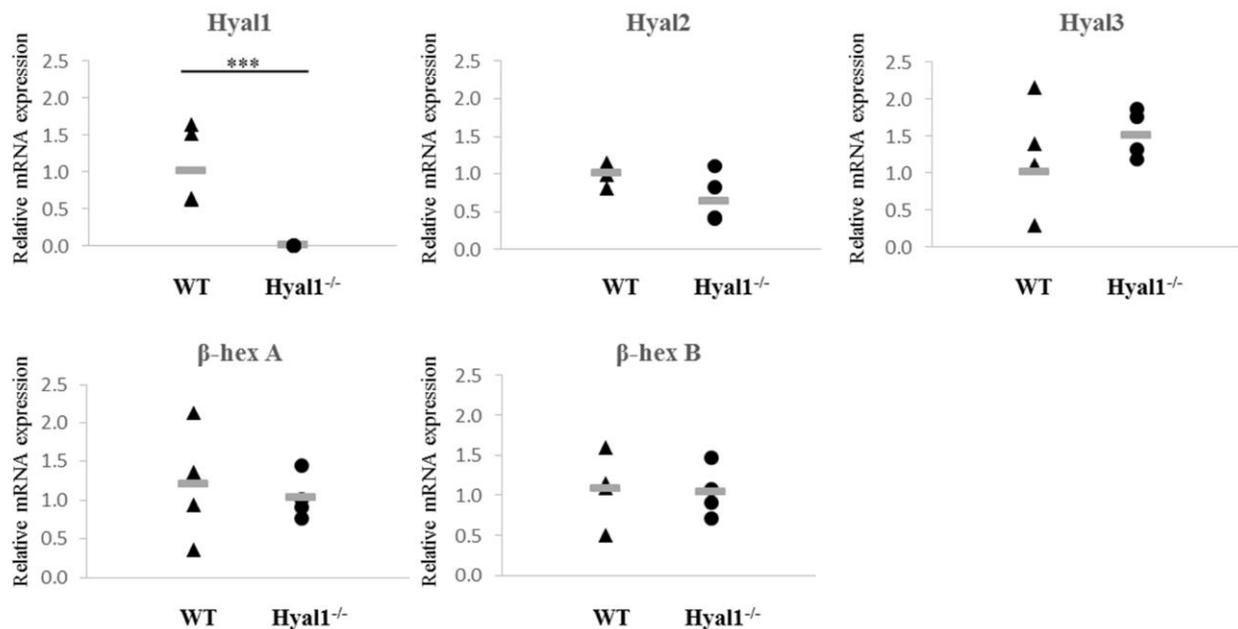
Supplementary Figure S2: Co-localisation of HYAL1 and cathepsins B and D in human epidermis. Human skin samples were fixed and processed for histology and HYAL1 (red) and cathepsin B or D (green) immunofluorescent detection. Nuclei were stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 10 μ m.



Supplementary Figure S3: Immunofluorescent labelling of differentiation markers. Skins from ear of Hyal1^{-/-} and wild-type (WT) young mice were fixed, processed for histology, and then analysed for tissue distribution of differentiation markers using antibodies against KRT14, KRT10, LOR, CLD1, OCL and ZO1. Nuclei were stained in blue using Hoechst 33258. Scale bars = 10μm.



Supplementary Figure S4: Superficial pH and barrier efficiency of *Hyal1*^{-/-} mice compared to wild-type (WT) mice. (a) Skin surface pH of young WT and *Hyal1*^{-/-} mice (n=10) were measured using a pH meter. (b) Trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements were performed on skin of WT (n=10) and *Hyal1*^{-/-} young mice (n=10). Data are presented as means and error bars represent standard deviations. (c) Epidermal permeability barrier assay using toluidine blue staining on E16.5 and E17.5 mouse embryos (independent litters, n=4).



Supplementary Figure S5: Relative expression of various gene mRNAs. Keratinocytes were isolated from epidermis of wild-type (WT) and *Hyal1*^{-/-} young mice (n=4). Total RNA were extracted. The relative expression levels of *Hyal1*, *Hyal2*, *Hyal3*, β-hexosaminidase A and B transcripts were measured using RT-qPCR. Individual values are shown. Grey bars represent the means. Mann-Whitney Test: *** P<0.001.

Reference

Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, et al. (2012) Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Experimental dermatology* 21:871-5.

Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, et al. (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125:1541-52.

Minner F, Herphelin F, Poumay Y (2010) Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol* 585:71-82.

PARTIE 2 : Etude des conséquences de l'absence de la protéine TSG-6 sur l'HA épidermique

L'étude du métabolisme de l'HA a mis en évidence l'implication des HAS1/HAS3 dans la synthèse et de HYAL1 dans la dégradation (Malaisse et al., 2014 et 2015) mais la question des rôles joués par l'HA présent dans les espaces intercellulaires au cours des processus de prolifération et de différenciation des kératinocytes reste fortement controversée (Malaisse et al., 2016). Pour poursuivre l'étude de l'HA épidermique, les hyaladhérines et plus particulièrement la protéine TSG-6 ont retenu notre attention. En effet, une équipe de recherche de Manchester a localisé en 2011 cette protéine anti-inflammatoire, connue de ce fait comme étant particulièrement exprimée dans des conditions pathologiques, dans l'épiderme humain sain (Tan et al., 2011). D'autre part, une étude transcriptomique sans *a priori* (*MicroArray*), réalisée par l'équipe de StratiCell, a montré que le gène *TNFAIP6* est le 6^{ème} gène dont l'expression est la plus induite suite à un traitement de RHE avec des cytokines Th2 (IL-4, IL-13 et IL-25) pour mimer la dermatite atopique (Hubaux et al., 2018) (Park et al., 2021). Notre intérêt s'est par conséquent porté sur le rôle de ce partenaire de l'HA exprimé constitutivement et fortement induit en conditions inflammatoires dans l'épiderme.

En tant qu'approche expérimentale innovante destinée à comprendre les fonctions de cette protéine au sein de l'épiderme, nous avons entrepris d'éditer l'ADN de kératinocytes pour créer, par la technique CRISPR/Cas9, des lignées de cellules TSG-6^{-/-} incapables d'exprimer une protéine TSG-6 fonctionnelle. Des kératinocytes TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} ont été utilisés pour reconstruire des épidermes qui ont été soumis à des conditions considérées comme pathologiques pour analyser leurs réponses ou leurs éventuelles absences de réponse quand la protéine TSG-6 ne peut être exprimée. Dès lors, les modèles et outils nécessaires à l'étude de la fonction de la protéine TSG-6 ont été développés puis validés.

2.1. Modèles et outils d'étude

2.1.1. Reconstruction d'épidermes à partir de kératinocytes N/TERT

Dans le but d'étudier la fonction de la protéine TSG-6 dans les épidermes humains, des lignées cellulaires déficientes pour le gène *TNFAIP6* ont été générées au moyen de l'approche CRISPR/Cas9. Le choix de cette approche sera discuté dans la partie « discussion » de cette thèse. Cependant, d'un point de vue pratique, la préparation et la sélection de lignées cellulaires KO par CRISPR/Cas9 implique un nombre élevé de division cellulaire. Or les kératinocytes primaires humains issus d'abdominoplasties supportent maximum 3 passages, après quoi la reconstruction d'épidermes sur filtre de polycarbonate n'est plus possible. Nous avons donc utilisé un autre type cellulaire : des

kératinocytes immortalisés nommés kératinocytes N/TERT, provenant du laboratoire de Jim Rheinwald à Harvard (Rheinwald et al., 2002). Ces kératinocytes ont été manipulés pour surexprimer de façon stable la sous unité catalytique de la télomérase (hTERT) et ont acquis spontanément une mutation de p16^{INK4a}, lequel bloque normalement le cycle cellulaire en inhibant des CDK. Ces deux altérations ont rendu les kératinocytes N/TERT immortels en culture cellulaire. Néanmoins, ils continuent de montrer des caractéristiques de prolifération et de différenciation normales, contrairement à d'autres types de kératinocytes immortalisés tels que les HaCaT (Dickson et al., 2000) (Moran et al., 2021). Les caractéristiques propres aux différents types de kératinocytes immortalisés seront abordées dans la section « discussion ». Les épidermes reconstruits à partir de ces kératinocytes immortels (N/TERT-RHE) présentent une morphologie similaire à celle des épidermes reconstruits à partir de kératinocytes primaires (NAK-RHE) et possèdent une barrière compétente. De plus, les N/TERT-RHE répondent aux sensibilisants et aux cytokines pro-inflammatoires de la même manière que les NAK-RHE (Alloul-Ramdhani et al., 2014) (Smits et al., 2017).

Afin de nous assurer de la morphologie des tissus produits par cette lignée immortelle, des épidermes ont été reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT en suivant le même protocole de reconstruction que celui utilisé en routine pour la production de NAK-RHE (Frankart et al., 2012a) (De Vuyst et al., 2014). L'examen microscopique montre que les N/TERT-RHE sont similaires aux NAK-RHE, les quatre couches caractéristiques de l'épiderme étant présentes après 11 jours de reconstruction. Néanmoins, une certaine variabilité a été observée lors de la reconstruction des épidermes avec des cellules N/TERT. Sur 18 épidermes reconstruits simultanément à partir de kératinocytes N/TERT, deux d'entre eux étaient très fins et présentaient une différenciation atypique (Figure 31). Pour la majorité des tissus, le processus de différenciation apparaît normal avec une distribution des marqueurs de différenciation identique aux NAK-RHE (Figure 32). Vu l'intérêt de l'HA dans ce travail, la distribution de l'HA a également été observée dans les N/TERT-RHE. L'HA apparaît, comme dans les NAK-RHE, localisé dans les espaces intercellulaires des couches vivantes de l'épiderme. Cependant, la détection de l'HA apparaît plus intense au niveau de la couche basale des N/TERT-RHE que des NAK-RHE (Figure 33). Le caractère hyper-prolifératif des cellules N/TERT serait peut-être à l'origine d'une synthèse accrue d'HA, en concordance dans ce cas avec les nombreuses études suggérant un lien entre HA et prolifération des kératinocytes (voir point 2.4.1. de l'introduction). Néanmoins, une étude comparative des NAK-RHE et N/TERT-RHE a mis en évidence un niveau d'expression similaire de la kératine 16 dans les deux types de RHE, alors que cette kératine est typiquement surexprimée par les kératinocytes en cas d'hyperprolifération (Smits et al., 2017). Toutefois, la détection fluorescente de l'HA étant une technique semi-quantitative, il serait intéressant de mesurer de façon plus précise la quantité d'HA détectable dans les épidermes reconstruits à partir des deux types de kératinocytes.

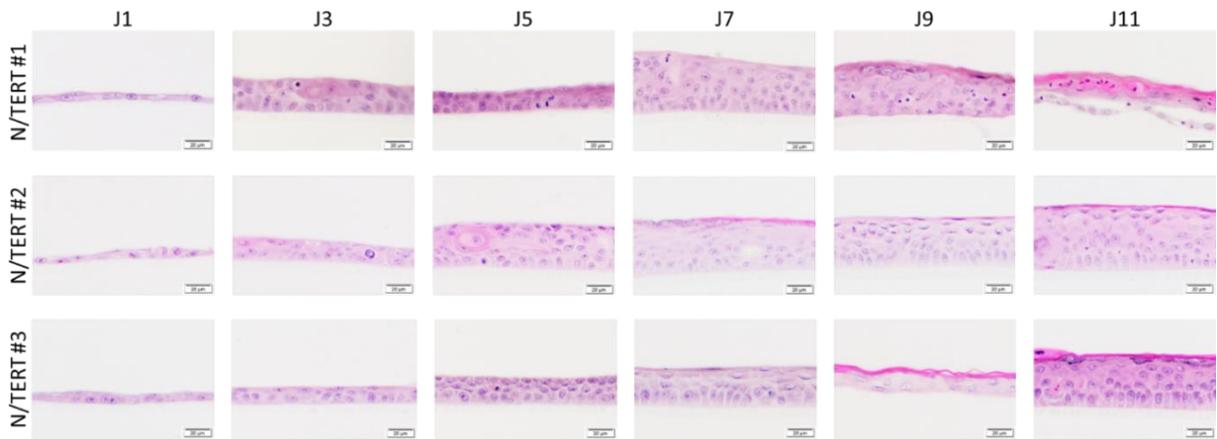


Figure 31 : Morphologie, mise en évidence par une coloration hémalum/éosine, d'épidermes reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT aux jours 1, 3, 5, 7, 9 et 11 de reconstruction

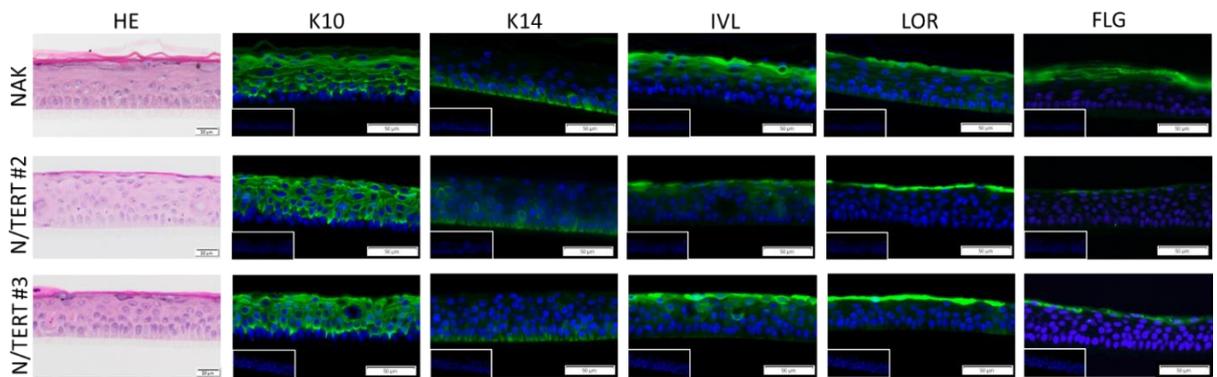


Figure 32 : Comparaison de la morphologie et de la distribution des marqueurs de différenciation (détectés en vert) au 11^{ème} jour de reconstruction de NAK-RHE et N/TERT-RHE. La kératine 10 (K10) est un marqueur des couches supra-basales, la kératine 14 (K14) est un marqueur de la couche basale, l'involucrine (IVL), la loricrine (LOR) et la filaggrine (FLG) sont des marqueurs tardifs de la différenciation. HE, hémalum/éosine

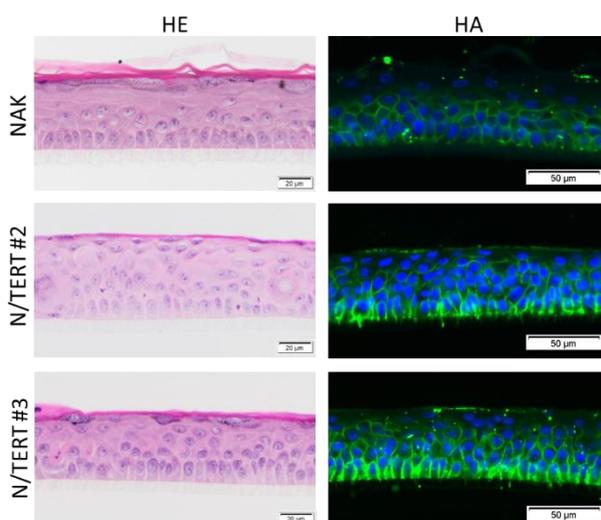


Figure 33 : Comparaison de la distribution de l'HA (détecté en vert) au 11^{ème} jour de reconstruction de NAK-RHE et N/TERT-RHE. HE, hémalum/éosine ; HA, hyaluronan

La cinétique de la reconstruction, la morphologie, la distribution des marqueurs de différenciation des épidermes et la distribution de l'HA étant similaires dans les N/TERT-RHE et les NAK-RHE, les kératinocytes N/TERT ont été choisis pour créer des lignées KO. Cependant, pour obtenir des lignées KO par la technique CRISPR/Cas9, les kératinocytes doivent subir plusieurs manipulations :

- Introduction de la Cas9 et de l'ARN guide dans la cellule
- Dilution limite et amplification des cellules de manière à obtenir des populations monoclonales

Dès lors, des mises au point ont été réalisées afin de s'assurer de la faisabilité de la méthode sur le type cellulaire étudié. Tout d'abord, plusieurs **techniques d'introduction de matériel** dans les cellules ont été étudiées : la transfection par agent chimique (Fugène 6 et Fugène HD) et l'électroporation. La transfection de kératinocytes par des plasmides GFP n'est apparue efficace qu'à environ 15% et induisait une mortalité de plus de 50% des kératinocytes. En revanche, bien que l'électroporation de plasmides GFP provoquait également une mortalité élevée, elle présentait une efficacité d'environ 60%. Afin de vérifier que cette procédure n'altérait pas la capacité des kératinocytes N/TERT à se différencier, des N/TERT-RHE ont été produits avec des cellules ayant été électroporées. Tant les RHE dont les cellules N/TERT ont subi uniquement le choc électrique (électroporation NADA) que les RHE dont les cellules N/TERT ont été électroporés avec des plasmides GFP (électroporation GFP) présentent une morphologie similaire aux RHE contrôles (Figure 34a). De plus, la mesure de la résistance électrique trans-épidermique au cours de la reconstruction des épidermes met en évidence l'installation d'une barrière similaire dans les trois conditions étudiées (Figure 4b).

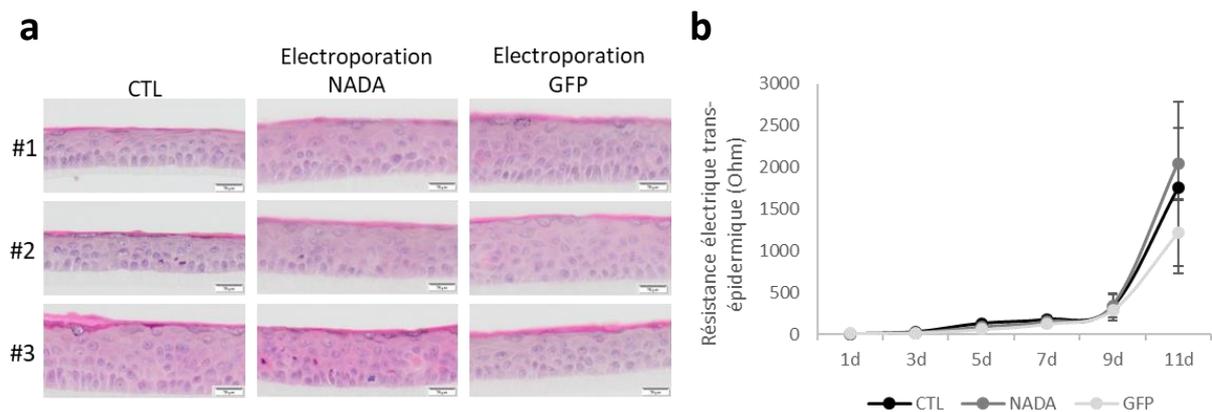


Figure 34 : (a) Morphologie (coloration hémalun/éosine) et (b) mesure de résistance électrique trans-épithéliale d'épidermes reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT au 11^{ème} jour de reconstruction post-choc électrique (NADA) ou post-électroporation de plasmides (GFP)

Finalement, les effets potentiels de la **dilution limite** sur la reconstruction d'épidermes N/TERT ont été étudiés. Après électroporation, les cellules ont étéensemencées à raison d'une seule cellule par puits, de sorte à générer des populations cellulaires clonales. Après amplification suffisante de ces clones, la

morphologie des cellules a été analysée en monocouche et en RHE. Les cellules cultivées en monocouche apparaissent de forme et de taille normale. En revanche, les épidermes reconstruits apparaissent dans l'ensemble constitués d'un nombre inférieur de couches cellulaires que les contrôles et la morphologie de certains d'entre eux semble altérée, comme l'illustre l'analyse du clone 3 dont la couche cornée est absente (Figure 35a). La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (Figure 35b) montre l'établissement progressif d'une barrière fonctionnelle comparable aux contrôles, sauf pour le clone 3 où aucune barrière ne semble se mettre en place, en parfaite cohérence avec l'observation morphologique de ce RHE. Étant donné que certains clones semblent moins bien supporter les différentes étapes précédemment citées, l'étude de plusieurs clones se révèle nécessaire avant de valider un éventuel phénotype particulier produit par l'édition du gène *TNFAIP6*.

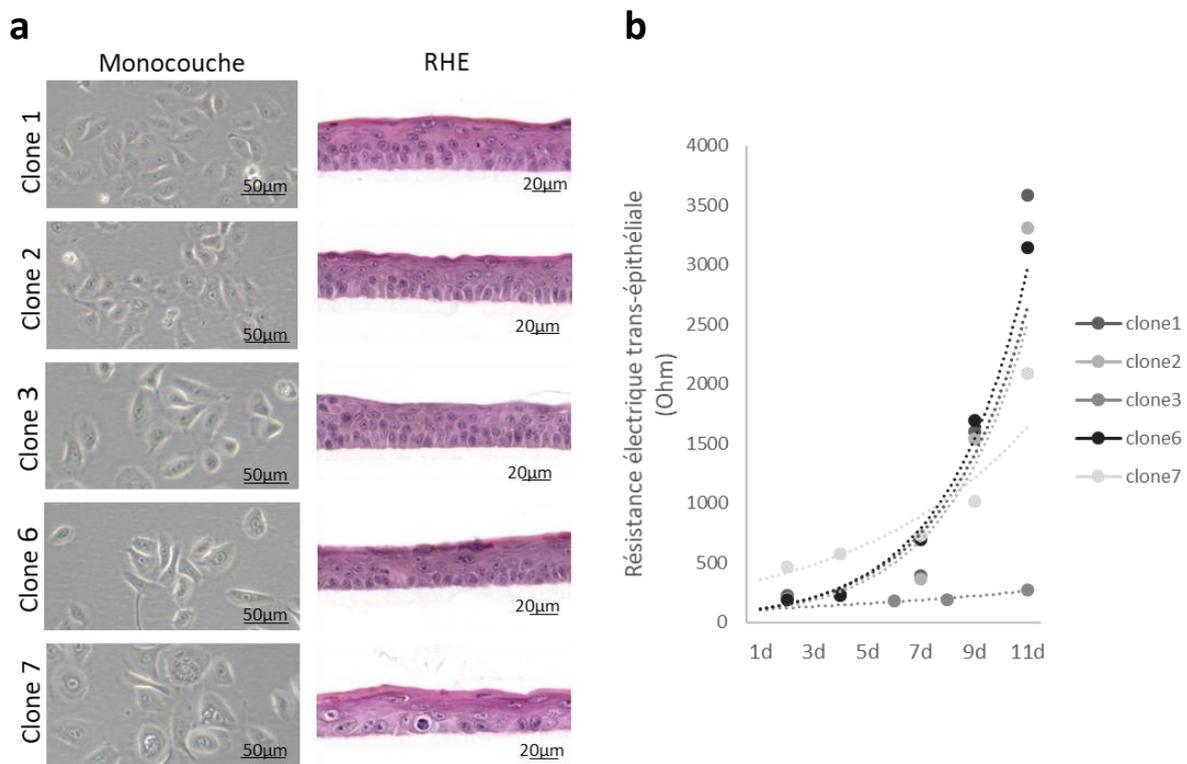


Figure 35 : (a) Morphologie des cellules en monocouche observées au microscope à contraste de phase et des RHE mis en évidence par une coloration hémalum/éosine et (b) mesure de résistance électrique trans-épithéliale d'épidermes reconstruits à partir de kératinocytes N/TERT au 11^{ème} jour de reconstruction post-dilution limite et amplification

2.1.2. Edition du gène *TNFAIP6* des kératinocytes N/TERT par CRISPR/Cas9

Au vu de la capacité des cellules N/TERT à reconstruire un épiderme présentant une différenciation/kératinisation suffisante et une barrière compétente après manipulation (électroporation et dilution limite), ces kératinocytes ont été choisis afin de constituer des lignées déficientes pour le gène *TNFAIP6* par CRISPR/Cas9.

La méthode CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), découverte en 2012 par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna qui leur a valu le prix Nobel de chimie en 2020, permet d'éditer le génome de manière rapide, précise et relativement facilement. Cette technique nécessite deux éléments essentiels : une endonucléase (Cas9) qui provoque des cassures double brin et un gRNA (ARN guide) qui permet de cibler la séquence que l'on souhaite muter. *In vitro*, ce gRNA est constitué par l'hybridation d'un CRISPR RNA (crRNA) qui reconnaît la séquence cible et d'un trans-activating RNA (tracrRNA) qui lie le crRNA à la Cas9 (Figure 36) alors qu'*in vivo*, ce gRNA représente une seule molécule (Guitart et al., 2016) (Redman et al., 2016).

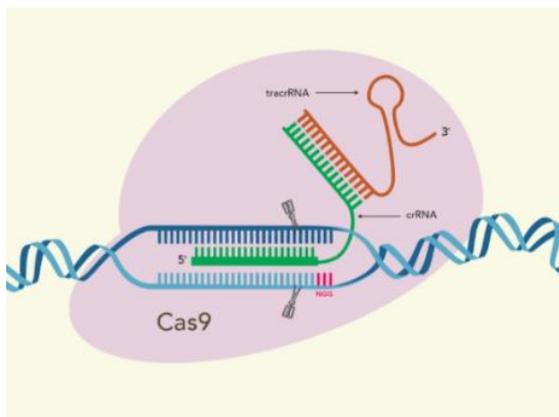


Figure 36 : Représentation du complexe gRNA/Cas9. Le gRNA est composé du crRNA (en vert) et du tracrRNA (en rouge) qui lie la nucléase Cas9 (en rose). (idtdna.com)

Plusieurs méthodes sont disponibles pour introduire le gRNA dans des cellules en culture : (1) introduction d'un plasmide dirigeant l'expression de l'ADN codant l'enzyme Cas9 et du gRNA d'intérêt, (2) introduction de l'ARNm codant pour la Cas9 et du gRNA, ou (3) introduction d'un complexe ribonucléoprotéique (RNP) composé de la protéine Cas9 et du gRNA (Figure 37).

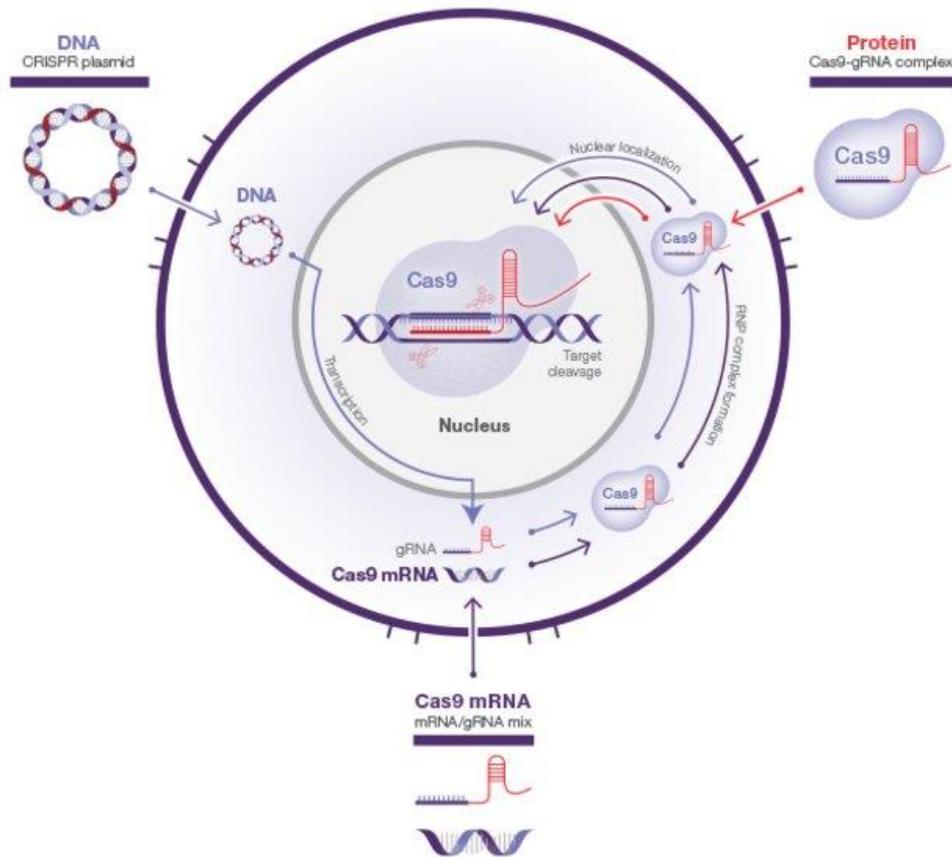


Figure 37 : Représentation schématique de 3 méthodes permettant d'éditer le génome d'une cellule par CRISPR/Cas9 (idtdna.com)

Etant donné que les tests d'électroporation de kératinocytes avec des plasmides GFP montrent une bonne efficacité et que plusieurs laboratoires de notre université ont accès à des plasmides CRISPR, nous avons choisi d'**introduire des plasmides CRISPR** afin d'éditer le génome des kératinocytes N/TERT. Un fragment d'ADN correspondant à un gRNA ciblant une séquence du premier exon du gène *TNFAIP6* a été ligué dans le plasmide LentiCRISPR V2 et ce plasmide a été introduit dans les cellules N/TERT par électroporation. Cependant, contrairement aux tests réalisés précédemment, le taux de mortalité suite à l'électroporation des plasmides CRISPR est monté à plus de 90%. Il est probable que cette mortalité cellulaire accrue soit liée à la taille élevée du plasmide CRISPR (environ 15 kb *versus* 3.2kb pour les plasmides GFP). En effet, il a été montré que l'électroporation de plasmides de grande taille (entre 6 et 16kb) produit des impacts négatifs sur la viabilité de certains types cellulaires, ainsi que sur l'efficacité de la transfection (Lesueur et al., 2016).

Au vu des problèmes rencontrés avec l'utilisation de plasmides CRISPR, nous avons ensuite tenté l'utilisation de **ribonucléoprotéines**. Les RNP présentent plusieurs avantages par rapport aux

plasmides. Le principal avantage des RNP réside dans leur rapidité d'action sur le site d'intérêt, sans étape intermédiaire de transcription et de traduction à partir de plasmides. De plus, leur action rapide et transitoire permet de diminuer les risques de modifier des gènes non ciblés, effet appelé *off-targets* (Farboud et al., 2018). Cette technique permet également de cibler plusieurs exons tout en gardant une concentration en RNP faible et donc sans augmenter le risque de *off-targets*. En effet, dans notre cas, un mélange de 5 gRNA ciblant plusieurs exons du gène *TNFAIP6* a été complexé à la Cas9 afin de cibler plusieurs sites de clivages et ainsi générer une délétion de l'entièreté ou d'une partie majeure du gène *TNFAIP6*. L'électroporation de complexes RNP s'est montrée hautement efficace, tout en préservant une viabilité cellulaire nettement supérieure à celle observée lors de l'électroporation de plasmides. Un tracrRNA fluorescent (tracrRNA ATTO550) a été utilisé, ce qui a permis de noter que visuellement toutes les cellules contenaient des complexes RNP (Figure 38).

N/TERT kératinocytes 24h post-
électroporation des RNP

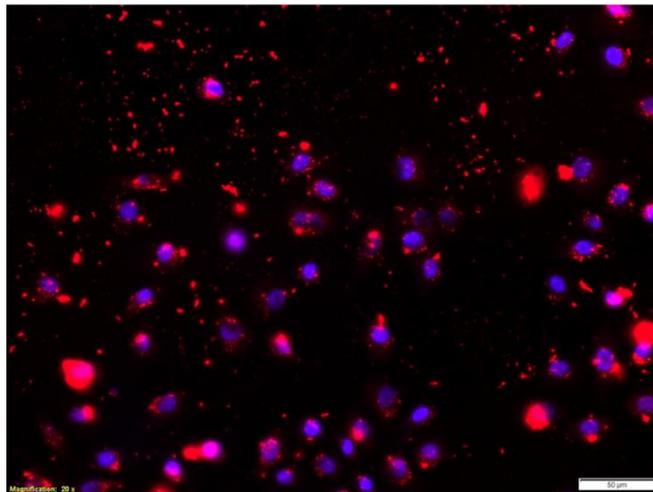


Figure 38 : Visualisation des noyaux des kératinocytes N/TERT (bleu) 24h après avoir été électroporés avec les complexes RNP composés du tracrRNA ATTO550 (rouge)

De plus, l'efficacité de l'électroporation des RNP dans les kératinocytes N/TERT a été mise en évidence par des analyses PCR des différentes mutations attendues. Dans le pool des kératinocytes électroporés avec les 5 gRNA, tous les types de mutation ont été trouvées. Les différents types de mutation ainsi que les clones obtenus ont été validés ; ces informations sont présentées dans l'article de recherche consacré à la protéine TSG-6 dans la section « Résultats » de ce manuscrit.

3.1.3. Adaptations de modèles inflammatoires de RHE produits par les kératinocytes N/TERT

TSG-6 étant une protéine anti-inflammatoire, elle est particulièrement connue comme se trouvant surexprimée en conditions pathologiques. Pour mimer de telles conditions avec des épidermes humains reconstruits, deux modèles que l'on considère inflammatoires, préalablement développés au laboratoire sur NAK-RHE, ont été adaptés pour étudier l'expression et la fonction de la protéine TSG-6 dans des N/TERT-RHE. Il s'agit d'une part d'un modèle mimant une dermatite atopique en ajoutant des cytokines de type Th2 dans le milieu de culture des RHE (De Vuyst et al., 2016) et d'autre part d'un modèle d'infection des RHE par des dermatophytes au cours duquel les éléments fongiques colonisent la couche cornée de l'épiderme et induisent une réponse de type Th1/17 par les kératinocytes (Faway et al., 2017).

Ces deux modèles ont été choisis d'abord parce qu'ils ont été développés et caractérisés dans notre laboratoire sur NAK-RHE et sont de ce fait plutôt bien maîtrisés et parce qu'il avait été montré, préalablement à notre étude, que l'expression des ARNm TSG-6 est significativement augmentée suite à une exposition des épidermes à des cytokines Th2 (IL-4, IL-13, IL-25) (Park et al., 2021) ou suite à une infection fongique des RHE (Faway et al., 2019).

Modèle de dermatite atopique

Le premier modèle utilisé est un modèle mimant les altérations de la barrière de l'épiderme produites par la dermatite atopique (DA), une maladie chronique de la peau liée le plus souvent à des réactions allergiques cutanées qui impliquent une réponse lymphocytaire de type Th2. Pour créer ce modèle développé par Evelyne De Vuyst, les NAK-RHE sont tout d'abord déplétés en cholestérol au moyen de méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) avant d'être stimulés pendant 48h par l'ajout d'interleukines de type Th2 (IL-4, 13 et 25) dans le milieu de culture des épidermes. Les épidermes DA-like présentent de la spongiose, de l'hypogranulose et une altération de la barrière, comme dans la pathologie *in vivo*. D'un point de vue transcriptomique, ils surexpriment notamment l'ARNm de CA2 (carbonic anhydrase 2), NELL2 (neural epidermal growth factor-like 2) et HAS3 (hyaluronan synthase 3) alors que les niveaux d'expression de FLG (filaggrine) et LOR (loricrine) sont diminués, cinq marqueurs typiquement dérégulés au cours de la DA (De Vuyst et al., 2016). En simplifiant le modèle, il a été montré plus récemment qu'une exposition des épidermes à 3 interleukines (IL-4, 13 et 25) est suffisante pour induire une réponse typique des kératinocytes (Park et al., 2021). Plus précisément, il apparaît que ce sont l'IL-4, et dans une moindre mesure l'IL-13, qui sont majoritairement responsables du phénotype pathologique des kératinocytes et responsables des dérégulations de l'expression des gènes caractéristiques de la DA (Do Nascimento Pedrosa et al., 2016). Par ailleurs, il a été montré qu'un

traitement de N/TERT-RHE avec les IL-4 et 13 provoque l'expression de gènes associés à la pathologie et induit les caractéristiques typiques de la DA telles que la spongiose et l'apoptose (Smits et al., 2017).

Ce modèle a donc été utilisé pour étudier la protéine TSG-6 dans un modèle *in vitro* de dermatite atopique sur N/TERT-RHE.

Modèle de dermatophytose

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux keratinophiles et kératinolytiques capables d'infections superficielles des structures kératinisées de l'organisme (Weitzman et al., 1995). Lors d'une infection de l'épiderme par des dermatophytes, les kératinocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 α , IL-1 β , TNF α et IL-8 (Thèse d'Emilie Faway, 2018).

Afin de mimer cette pathologie inflammatoire, Faway et al (2017) ont développé un modèle d'épidermes humains reconstruits (NAK-RHE) infectés par des dermatophytes de l'espèce *Trichophyton rubrum* (Faway et al., 2017). Après 11 jours de reconstruction, des spores de *Trichophyton rubrum* sont appliquées de manière topique (1000 CFU) sur les NAK-RHE pendant 4h. Ensuite, l'infection se développe et les champignons colonisent les couches cornées de l'épiderme durant les 4 jours suivants. Quatre jours après le début de l'infection, les kératinocytes expriment et sécrètent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β , le TNF α ainsi que la protéine TSG-6 (Faway et al., 2019).

Afin de développer le modèle d'infection par dermatophytes sur des N/TERT-RHE, l'inoculum a dû être adapté car des différences existent entre les NAK-RHE et les N/TERT-RHE. En effet, la barrière épidermique mise en place dans les N/TERT-RHE apparait moins efficace que celle des NAK-RHE (Figure 39). Cette différence de barrière entre les deux types cellulaires pourrait s'expliquer par une différence de composition lipidique de la couche cornée (Van Drongelen et al., 2014) et par une désorganisation des jonctions serrées (Moran et al., 2021).

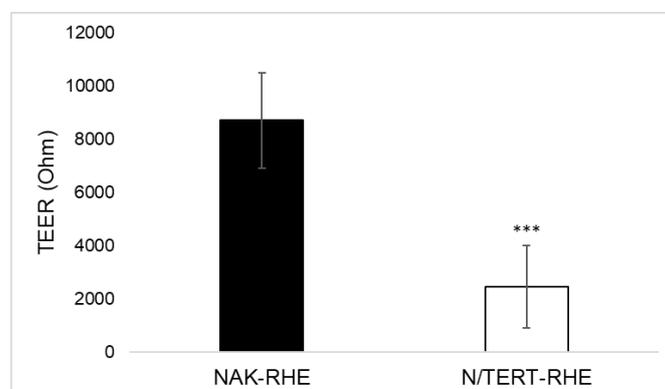


Figure 39 : Mesure de la résistance électrique trans-épithéliale des NAK-RHE (n=72) et des N/TERT-RHE (n=105) au 11^{ème} jour de reconstruction. t-test ; moyenne \pm SD ; ***p<0.001

Dès lors, 3 tailles d'inoculum ont été testées. Des suspensions contenant 250, 500 et 1000 CFU ont été appliquées de manière topique sur des N/TERT-RHE afin de déterminer l'inoculum idéal permettant d'une part le développement de l'infection au niveau de la couche cornée et d'autre part une réponse des kératinocytes. Au niveau morphologique, 4 jours après application des spores de dermatophytes, les N/TERT-RHE infectés avec des inocula de 250 et 500 CFU montrent une infection localisée dans la couche cornée alors que l'application d'un inoculum de 1000 CFU provoque une infection plus forte avec la pénétration de certains hyphes dans les couches vivantes de l'épiderme (Figure 40a). Parallèlement, les mesures de résistance électrique trans-épidermique réalisées 4 jours après l'infection montrent un effondrement de la barrière des N/TERT-RHE infectés avec les 3 inoculum testés (Figure 40b). Finalement, quel que soit l'inoculum, les kératinocytes répondent à l'infection en sécrétant de l'IL-8 et du TNF α dans le milieu sous-jacent (Figure 40c-d).

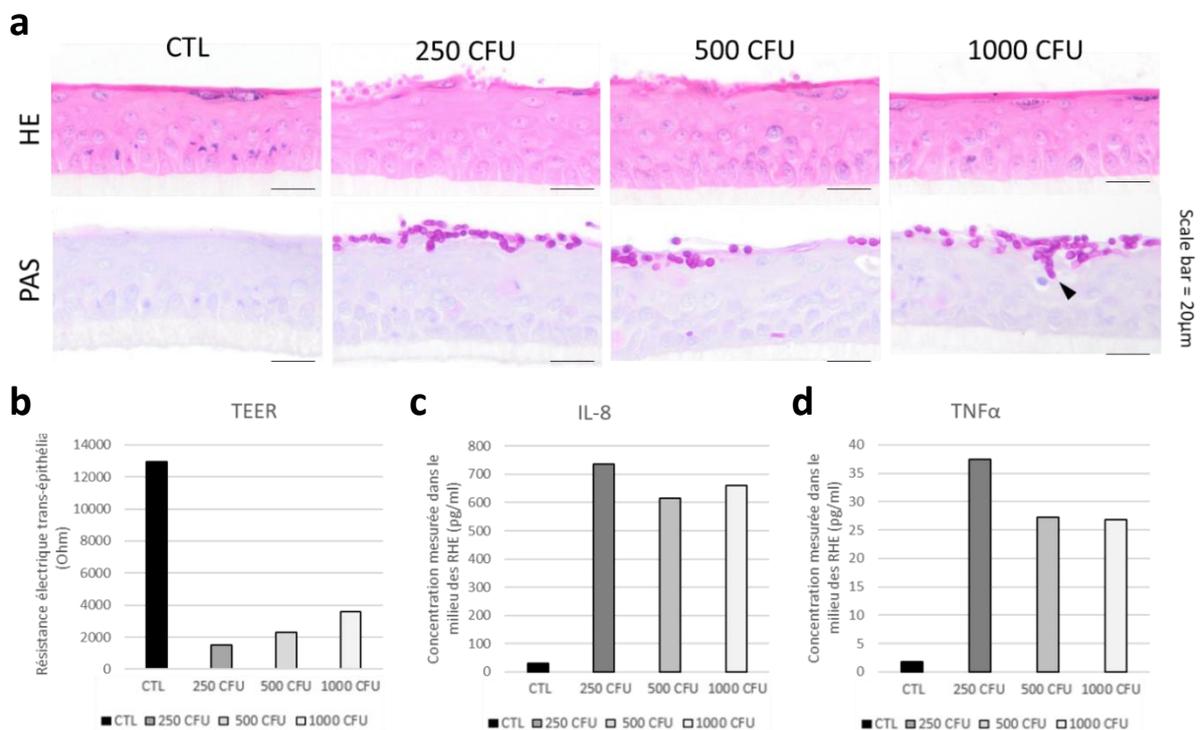


Figure 40 : (a) Analyse de la morphologie par coloration hémalum/éosine (HE) et de l'infection par l'acide périodique de Schiff (PAS), (b) mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) et mesure de la concentration en (c) IL-8 et (d) TNF α relargué dans le milieu de culture des N/TERT-RHE au 4^{ème} jour post-infection.

Sur base de ces résultats, l'inoculum de 500 spores a été choisi pour l'étude de l'infection des N/TERT-RHE. En effet, cette quantité de spores induit une réponse de type Th1/17 des kératinocytes suite à une infection limitée à la couche cornée.

2.2. Caractérisation de l'expression du TSG-6 épidermique en conditions saines et inflammatoires et investigation de ses rôles

La mise en évidence de la protéine TSG-6 dans l'épiderme humain sain (Tan et al., 2011) et la surexpression de cette protéine dans un modèle d'épiderme mimant la dermatite atopique (Park et al., 2021) ont orienté nos investigations vers l'étude de cette protéine et de ses fonctions.

Tout d'abord, la caractérisation de la protéine TSG-6 a été menée sur des épidermes reconstruits à partir de kératinocytes primaires (NAK-RHE). Alors que TSG-6 est faiblement exprimé dans les RHE en conditions physiologiques, son expression apparait largement induite *in vitro* dans des RHE challengés et *in vivo* dans des peaux de patients atteints de dermatite atopique. Tant les épidermes traités avec des cytokines de type Th2 (interleukines 4 et 13) pour mimer le phénotype de la dermatite atopique, que les épidermes infectés avec des éléments fongiques entraînant des réponses des kératinocytes de type Th1/17 présentent des inductions d'expression et de sécrétion de la protéine TSG-6, parallèlement à une augmentation de la production d'HA.

Afin de comprendre les fonctions de cette protéine au sein de l'épiderme, des lignées de cellules TSG-6^{-/-} ont été générées sur base des mises au point techniques précédemment expliquées (voir le point 2.1 de la section « Résultats »). Alors que l'absence de TSG-6 n'impacte ni la morphologie ni la différenciation des kératinocytes, la protéine semblerait être impliquée dans le processus de migration cellulaire, notamment dans la cicatrisation cutanée. De manière intéressante, les épidermes déficients en TSG-6 présentent un contenu en HA réduit alors qu'une plus grande quantité de ce GAG se retrouve dans le milieu sous-jacent. Néanmoins, aucune modification de l'expression des enzymes de synthèse et de dégradation n'est observée. Cela suggère un basculement de localisation de l'HA dû à une perte de celui-ci depuis le compartiment tissulaire vers le compartiment sous-jacent, proposant un rôle pour la protéine TSG-6 dans la rétention et le maintien de l'HA dans les espaces intercellulaires de l'épiderme. Cette rétention de l'HA dans la MEC apparait d'autant plus importante quand les épidermes se trouvent dans les conditions pathologiques au cours desquelles l'HA est produit en plus grande quantité. Finalement, la rétention de l'HA dans la MEC apparait proportionnelle au nombre de cellules capables de sécréter la protéine TSG-6.

Le détail des résultats collectés dans le cadre de cette étude se trouvent dans l'article publié en 2021 nommé « **Deletion of *TNFAIP6* gene in human keratinocytes demonstrates a role for TSG-6 to retain hyaluronan inside epidermis** » (C. Evrard, E. Faway, E. De Vuyst, O. Svensek, V. De Glas, D. Bergerat, M. Salmon, O. De Backer, B. Flamion, H. Le-Buanec, C. Lambert de Rouvroit et Y. Poumay).



Deletion of *TNFAIP6* Gene in Human Keratinocytes Demonstrates a Role for TSG-6 to Retain Hyaluronan Inside Epidermis

Céline Evrard¹, Emilie Faway¹, Evelyne De Vuyst¹, Olivier Svensek¹, Valérie De Glas¹, David Bergerat², Michel Salmon³, Olivier De Backer¹, Bruno Flamion¹, Hélène Le-Buanec⁴, Catherine Lambert de Rouvroit¹ and Yves Poumay¹

TSG-6 is a soluble protein secreted in the extracellular matrix by various cell types in response to inflammatory stimuli. TSG-6 interacts with extracellular matrix molecules, particularly hyaluronan (HA), and promotes cutaneous wound closure in mice. Between epidermal cells, the discrete extracellular matrix contains HA and a tiny amount of TSG-6. However, challenges imposed to keratinocytes in reconstructed human epidermis revealed strong induction of TSG-6 expression, after exposure to T helper type 2 cytokines to recapitulate the atopic dermatitis phenotype or after fungal infection that causes secretion of cytokines and antimicrobial peptides. After both types of challenge, enhanced release of TSG-6 happens simultaneously with increased HA production. TSG-6 deficiency in N/TERT keratinocytes was created by inactivating *TNFAIP6* using CRISPR/Cas9. Some *TSG-6*^{-/-} keratinocytes analyzed through scratch assays tend to migrate more slowly but produce reconstructed human epidermis that exhibits normal morphology and differentiation. Few significant alterations were noticed by transcriptomic analysis. Nevertheless, reduced HA content in *TSG-6*^{-/-} reconstructed human epidermis was observed, along with enhanced HA release into the culture medium, and this phenotype was even more pronounced after the challenging conditions. Reintroduction of cells producing TSG-6 in reconstructed human epidermis reduced HA leakage. Our results show a role for TSG-6 in sequestering HA between epidermal cells in response to inflammation.

JID Innovations (2021);1:100054 doi:10.1016/j.xjidi.2021.100054

INTRODUCTION

In the skin, although occupying most of the space in the dermis, the extracellular matrix (ECM) also plays crucial roles in the epidermis, where it is composed of basal lamina and 15–20 nm intercellular spaces around cell junctions. The main ECM components in the epidermis include various polysaccharides, particularly hyaluronan (HA), which is swollen by water. This environment creates a favorable milieu for the diffusion of nutrients, GFs, and cytokines (Sandjeu and Haftek, 2009; Toole, 2001). Langerhans cells and lymphocytes migrate through the epidermal ECM, bringing innate or adaptive immunity.

HA is a linear glycosaminoglycan composed of repeated disaccharides, namely D-glucuronic acid, linked to N-acetyl-D-glucosamine, forming polymers up to 25 μm in length and 10⁵–10⁷ Da in mass (Sakai et al., 2000; Toole, 2004). Half of the total body HA resides in the skin (Fraser et al., 1997; Meyer and Stern, 1994), mostly in the dermis but also in the living layers of the epidermis (Pasonen-Seppänen et al., 2003). The functions of epidermal HA are not fully understood. Roles in proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes (KCs) are unlikely, but altered regulation of HA synthases (HASs) and increased HA production were described in inflammatory conditions such as atopic dermatitis (AD) (Malaisse et al., 2014).

Across the body, HA interacts with several partners, such as TSG-6 protein, secreted by fibroblasts on TNF-α stimulation (Jadin et al., 2014; Lee et al., 1990). TSG-6 is encoded by the *TNFAIP6* gene located on human chromosome 2. The protein of 277 amino acids harbors a cleavable signal peptide, an HA-binding (LINK) domain typical of hyaladherins, and a CUB domain, typically part of ECM and plasma membrane proteins. Besides fibroblasts, several cell types secrete TSG-6 protein in response to proinflammatory stimuli (Baranova et al., 2011). Initially associated with inflammation, TSG-6 is also detected in conditions implying ECM remodeling (Fülöp et al., 2003) and in organs exerting a barrier function (Day and Milner, 2019; Tan et al., 2011). In healthy skin, TSG-6 is detected in the dermis and in living epidermal layers (Tan et al., 2011). Its expression is upregulated during skin injury (Shakya et al., 2020).

¹Research Unit of Molecular Physiology (URPhyM), NAMur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, Namur, Belgium; ²Inovarian SAS, Paris, France; ³StratiCell, Les Isnes, Belgium; and ⁴Laboratory of Oncodermatology, Immunology, and Cutaneous Stem Cells, National Institute of Health and Medical Research (INSERM) U976, Saint-Louis Hospital, Paris, France

Correspondence: Yves Poumay, Research Unit of Molecular Physiology (URPhyM), NAMur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, 61 Rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium. E-mail: yves.poumay@unamur.be

Abbreviations: AD, atopic dermatitis; crRNA, CRISPR RNA; ECM, extracellular matrix; GEO, Gene Expression Omnibus; HA, hyaluronan; HAS, hyaluronan synthase; KC, keratinocyte; KLK, kallikrein; RHE, reconstructed human epidermis; RNA-seq, RNA sequencing; Th, T helper type

Received 22 February 2021; revised 3 July 2021; accepted 12 July 2021; accepted manuscript published online XXX; corrected proof published online XXX

Cite this article as: *JID Innovations* 2021;1:100054

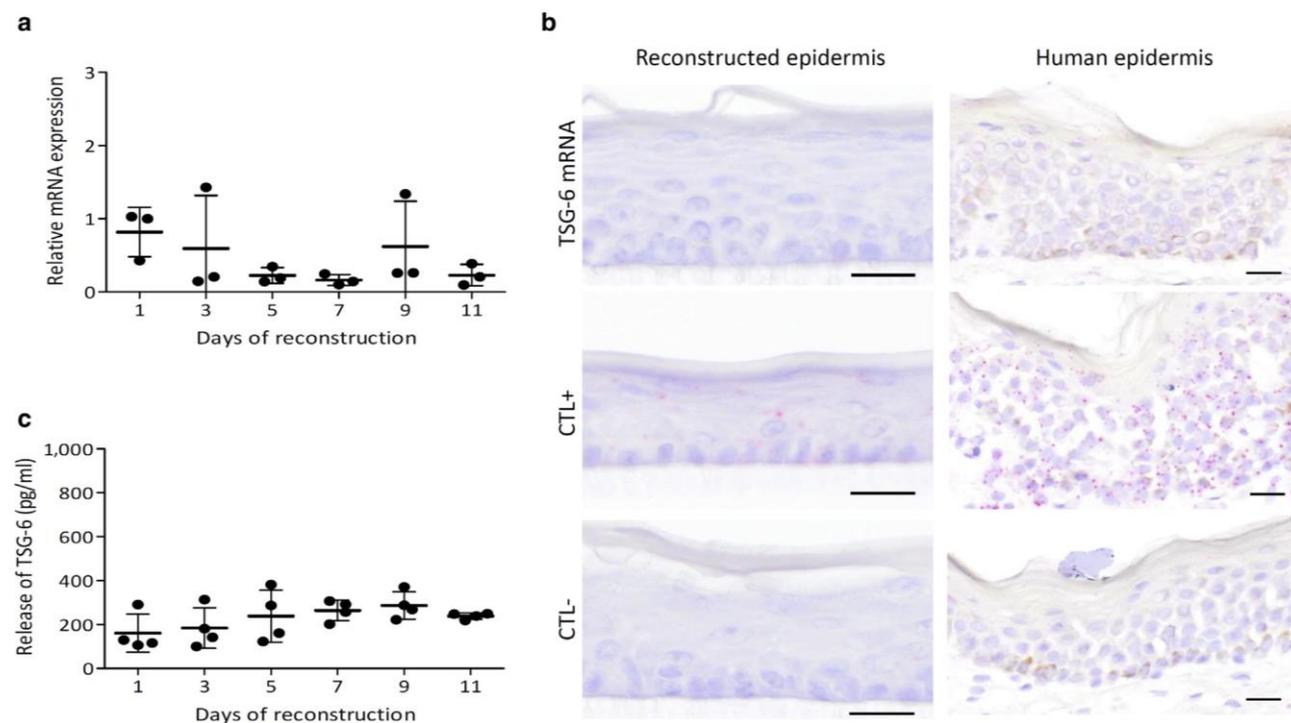


Figure 1. Weak TSG-6-encoding mRNA expression and protein release in a culture medium during the reconstruction of the normal epidermis. (a) TSG-6-encoding mRNA expression of RHE at 1, 3, 5, 7, 9, and 11 days of growth assessed by RT-qPCR. Reference gene is *RPLP0* (mean \pm SD; $n = 3$; one-way ANOVA). (b) *TSG-6*, *PPIB* (CTL+), and *DapB* (CTL-) mRNA detection using in situ hybridization and hemalun counterstaining of day 11 RHE and normal human epidermis. Bar = 20 μ m. (c) TSG-6 protein concentration assayed using ELISA (mean \pm SD; $n = 4$; one-way ANOVA). CTL, control; RHE, reconstructed human epidermis.

Soluble TSG-6 protein dimerizes or interacts with ITI, and thereby becomes able to bind HA's N-acetyl glucosamine unit and favor cross-linking of HA chains in ECM (Baranova et al., 2011; Milner and Day, 2003; Milner et al., 2007). Interaction between TSG-6 and HA increases the affinity of HA for the CD44 receptor involved in KCs adhesion, proliferation, differentiation, and migration (Baranova et al., 2013; Bourguignon, 2014; Bourguignon et al., 2004; Kavasi et al., 2017; Lesley et al., 2004). CD44 also contributes to maintaining a pericellular matrix around KCs (Muto et al., 2019; Pasonen-Seppänen et al., 2012). Similar to CD44, TSG-6 holds HA in the pericellular matrix (Selbi et al., 2006), thereby controlling differentiation of, for example, fibroblasts (Simpson et al., 2009).

In this study, we investigated the human epidermis produced and challenged in vitro (Hennies and Poumay, 2021) to characterize the TSG-6 expression induced in such conditions. We then used genetic approaches to create *TSG-6*^{-/-} in vitro reconstructed epidermis and analyze the potential role for TSG-6. Data show a crucial impact of TSG-6 deficiency on epidermal HA.

RESULTS

TSG-6 is expressed and released at low levels in the culture medium of normal human epidermis

Reconstructed human epidermis (RHE) produced from primary KCs (Frankart et al., 2012) was analyzed for TSG-6-encoding mRNA expression and protein release in a culture medium during the whole reconstruction process (Figure 1).

RT-qPCR showed that TSG-6-encoding mRNA expression remained very low ($C_q > 32$). No significant induction of TSG-6-encoding mRNA was observed (Figure 1a). Accordingly, in situ hybridization was unable to detect TSG-6-encoding mRNA in normal RHE and human epidermis (Figure 1b). Secreted TSG-6 protein levels were monitored, and small amounts were detected in the culture medium during the reconstruction process (Figure 1c).

TSG-6 expression and release strongly increase on exposure of RHE to challenging conditions

To monitor TSG-6 regulation in inflammatory settings, two very different challenging conditions were imposed on RHE to analyze the tissue response.

A first challenge, mimicking AD by deprivation of plasma membrane cholesterol followed by incubation with T helper type (Th) 2 ILs and exhibiting barrier alterations (De Vuyst et al., 2018) were selected on the basis of previous transcriptomic analysis (Hubaux et al., 2018; Park et al., 2021). In response to IL-4, IL-13, and IL-25 incubation for 48 hours, *TNFAIP6* appeared as the sixth most upregulated gene, with a 27-fold increase in expression and a P -value of 1.37×10^{-8} . Results are accessible at Gene Expression Omnibus (GEO) Series (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE149638>; GSE149639). Unlike control tissues, AD-like RHE exhibited spongiosis and hypogranulosis (Figure 2a) and brighter detection of HA around KCs (Figure 2b). Analysis of TSG-6-encoding mRNA expression revealed an approximately 90-fold induction in

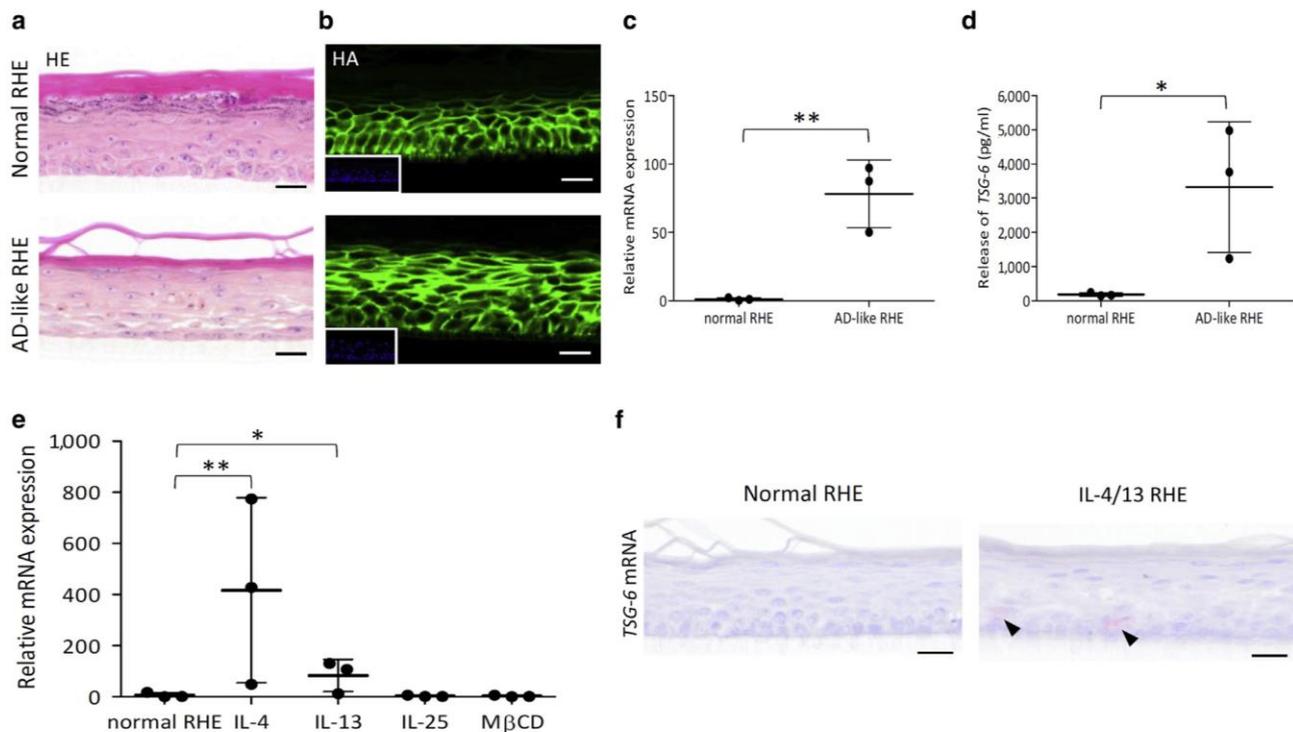


Figure 2. Increase of TSG-6-encoding mRNA and protein in challenged RHE (AD-like RHE model). RHEs were treated with MβCD and IL-4, IL-13, and IL-25 for 48 hours. (a) HE staining and (b) HA detection. Bar = 20 μm. (c) TSG-6-encoding mRNA expression of AD-like RHE assessed by RT-qPCR (mean ± SD; n = 3; Student *t*-test; ***P* < 0.01). (d) TSG-6 protein concentration of challenged RHE assayed using ELISA (mean ± SD; n = 3; Student *t*-test; **P* < 0.05). (e) TSG-6-encoding mRNA expression of RHE treated for 48 hours by ILs or MβCD separately assessed by RT-qPCR (mean ± SD; n = 3; one-way ANOVA; **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. normal RHE). (f) TSG-6 and *PPIB* (CTL+) mRNA detection using in situ hybridization and hemalun counterstaining of RHE challenged or not challenged with IL-4 and IL-13. AD, atopic dermatitis; HA, hyaluronan; HE, hemalun/eosin; MβCD, methyl-β-cyclodextrin; RHE, reconstructed human epidermis.

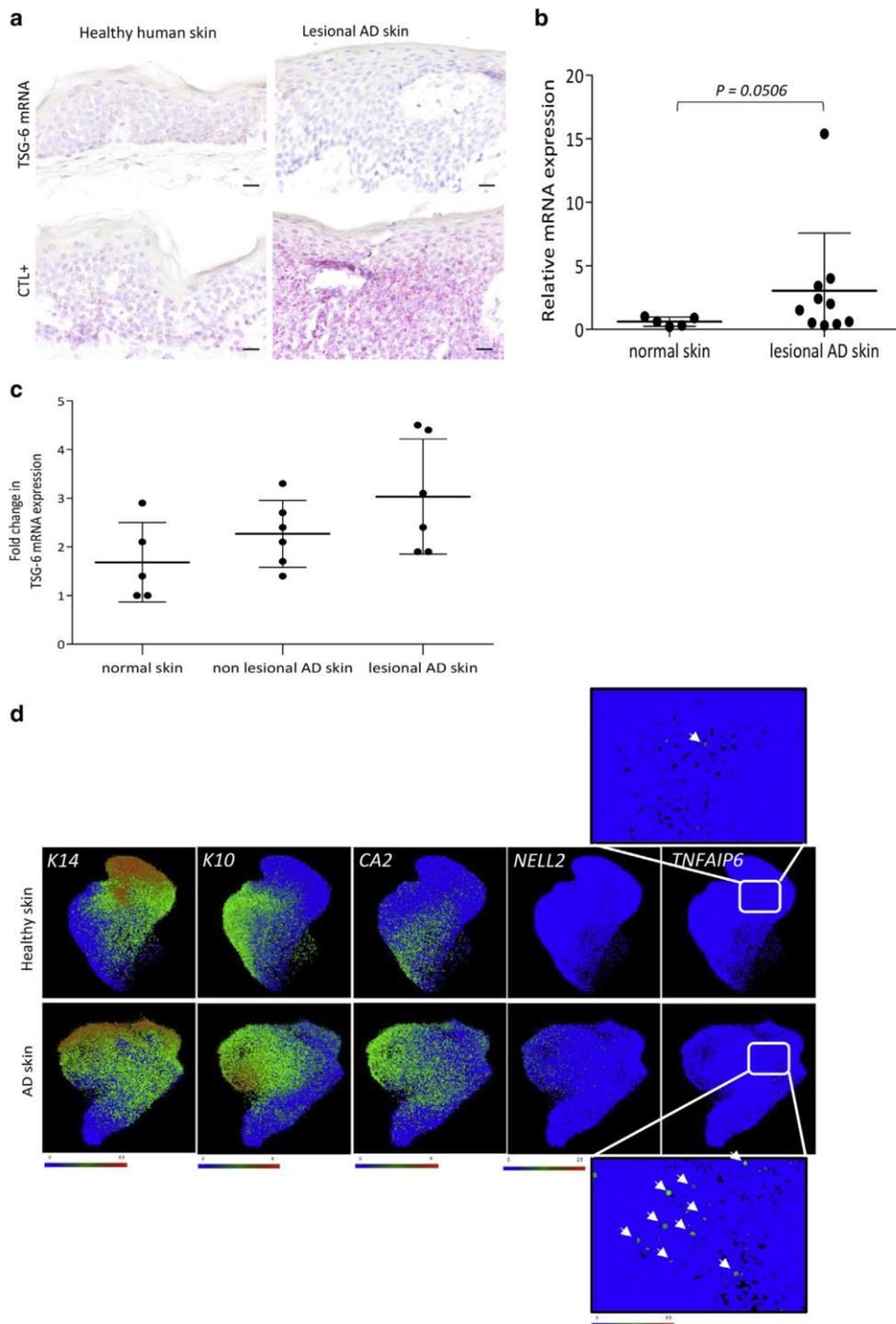
AD-like RHE compared with that of the controls (Figure 2c). The amount of TSG-6 protein released in the culture medium corroborated increased epidermal expression (Figure 2d). TSG-6-encoding mRNA expression in RHE incubated for 48 hours with either IL-4, IL-13, or IL-25 or with methyl-β-cyclodextrin identified IL-4 as the stronger inducer of TSG-6 expression, whereas IL-25 and methyl-β-cyclodextrin had no effect (Figure 2e). Thus, IL-4 and IL-13 were chosen to stimulate TSG-6 expression. In accordance with RT-qPCR data, TSG-6-encoding mRNA were detected using in situ hybridization in living layers of RHE challenged with IL-4 and IL-13 (Figure 2f). Conversely, addition of TNF-α in the culture medium of RHE did not induce TSG-6 expression (unpublished observations). In skin biopsies from lesional areas of patients with AD and from healthy controls, in situ hybridization was not sensitive enough to detect TSG-6-encoding mRNA (Figure 3a). However, RT-qPCR analysis of biopsies revealed increased TSG-6-encoding mRNA levels in lesional AD compared with that in the normal skin with a *P*-value as low as 0.0506 (Figure 3b). This increase in TSG-6 expression in the skin of patients suffering from AD is also detected in large-scale analyses. A search of GEO Profiles databases (Edgar et al., 2002) highlighted an increase in TSG-6 expression (GEO accession GSE5667 [Plager et al., 2010]) (Figure 3c). Likewise, transcriptomic analysis of a single-cell RNA

sequencing (RNA-seq) dataset allowed a precise study of mRNA expression in undifferentiated and differentiated KCs of healthy and lesional AD skins (Reynolds et al., 2021; https://developmentcellatlas.ncl.ac.uk/datasets/hca_skin_portal). As expected, expression of *CA2* and *NELL2*, two typical hallmarks of AD lesions, was detected in more AD KCs than in normal KCs. In parallel, TSG-6-encoding mRNA was present in some undifferentiated AD KCs, whereas the signal was barely detectable in healthy cells (Figure 3d).

A second challenge imposed on RHE consisted in superficial infection by *Trichophyton rubrum*, which induces cytokine release in concomitance with the significant induction of expression and release of TSG-6 protein (Faway et al., 2019, 2017). After 4 days of infection, RHE becomes invaded by fungal elements only in the stratum corneum (Figure 4a). At the same time, the signal of HA seems higher around the KCs of infected RHE than around the control (Figure 4b). In parallel, TSG-6-encoding mRNA can be detected through in situ hybridization solely in infected RHE (Figure 4c) when its mRNA expression is significantly increased (induction of 46-fold) according to RT-qPCR analysis. Alongside, we found an interesting significant increase in the mRNA encoding LL37, an antimicrobial peptide that blocks the proinflammatory HA–toll-like receptor 4–CD44 axis (Morioka et al., 2008) (Figure 4d).

Figure 3. Increase of TSG-6-encoding mRNA in lesional AD skin.

(a) *TSG-6* and *PP1B* (CTL+) mRNA detection using in situ hybridization and hemalun counterstaining of healthy and lesional AD skin. Bar = 20 μ m. (b) *TSG-6*-encoding mRNA expression in normal and lesional AD skin assessed by RT-qPCR. The reference gene is *RPLP0* (mean \pm SD; n = 5 for normal skin and n = 10 for AD skin; unpaired *t*-test with Welch's correction). (c) *TSG-6*-encoding mRNA expression in normal, nonlesional AD, and lesional AD skins analyzed from GEO Profiles database (accession GSE5667; GPL96; 206026_s_at) (mean \pm SD; n = 5 or 6; one-way ANOVA). (d) UMAP visualization of undifferentiated and differentiated KC in healthy and lesional AD skins found in single-cell RNA-seq dataset (https://developmentcellatlas.ncl.ac.uk/datasets/hca_skin_portal) (n = 5). Normalized gene expressions of *K14*, *K10*, *CA2*, *NELL2*, and *TNFAIP6* are represented in green for a low expression and in red for a strong expression. AD, atopic dermatitis; CTL, control; GEO, Gene Expression Omnibus; K, keratin; KC, keratinocyte; RNA-seq, RNA sequencing; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection.



Generation, validation, and characterization of *TSG-6*^{-/-} N/TERT clones

To investigate the potential roles of epidermal TSG-6, we used CRISPR/Cas9 to disrupt the *TNFAIP6* gene in N/TERT KCs. RNA-seq analysis of epidermis reconstructed from N/TERT cells and stimulated with IL-4 and IL-13 showed a transcriptional profile similar to that of AD-like models made

of primary KCs (Table 1). RNA-seq data are accessible in ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>; E-MTAB-10095).

To generate deletions in the *TNFAIP6* gene, five targets were chosen in the first, third, and sixth exons (Figure 5a). DNA extracted from the pool of N/TERT KCs electroporated with Cas9/ribonucleoprotein was analyzed by PCR to

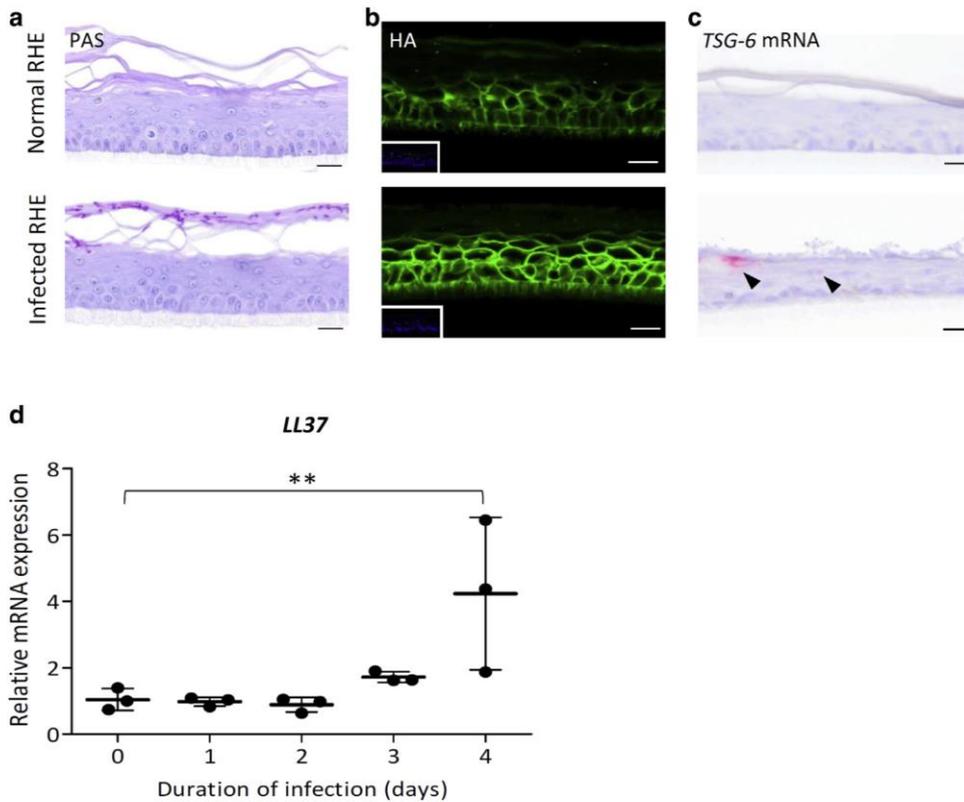


Figure 4. Elevated TSG-6-encoding mRNA expression and protein release in RHE infected by *Trichophyton rubrum* arthroconidia. RHEs were infected or not infected by *T. rubrum* arthroconidia and maintained in culture for 4 additional days. (a) PAS staining with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining and (b) HA detection. Bar = 20 μ m. (c) TSG-6-encoding mRNA detection using in situ hybridization and hemalun counterstaining. Bar = 20 μ m. (d) LL37 mRNA expression assessed by RT-qPCR. The reference gene is *RPLP0* (mean \pm SD; n = 3; one-way ANOVA; ** $P < 0.01$ vs. day 0). HA, hyaluronan; PAS, periodic-acid schiff; RHE, reconstructed human epidermis.

characterize deletions. Figure 5b illustrates the PCR data that revealed deletions at various sites. Among 100 clones sequenced and presenting many different mutations of several base pairs (not shown), two were selected for large deletions in both alleles of the *TNFAIP6* gene leading to probable null alleles. Genomic positions were defined by numbering nucleotide A of the methionine initiation codon as 1. The first clone *TNFAIP6*^{UN Δ 1/UN Δ 2} named N/TERT *TSG-6*^{-/-} (a) exhibits a UN Δ 1 deletion in allele 1 that encompasses nucleotide -120 (i.e., 44 nucleotides upstream of exon 1) to +21,696 and a UN Δ 2 deletion in allele 2 encompassing nucleotide +44 (in exon 1) to +21,635 (62 bases upstream from exon 6). The second clone *TNFAIP6*^{UN Δ 3/UN Δ 3} named N/TERT *TSG-6*^{-/-} (b) exhibits identical deletions in both alleles encompassing nucleotide +33 (in exon 1) to +21,695 (two nucleotides upstream from exon 6) (Figure 5c). Both clones encode putative peptides lacking LINK and CUB domains.

RHEs were produced using unedited *TSG-6*^{+/+} or deletants *TSG-6*^{-/-} (a) and *TSG-6*^{-/-} (b) N/TERT cells and were treated or not treated for 48 hours with IL-4 and IL-13. Both mutant *TSG-6*^{-/-} (a) and *TSG-6*^{-/-} (b) clones produced RHE with a functional barrier (not shown) and exhibited identical morphological features compared with unedited N/TERT cells, including localization of keratin 10, involucrin, loricrin, and FLG (Figure 6a). As expected, TSG-6-encoding mRNA was only overexpressed in the RHE produced with *TSG-6*^{+/+} N/TERT cells challenged with IL-4 and IL-13. Conversely, TSG-6-encoding mRNA was undetectable in the RHE produced with *TSG-6*^{-/-} (a) or *TSG-6*^{-/-} (b) N/TERT cells (Figure 6b). Using

in situ hybridization, TSG-6-encoding mRNA were solely detected in living layers of *TSG-6*^{+/+} N/TERT RHE challenged with IL-4 and IL-13 and were absent in knockout RHE (Figure 6c). A strong increase in TSG-6 protein level was found in the medium of challenged *TSG-6*^{+/+} N/TERT but not in mutant RHE (Figure 6d). Transcriptomes of *TSG-6*^{-/-} (a) and *TSG-6*^{-/-} (b) RHE challenged with IL-4 and IL-13 were compared with those of *TSG-6*^{+/+} RHE (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>; E-MTAB-10095), confirming suppressed *TNFAIP6* expression. Deletion of TSG-6 resulted in weak upregulation and downregulation in a few genes (Table 2). Among them, suppressed expression of kallikreins (KLKs) 5 and 8, confirmed by RT-qPCR analysis in clone *TSG-6*^{-/-} (b) (Figure 7), could indicate consequences on epidermal homeostasis and migration processes. Weak alterations in the gene expression observed after knocking out TSG-6 concurred with the normal morphology of *TSG-6*^{-/-} RHE.

Deficiency in TSG-6 protein slows down KC migration

Because some genes implicated in migration (KLK5 and 8) were suppressed in *TSG-6*^{-/-} RHE and because *Tsg-6*^{-/-} mice show delayed wound closure (Shakya et al., 2020), the migrative ability of knocked-out TSG-6 KCs was monitored in a scratch assay. *TSG-6*^{-/-} (a) N/TERT KCs migrated more slowly than *TSG-6*^{+/+} KCs, being unable to close the scratch within 24 hours. Migration of *TSG-6*^{-/-} (b) N/TERT KCs was also slower than that of nonedited N/TERT cells (Figure 8a). The migration defect was partially restored in the presence of recombinant TSG-6 (Figure 8b).

Table 1. Transcriptomic Analysis of Epidermis Reconstructed from N/TERT Cells and Stimulated or Not with IL-4 and IL-13 through RNA Sequencing

Gene	Name	log ₂ FC	P _{adj}
<i>CISH</i>	Cytokine inducible SH2 containing protein	3.07684025	0.000E+00
<i>ANO1</i>	Anoctamin 1	2.80591740	1.042E-219
<i>SLC16A14</i>	Solute carrier family 16 member 14	4.47550706	8.627E-192
<i>CA2</i>	Carbonic anhydrase 2	2.18654582	1.411E-188
<i>CTSC</i>	Cathepsin C	1.54462245	5.680E-123
<i>GLDC</i>	Glycine decarboxylase	6.48425833	7.039E-122
<i>SLC26A2</i>	Solute carrier family 26 member 2	1.42119675	7.896E-113
<i>AC100801.2</i>		2.67582484	4.386E-86
<i>C1QTNF1</i>	C1q and TNF related 1	2.76558625	2.474E-85
<i>TNFAIP6</i>	TNF alpha-induced protein 6	4.61410057	1.402E-80
<i>BCL2L15</i>	BCL2 like 15	4.38693821	1.861E-75
<i>DIO2</i>	Iodothyronine deiodinase 2	-1.38620973	8.042E-75
<i>ST6GAL1</i>	ST6 beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	1.94904986	5.983E-73
<i>EGR3</i>	Early growth response 3	-1.43824080	1.248E-70
<i>KRT16</i>	Keratin 16	1.76615476	1.724E-67
<i>HRH1</i>	Histamine receptor H1	2.04522544	1.800E-60
<i>POSTN</i>	Periostin	2.96569063	9.221E-60
<i>ETS2</i>	ETS proto-oncogene 2, transcription factor	-0.97990996	3.121E-59
<i>EGLN3</i>	Egl-9 family hypoxia inducible factor 3	1.90222718	7.334E-58
<i>APOL6</i>	Apolipoprotein L6	1.11187734	1.488E-57
<i>LBH</i>	LBH regulator Of WNT signaling pathway	1.63185691	3.760E-57
<i>MXRA5</i>	Matrix remodeling associated 5	-1.75646450	7.512E-56
<i>RGMB</i>	Repulsive guidance molecule BMP coreceptor B	1.27097907	8.026E-56
<i>NEK6</i>	NIMA related kinase 6	1.46907088	4.158E-55
<i>C1orf68</i>	Chromosome 1 open reading frame 68	-2.17535843	5.709E-54
<i>NELL2</i>	Neural EGFL like 2	2.77669873	1.809E-52
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-2.48531923	2.546E-51
<i>GCNT3</i>	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	2.13974316	1.036E-50
<i>MAP3K14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14	1.62240356	1.088E-50
<i>DUOX2</i>	Dual oxidase 2	2.12196856	3.027E-50
<i>PADI3</i>	Peptidyl arginine deiminase 3	1.83977015	5.216E-50
<i>CD59</i>	CD59 molecule (CD59 blood group)	0.75327573	1.087E-49
<i>KRT4</i>	Keratin 4	1.99977131	1.734E-49
<i>BMP4</i>	Bone morphogenetic protein 4	2.53670445	1.151E-47
<i>BTBD3</i>	BTB domain containing 3	0.78079374	1.162E-47
<i>AREG</i>	Amphiregulin	-1.47407342	7.747E-47
<i>PDE6A</i>	Phosphodiesterase 6A	2.22277344	1.398E-46
<i>DENN4A</i>	DENN domain containing 4A	0.83293501	1.443E-44
<i>CCN1</i>	Cellular communication network factor 1	-1.81412009	2.467E-44
<i>SORL1</i>	Sortilin related receptor 1	0.96862192	5.845E-44
<i>BCL10</i>	BCL10 immune signaling adaptor	-1.01814850	9.519E-44
<i>RASGRP1</i>	RAS guanyl releasing protein 1	1.15867682	1.093E-43
<i>CXCL2</i>	C-X-C motif chemokine ligand 2 (IL-2)	-3.20712371	7.322E-43
<i>HBEGF</i>	Heparin-binding EGF like growth factor	-1.92196976	1.046E-42
<i>FLT1</i>	Fms related receptor tyrosine kinase 1	2.52370748	1.357E-42
<i>LGALS1</i>	Galectin like	-0.93501839	3.556E-42
<i>CASP14</i>	Caspase 14	-1.20133651	6.805E-41
<i>CTSH</i>	Cathepsin H	-1.48572279	8.798E-40
<i>TXN</i>	Thioredoxin	1.09419641	2.633E-39

Abbreviations: P_{adj}, adjusted P; FC, fold change; RHE, reconstructed human epidermis.

List of 50 more regulated genes in IL-4- and IL-13-challenged RHE compared with nonstimulated RHE based on P_{adj}-value.

Deficiency in TSG-6 protein is responsible for enhanced leakage of HA from the epidermis

The effect of TSG-6 deficiency on the synthesis and degradation of HA as well as on HA partners (CD44 and ITIH5)

was investigated at the mRNA level. No alteration in knock-out tissues was observed (Figure 9). CD44 and HAS3 appeared overexpressed in both *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} tissues stimulated with IL-4 and IL-13, in accordance with

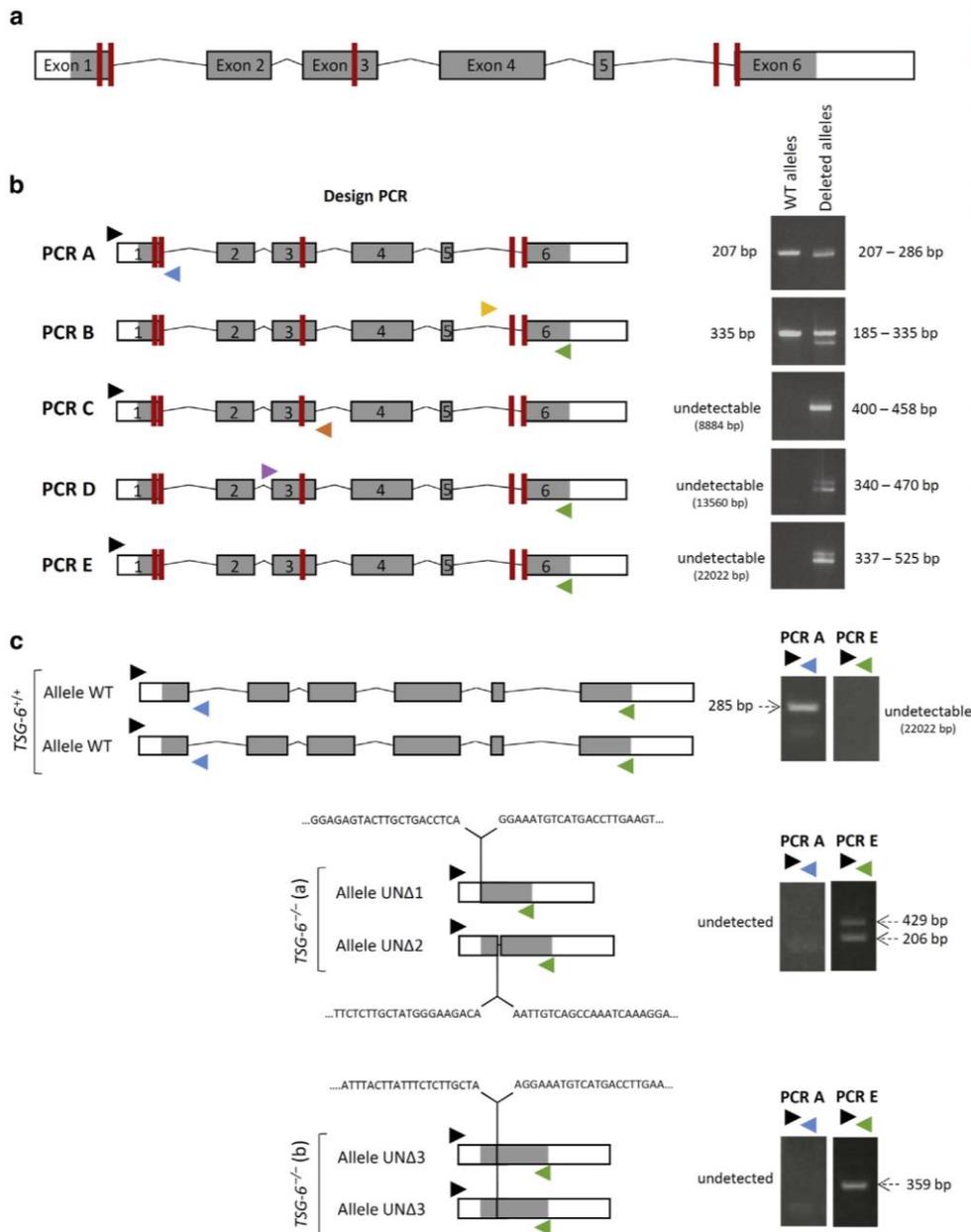


Figure 5. Deletions in *TNFAIP6* gene using CRISPR/Cas9 genome editing in N/TERT KC. (a) Genomic organization of *TNFAIP6* gene using the localization of five sites targeted by crRNA (red bars). (b) PCR screening of deletions in DNA from a pool of N/TERT cells electroporated with a mixture of five crRNA (red bars) and Cas9. Primers are indicated by arrowheads. Obtained amplicon sizes of WT and deletant alleles are shown on the right. (c) Genomic deletions in *TSG-6*^{-/-} clone (a) and clone (b) using primer combinations PCR A and PCR E illustrated in panel b. All PCR products have been sequenced. Only the sequences of the junctions are shown. bp, base pair; crRNA, CRISPR RNA; KC, keratinocyte; WT, wild-type

previous results (De Vuyst et al., 2018; do Nascimento Pedrosa et al., 2017; Malaisse et al., 2014).

Because HAS3 is enhanced in RHE exposed to IL-4 and IL-13 and produces proinflammatory low-molecular-weight HA fragments (Weigel et al., 1997), HA released in the culture medium was analyzed using size exclusion chromatography (Figure 10). In control conditions, both *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} molecular-weight distribution of HA revealed similar profiles with a peak around 500 kDa (Figure 10a). When RHEs were stimulated with IL-4 and IL-13, the size of HA slightly shifted to lower molecular weights in both non-edited and knock-out tissues (Figure 10b).

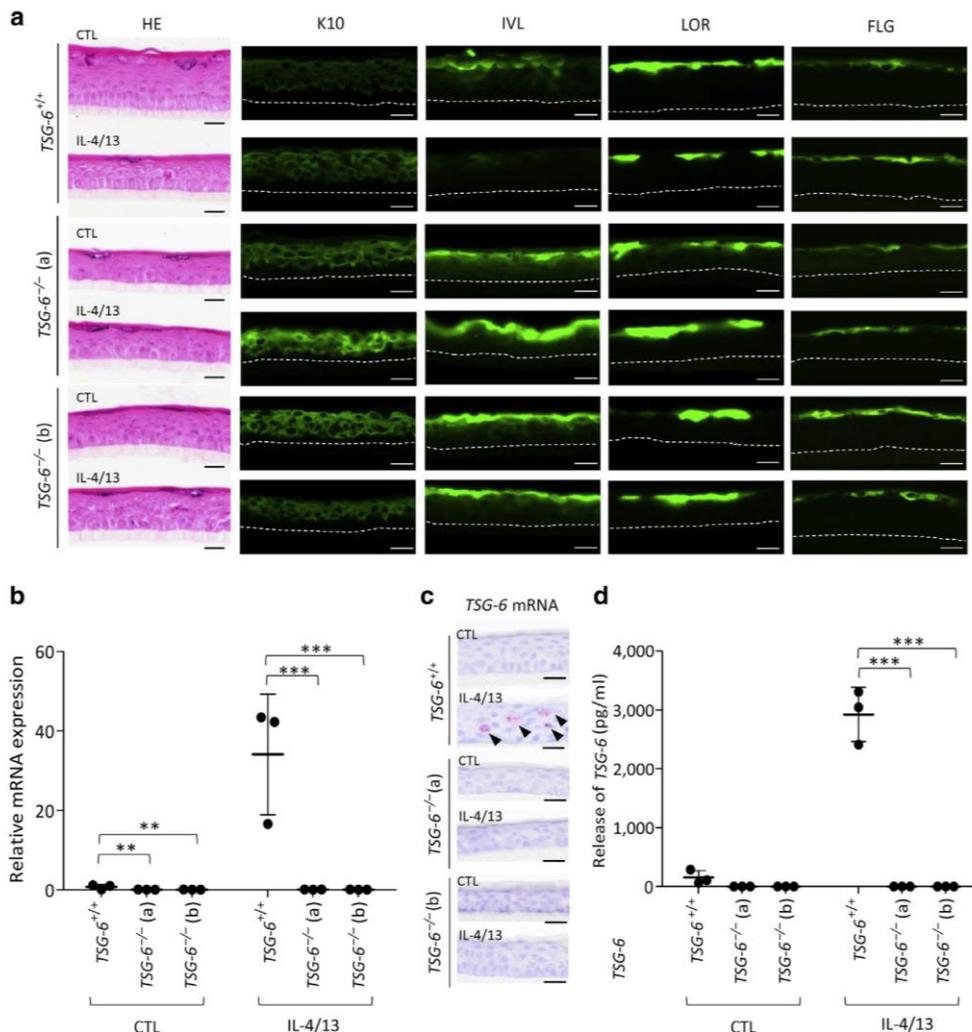
Morphologically, HA distribution inside *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} tissues appeared similar. However, the intensity of

the HA fluorescent signal was weaker in *TSG-6*^{-/-} than in *TSG-6*^{+/+} RHE (Figure 11a). This concurred with a larger HA amount released into the culture medium from *TSG-6*^{-/-} than that from *TSG-6*^{+/+} RHE, especially after IL-4 and IL-13 treatment (Figure 11b). Simultaneously, the amount of HA inside *TSG-6*^{-/-} RHE was reduced, although it was nonsignificant (Figure 11c). The distribution of HA was similar in *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} RHE infected with dermatophytes, and HA leakage was increased from infected *TSG-6*^{-/-} RHE, concomitantly with a reduced content inside tissues. However, the differences were nonsignificant (Figure 12).

To reintroduce TSG-6 in knocked-out tissues, knocked-out cells were mixed with nonedited N/TERT cells in varying proportions while reconstructing tissues (Figure 13).

Figure 6. Validation and characterization of the two clones exhibiting large deletions in the *TNFAIP6* gene. *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} (a and b) RHE stimulated or not stimulated for 48 hours with IL-4 and IL-13. (a) HE staining and immunofluorescence (in green) of K10, IVL, LOR, and FLG. Bar = 20 μm. (b) *TSG-6*-encoding mRNA expression of *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} RHE assessed by RT-qPCR. The reference gene is *RPLP0* (mean ± SD; n = 3; two-way ANOVA; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 vs. *TSG-6*^{+/+}).

(c) *TSG-6*-encoding mRNA detection using in situ hybridization and hemalun counterstaining of *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} RHE. Bar = 20 μm. (d) *TSG-6* protein concentration of *TSG-6*^{+/+} and *TSG-6*^{-/-} RHE assayed using ELISA (mean ± SD; n = 3; two-way ANOVA; ****P* < 0.001 vs. *TSG-6*^{+/+}). CTL, control; HE, hemalun/eosin; IVL, involucrin; K, keratin; LOR, lorincrin; RHE, reconstructed human epidermis.



Interestingly, HA leakage from *TSG-6*^{-/-} tissues was rescued depending on the proportion of TSG-6-producing cells (Figure 13).

For yet unidentified reason, clone *TSG-6*^{-/-} (a) constantly releases a higher amount of HA than clone *TSG-6*^{-/-} (b) as shown in Figures 11b and 14a despite similar expression levels of HASs and hyaluronidases (Figure 9).

In addition, pericellular HA was quantified. The RHE model does not allow to distinguish pericellular from intracellular compartment. Therefore, HA distribution was studied using monolayer cultures stimulated or not with IL-4 and IL-13 for 48 hours at the confluence. Whereas HA released in the culture medium of *TSG-6*^{-/-} monolayers (Figure 14a) was increased in response to treatment, pericellular (Figure 14b) or intracellular (Figure 14c) HA was significantly reduced.

DISCUSSION

In normal conditions, TSG-6 is weakly expressed in mouse and human skin (Shakya et al., 2020; Tan et al., 2011). During in vitro reconstruction of the human epidermis, TSG-6 expression remains very weak as well.

In infected RHE, TSG-6 expression is induced in response to recognition of fungal elements by toll-like receptors, leading to production of antimicrobial peptides and cytokines such as TNF-α (Faway et al., 2019; Lee et al., 1990). TSG-6 expression is also induced in RHE exposed to Th2 cytokines to mimic typical features of AD epidermis (do Nascimento Pedrosa et al., 2017), and HA production simultaneously increases as a result of HAS3 overexpression (De Vuyst et al., 2018; Malaisse et al., 2014). In vivo, TSG-6 expression is increased in lesional AD skin and in contact dermatitis (GEO accession GSE57225 [Quaranta et al., 2014] and GEO accession GSE711996 [Tan et al., 2017]) and is upregulated in Th1/Th17 diseases such as psoriasis (GEO accession GSE166388) and wound healing (GEO accession GSE50425). Altogether, these observations show the involvement of TSG-6 in many inflammatory conditions.

To understand the role of epidermal TSG-6, deletions in the *TNFAIP6* gene were carried out by CRISPR/Cas9 in N/TERT KCs. This immortalized human cell line was chosen because it allows for proper reconstruction of epidermis able to respond to Th2 cytokines (Dickson et al., 2000; Moran et al.,

Table 2. Transcriptomic Analysis of TSG-6^{-/-} Epidermis through RNA Sequencing

ID	Gene	TSG-6 ^{-/-} (a)		TSG-6 ^{-/-} (b)	
		log ₂ FC	P _{adj}	log ₂ FC	P _{adj}
ENSG00000123610	<i>TNFAIP6</i>	-7.41503	2.96E-32	-7.32736	3E-30
ENSG00000234444	<i>ZNF736</i>	-4.44636	2.81E-22	-4.69333	3.14E-18
ENSG00000170430	<i>MGMT</i>	-4.33712	8.06E-16	-4.18849	3.18E-12
ENSG00000105750	<i>ZNF85</i>	-3.87594	3.01E-37	-2.40597	9.47E-27
ENSG00000144115	<i>THNSL2</i>	-3.86052	2.91E-15	-3.78559	1.02E-13
ENSG00000187210	<i>GCNT1</i>	-3.0438	6E-50	-2.61444	6.09E-38
ENSG00000011465	<i>DCN</i>	-2.82165	1.1E-84	-1.5491	3.33E-29
ENSG00000188257	<i>PLA2G2A</i>	-2.7461	1.93E-24	-2.00917	1.94E-14
ENSG00000177990	<i>DPY19L2</i>	-2.37162	3.21E-10	-2.42415	6.58E-09
ENSG00000153802	<i>TMPRSS11D</i>	-2.35278	9.53E-15	-1.24544	0.00015
ENSG00000129455	<i>KLK8</i>	-2.27628	3.22E-18	-1.70997	1.05E-10
ENSG00000122691	<i>TWIST1</i>	-2.26396	2.75E-06	-2.35514	8.97E-08
ENSG00000103546	<i>SLC6A2</i>	-2.23051	1.73E-11	-1.01528	0.002253
ENSG00000102837	<i>OLFM4</i>	-2.10858	1.07E-09	-2.29476	3.6E-09
ENSG00000188868	<i>ZNF563</i>	-2.01096	1.75E-17	-2.394	7.67E-21
ENSG00000244242	<i>IFITM10</i>	-1.93999	6.41E-12	-1.9349	1.62E-10
ENSG00000153292	<i>ADGRF1</i>	-1.93659	6.88E-08	-1.08517	0.008469
ENSG00000206195	<i>DUXAP8</i>	-1.88083	3.76E-05	-2.0841	6.63E-07
ENSG00000213096	<i>ZNF254</i>	-1.8603	1.41E-38	-1.78	1.78E-33
ENSG00000260027	<i>HOXB7</i>	-1.72059	2.43E-05	-2.21449	1.82E-05
ENSG00000081803	<i>CADPS2</i>	-1.64989	2.05E-05	-1.67567	1.61E-05
ENSG00000237440	<i>AC008554.1</i>	-1.61936	0.000136	-2.20067	5.76E-08
ENSG00000105357	<i>MYH14</i>	-1.48954	1.63E-16	-1.0035	3.51E-07
ENSG00000101017	<i>CD40</i>	-1.47799	5.85E-06	-2.08413	1.64E-08
ENSG00000172478	<i>MAB21L4</i>	-1.44783	9.05E-36	-1.82477	1.8E-52
ENSG00000197647	<i>ZNF433</i>	-1.36208	5.15E-08	-2.48496	3.31E-17
ENSG00000167754	<i>KLK5</i>	-1.34785	2.03E-16	-1.92299	1.2E-30
ENSG00000198182	<i>ZNF607</i>	-1.344	3.92E-17	-1.09462	7.89E-11
ENSG00000250644	<i>AC068580.4</i>	-1.33136	8.21E-07	-1.14364	0.000121
ENSG00000160284	<i>SPATC1L</i>	-1.27579	0.001851	-1.65145	0.000263
ENSG00000196263	<i>ZNF471</i>	-1.20779	9.05E-05	-1.20674	0.000435
ENSG00000077063	<i>CTTNBP2</i>	-1.16597	7.2E-06	-2.10572	5.59E-12
ENSG00000235584	<i>AC008268.1</i>	-1.15826	2.67E-07	-1.34538	1.76E-08
ENSG00000091656	<i>ZFHX4</i>	-1.14386	0.00455	-1.27665	0.005149
ENSG00000196172	<i>ZNF681</i>	-1.13207	3.24E-16	-1.08222	1.35E-13
ENSG00000150687	<i>PRSS23</i>	-1.04503	8.83E-14	-1.57255	8.84E-28
ENSG00000139445	<i>FOXP4</i>	-1.03112	0.000567	-1.48352	3.45E-06
ENSG00000219665	<i>ZNF433-AS1</i>	-1.0184	0.003964	-1.37053	0.000331
ENSG00000130038	<i>CRACR2A</i>	4.155504	4.42E-37	1.339632	3.03E-05
ENSG00000007038	<i>PRSS21</i>	2.825615	4.82E-27	1.229979	3.46E-05
ENSG00000248370	<i>LINC02434</i>	2.61115	6.57E-43	1.637452	8.7E-16
ENSG00000150722	<i>PPP1R1C</i>	2.394706	1.72E-10	1.089967	0.003993
ENSG00000182389	<i>CACNB4</i>	2.179791	1.85E-23	1.175044	1.83E-06
ENSG00000131771	<i>PPP1R1B</i>	2.1777	1.76E-11	1.057933	0.004363
ENSG00000141753	<i>IGFBP4</i>	2.083609	1.45E-42	1.219661	3.22E-13
ENSG00000108176	<i>DNAJC12</i>	2.057347	2.89E-15	1.800988	4.46E-11
ENSG00000234929	<i>AC018685.2</i>	1.77764	1.76E-10	1.325183	1.51E-05
ENSG00000166897	<i>ELFN2</i>	1.660626	3.69E-06	1.268515	0.000785
ENSG00000153064	<i>BANK1</i>	1.481794	5.99E-08	1.306159	1.21E-05
ENSG00000100968	<i>NFATC4</i>	1.471711	2.94E-11	1.093399	9.51E-06
ENSG00000251003	<i>ZFPM2-AS1</i>	1.354186	3.59E-20	1.06091	2.67E-11
ENSG00000131634	<i>TMEM204</i>	1.305841	1.52E-10	2.388995	4.19E-33
ENSG00000164684	<i>ZNF704</i>	1.215393	4.55E-09	1.085985	1.47E-06
ENSG00000141622	<i>RNF165</i>	1.162247	7.5E-05	1.046022	0.001585

(continued)

Table 2. Continued

ID	Gene	TSG-6 ^{-/-} (a)		TSG-6 ^{-/-} (b)	
		log ₂ FC	P _{adj}	log ₂ FC	P _{adj}
ENSG00000179914	<i>ITLN1</i>	1.144014	0.000195	1.104532	0.001204
ENSG00000279108	<i>AC008537.3</i>	1.114701	0.001084	1.41162	0.000283
ENSG00000225968	<i>ELFN1</i>	1.04966	0.002312	1.356617	0.000548
ENSG00000172005	<i>MAL</i>	1.00604	0.000887	1.881428	3.6E-10

Abbreviations: P_{adj}, adjusted P; FC, fold change; RHE, reconstructed human epidermis.

List of commonly downregulated and upregulated genes in both IL-4- and IL-13-challenged TSG-6^{-/-} RHE compared with challenged TSG-6^{+/+} RHE (FC ≥ 2; P < 0.01).

2021; Rheinwald et al., 2002; Smits et al., 2017). Recently, genome editing was performed in N/TERT cells using Cas9 plasmids for studies of Harlequin ichthyosis (Enjalbert et al., 2020) to target the genes linked to glycan metabolism (Dabelsteen et al., 2020) and to knockout claudin 1 and CD40 (Moran et al., 2021). In this study, ribonucleoprotein/Cas9 complexes were preferred to plasmid to reach higher efficiency of gene editing and benefit from a lower occurrence of off targets (Farboud et al., 2018). Indeed, all analyzed N/TERT cell clones harbored mutations. Among them, two clones exhibiting major deletions that conduct to null alleles were chosen for further studies. No off-target effect was found by screening RNA-seq results.

TSG-6^{-/-} KCs were used for RHE production. These tissues exhibit normal morphology in accordance with the unaltered epidermal phenotype of Tsg-6-knockout mice (Fülöp et al., 2003). In control and challenging conditions, deficiency of TSG-6 has no severe impact on gene expression levels as revealed by transcriptomic analysis. We noticed that the expression of decorin, a proteoglycan playing a role in cutaneous inflammatory reactions (Bocian et al., 2013), is downregulated. Of interest, KLK5 and KLK8 involved in skin homeostasis, KCs migration, and wound remodeling (Kishibe et al., 2012; Nauroy and Nyström, 2020) are also downregulated.

In the scratch assay, whereas TSG-6^{-/-} N/TERT clone (b) shows a very discreet slowdown, the second clone (a) migrates more slowly than control cells, reminiscent of the

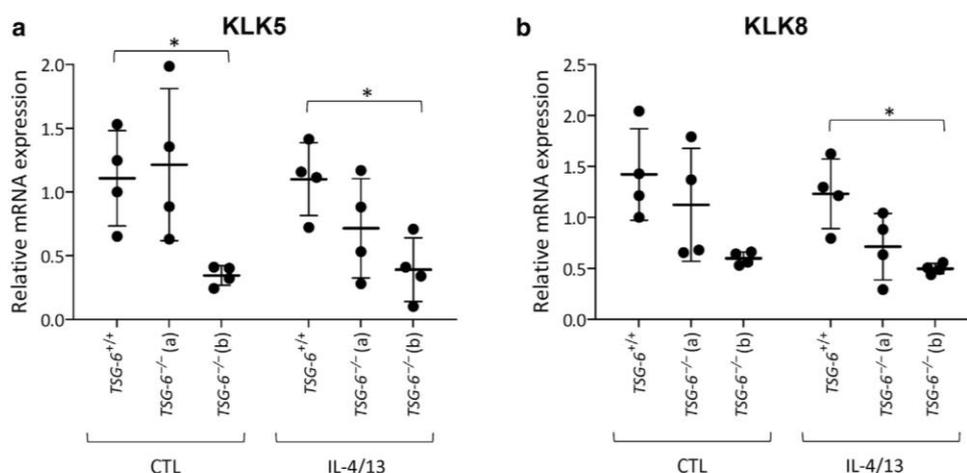
delayed wound closure in Tsg-6^{-/-} mouse skin (Shakya et al., 2020). The cell migration rate is partially restored by reintroduction of soluble recombinant TSG-6 in the medium, as reported with epithelial corneal cells (Lee et al., 2015).

Because the amount of HA is decreased in the pericellular matrix of TSG-6^{-/-} KCs, we hypothesize that the defect in migration could result from poor pericellular HA organization. A disorganized ECM was described around preovulatory follicles in Tsg-6-knockout mice (Fülöp et al., 2003). The HA interaction with its CD44 membrane receptor is facilitated by TSG-6 (Baranova et al., 2013), and this interaction promotes HA internalization together with proliferation and migration (Bourguignon, 2014; Csoka et al., 2001; Pasonen-Seppänen et al., 2012). TSG-6 deficiency may therefore influence the HA-CD44 signaling axis and pathways located downstream of other receptors such as EGFR (Perez et al., 2013).

In TSG-6^{-/-} RHE, a change in the localization of HA is observed. A large amount of HA diffuses into the subepidermal compartment, suggesting a role for TSG-6 in maintaining HA inside the tissue. HA leakage from the epidermis was already reported in skin equivalent models and was attributed to an improper organization of the basement membrane (Iriyama et al., 2021; Tammi et al., 2000). Nonetheless, Rosdy et al. (1993) had illustrated typical basal lamina elements in RHE. Because TSG-6 is not a constituent of the basement membrane, enhanced release of HA from

Figure 7. mRNA levels of KLK genes are decreased in TSG-6^{-/-} RHE.

TSG-6^{+/+} and TSG-6^{-/-} (a and b) RHEs were stimulated or not stimulated for 48 hours with IL-4 and IL-13. (a) KLK5 and (b) KLK8 mRNA expression assessed by RT-qPCR. The reference gene is *RPLP0* (mean ± SD; n = 4; two-way ANOVA; *P < 0.05 vs. TSG-6^{+/+}). CTL, control; KLK, kallikrein; RHE, reconstructed human epidermis.



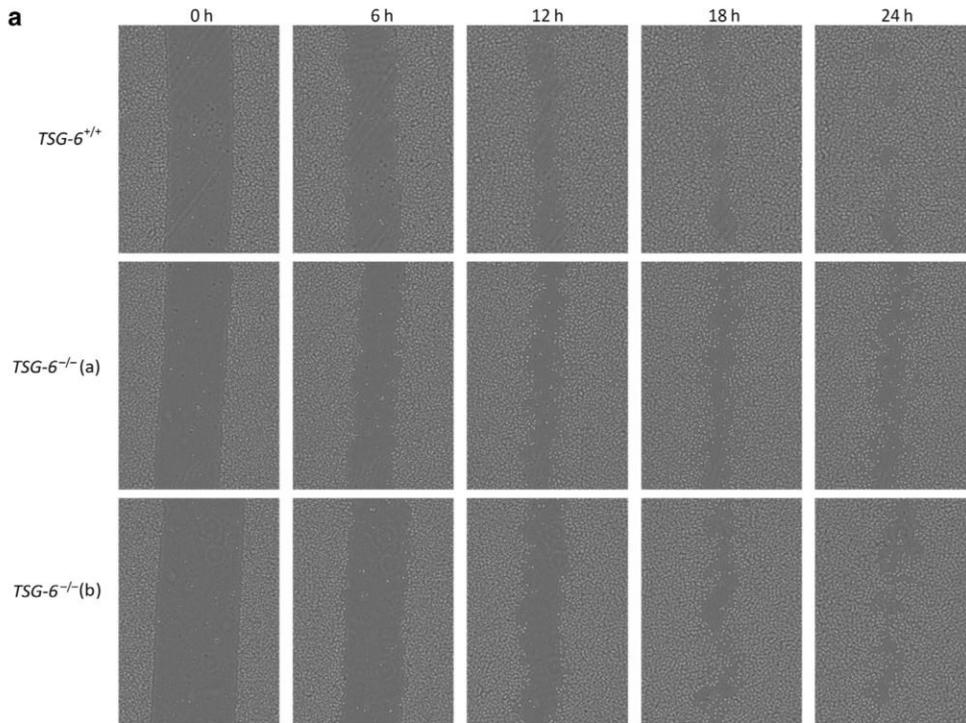
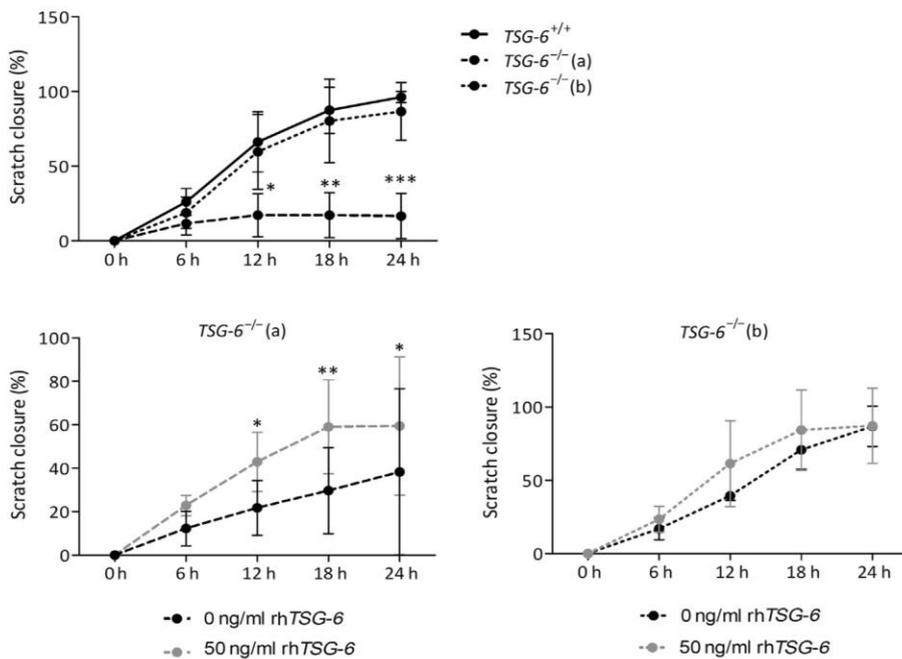


Figure 8. Lack of TSG-6 slows down KCs migration. Monolayers cultures of *TSG-6*^{+/+} or *TSG-6*^{-/-} (a and b) N/TERT KCs at confluence stage treated with IL-4 and IL-13 for 24 h. KCs were growth arrested by mitomycin C before performing a scratch. KCs migration was monitored for 24 h in the presence of IL-4 and IL-13. (a) Scratch closure was analyzed every 6 h by Cytonote and was quantified by ImageJ software (mean ± SD; n = 5; two-way ANOVA; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 vs. *TSG-6*^{+/+}). (b) Recombinant human TSG-6 protein (50 ng/ml) was added in the culture medium just after scratching monolayers cultures of *TSG-6*^{-/-} (a) and (b) cells (mean ± SD; n = 3 for *TSG-6*^{-/-} (a) and n = 4 for *TSG-6*^{-/-} (b); two-way ANOVA; **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. 0 ng/ml rhTSG-6). Scratch closure was monitored by Cytonote and quantified by ImageJ software. h, hour; KC, keratinocyte; rhTSG-6, recombinant human TSG-6.



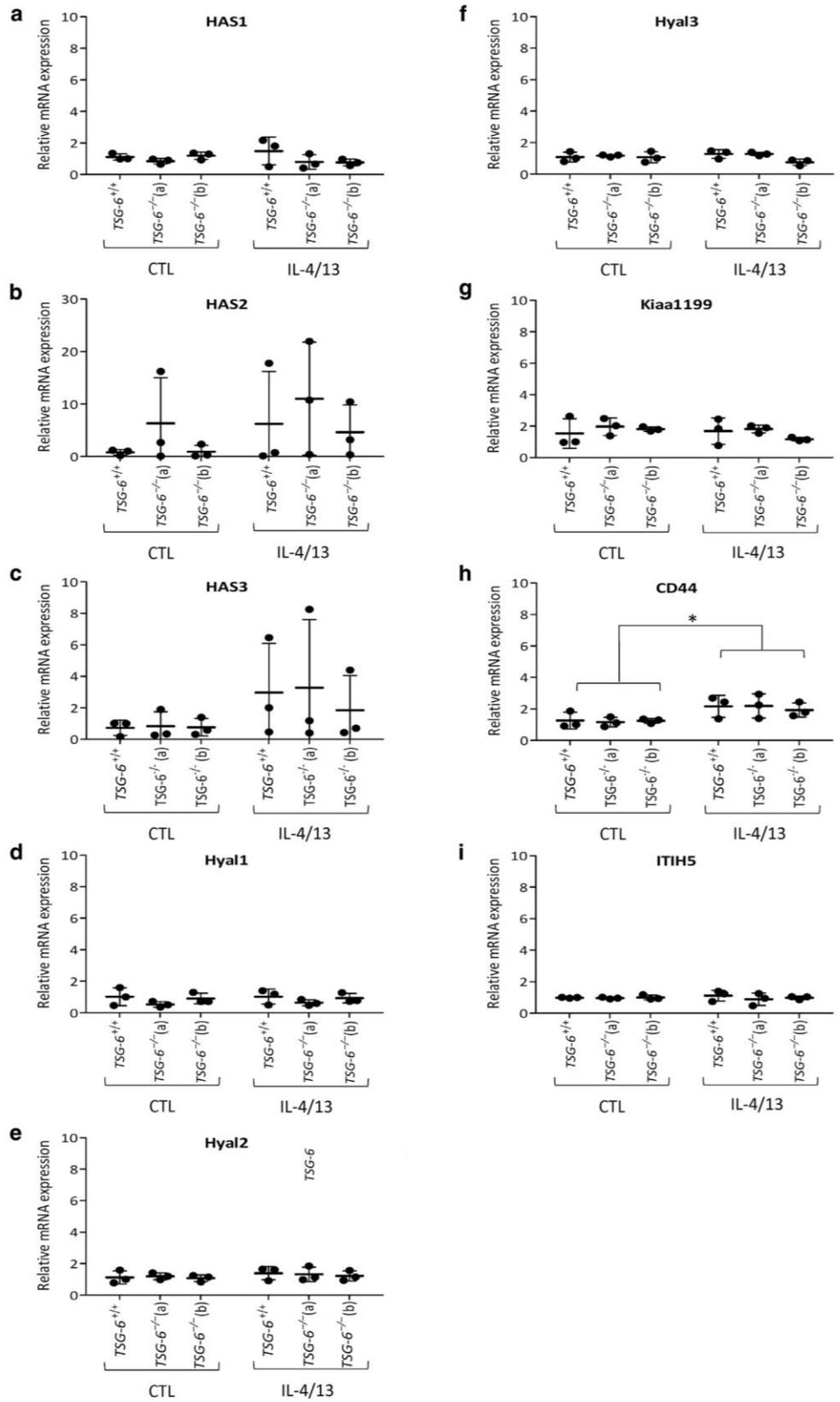
RHE made of *TSG-6*^{-/-} cells cannot be attributed to a lack of integrity or to an altered composition of the basement membrane. We propose that the lack of HA retention in ECM is a more likely explanation.

Future studies are required to complement the data obtained with our single-cell type in vitro model. Understanding the consequences of massive HA release due to the absence of TSG-6 on underlying dermal fibroblasts and

immune cells is of interest. For instance, recruitment and migration of immune cells to an inflammatory site depend on the CD44-mediated organization of HA into cables (Jokela et al., 2008; Kobayashi et al., 2020).

Our serum-free culture conditions do not allow to assess the enzymatic activity of TSG-6. Adding one source of ITI is required to investigate HA covalent cross-linking through a heavy chain. More precisely, the involvement

Figure 9. mRNA levels of genes related to HA are unchanged in TSG-6^{-/-} RHE. TSG-6^{+/+} and TSG-6^{-/-} (a and b) RHEs were stimulated or not stimulated for 48 hours with IL-4 and IL-13. (a) *HAS1*, (b) *HAS2*, (c) *HAS3*, (d) *Hyal1*, (e) *Hyal2*, (f) *Hyal3*, (g) *Kiaa1199*, (h) *CD44*, and (i) *ITIH5* mRNA expression assessed by RT-qPCR. The reference gene is *RPLPO* (mean ± SD; n = 3; two-way ANOVA; *P < 0.05). CTL, control; HA, hyaluronan; RHE, reconstructed human epidermis.



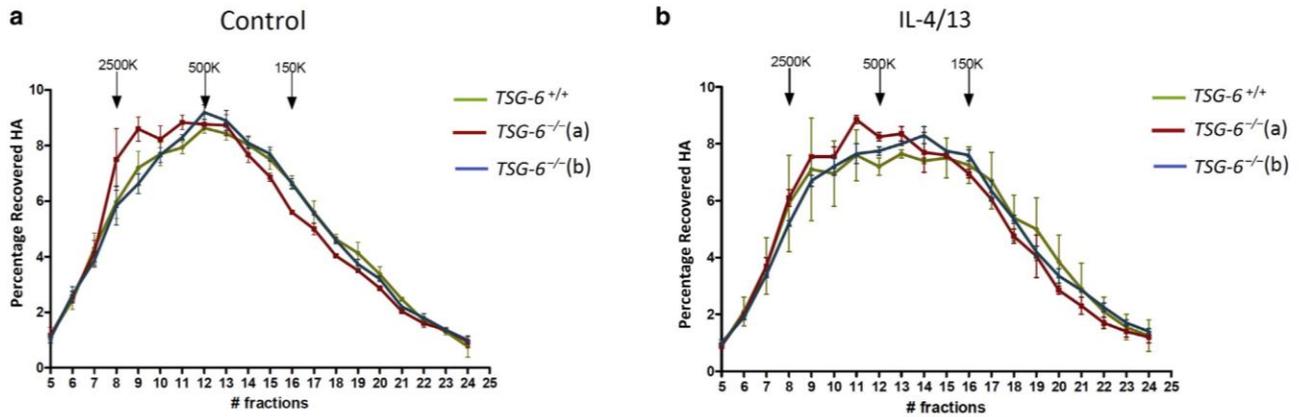


Figure 10. Similar molecular-weight distribution of HA released in the culture medium of normal and challenged *TSG-6^{-/-}* RHE. The culture medium of *TSG-6^{+/+}* and *TSG-6^{-/-}* (a and b) RHE (a) control or (b) treated with IL-4 and IL-13 for 48 hours was collected and chromatographed on a Sephacryl S-1000 column. HA fragments of 2,500, 500, and 150 kDa were used as standards. Graphs compared HA size distribution in each fraction (mean ± SD; n = 2). #, number of; HA, hyaluronan; K, thousand; RHE, reconstructed human epidermis.

of heavy chain 5 in ECM stabilization was shown in AD and psoriasis and should therefore be further analyzed (Huth et al., 2020).

In conclusion, our data suggest a role for TSG-6 in retaining HA in inflamed epidermis by interaction and cross-linking in the ECM, as shown in other tissues (Day and Milner, 2019). In AD lesions, Th2-stimulated production of TSG-6 could participate in HA accumulation between KCs (Malaisse et al., 2014) (Figure 15). More broadly, when interacting with ECM components, TSG-6 potentially modulates the presentation of GFs and cytokines to neighboring

receptors. In the epidermis, it could influence the signaling pathways related to HA (Kavasi et al., 2017) and play roles in inflammatory skin conditions.

MATERIALS AND METHODS

KCs origins, cultures, and reconstruction of the epidermis

Skin biopsies (University Hospital in Liège, Belgium) from patients with AD were collected on lesional zones as described (Mathay et al., 2011). Healthy skin biopsies and normal human KCs were isolated from abdominoplasties (Clinique St Luc, Namur, Belgium) as described (Minner et al., 2010). All samples were obtained after

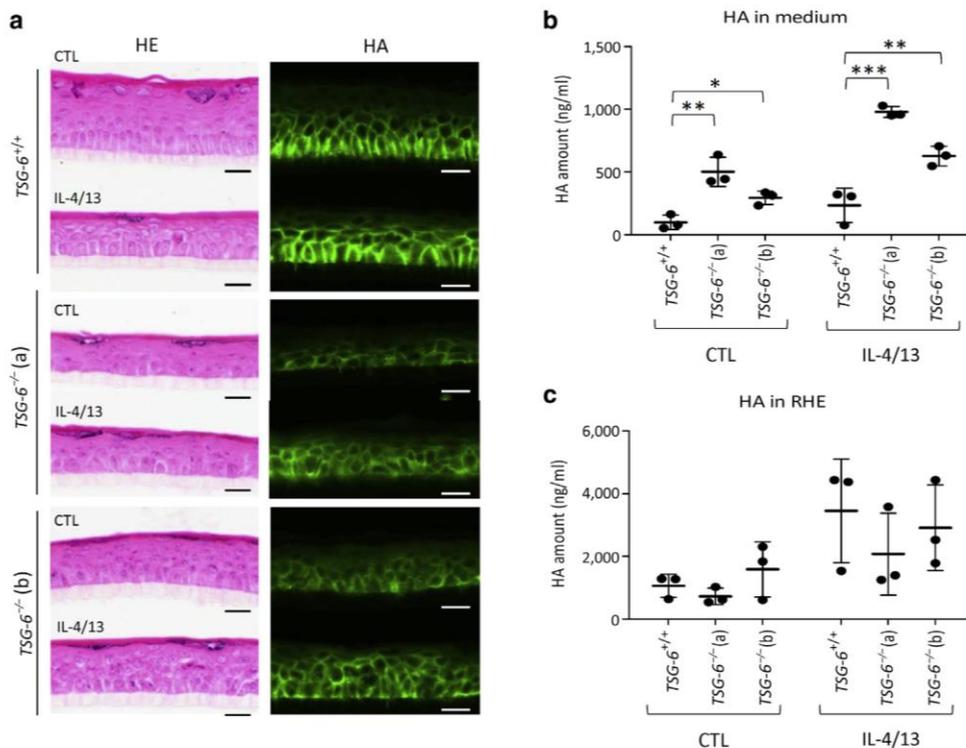
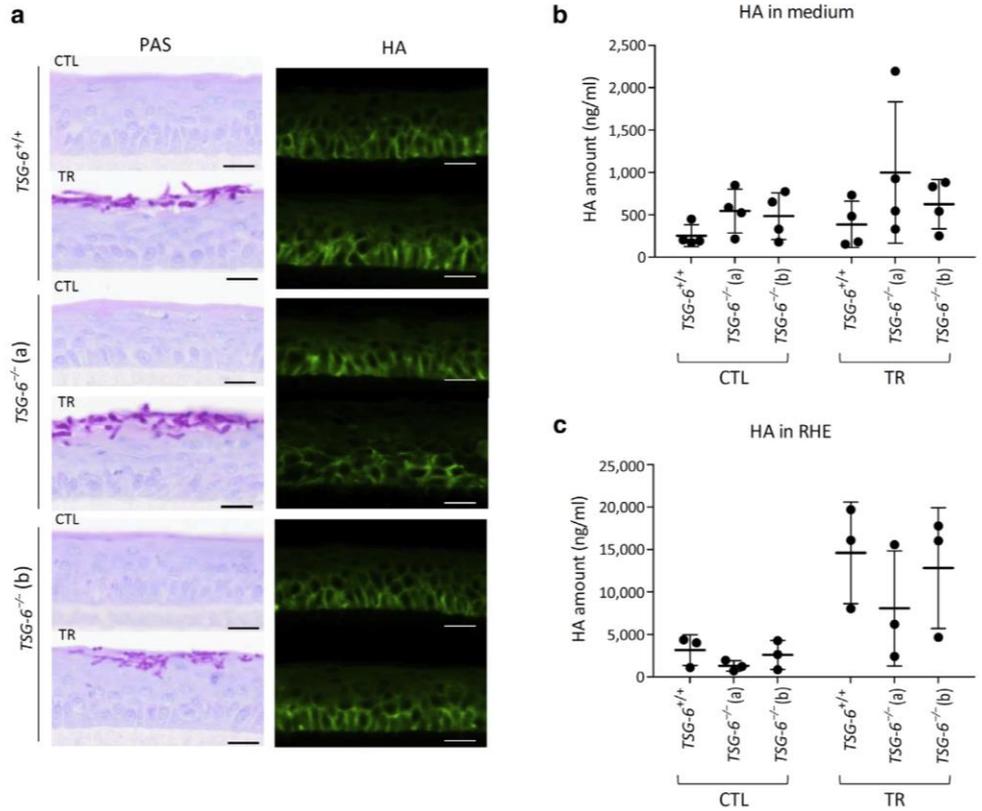


Figure 11. The change of HA localization in *TSG-6^{-/-}* RHE is enhanced in Th2-challenged conditions. *TSG-6^{+/+}* and *TSG-6^{-/-}* (a and b) RHEs were stimulated or not stimulated for 48 hours with IL-4 and IL-13. (a) HE staining and HA detection (green). Bar = 20 μm. (b) HA released in culture medium measured by ELISA-like assay (mean ± SD; n = 3; two-way ANOVA; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. *TSG-6^{+/+}*). (c) HA remaining inside RHE (mean ± SD; n = 3; two-way ANOVA). CTL, control; HA, hyaluronan; HE, hemalun/eosin; RHE, reconstructed human epidermis; Th, T helper type.

Figure 12. The change of HA localization in $TSG-6^{-/-}$ RHE seems to be enhanced by TR infection.

$TSG-6^{+/+}$ and $TSG-6^{-/-}$ (a and b) RHE infected or not infected with TR and recovered 4 days after infection. (a) PAS staining with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining and HA detection. Bar = 20 μ m. (b) HA released in culture medium measured by ELISA-like assay (mean \pm SD; n = 4; two-way ANOVA). (c) HA remaining inside RHE (mean \pm SD; n = 3; two-way ANOVA). CTL, control; HA, hyaluronan; PAS, periodic-acid schiff; RHE, reconstructed human epidermis; TR, *Trichophyton rubrum*.

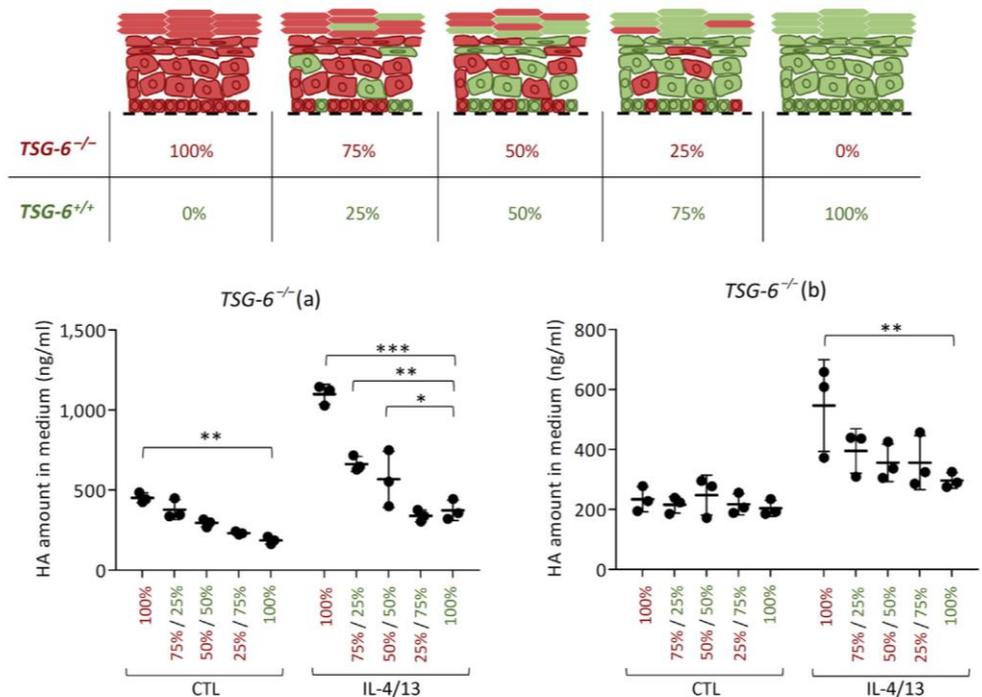


written informed consent, in accordance with Medical Ethical Committees of the University Hospital in Liège, Clinique St-Luc in Namur, and Saint-Louis Hospital in Paris (France) and according to

the Declaration of Helsinki Principles. Immortalized human KCs (N/TERT-1) were obtained from J.G. Rheinwald's laboratory (Dickson et al., 2000). Cells authenticity was assessed at ATCC

Figure 13. Introduction of $TSG-6^{+/+}$ cells in $TSG-6^{-/-}$ RHE can rescue HA leakage.

Schematic representation of $TSG-6^{-/-}$ rescue test: epidermis were reconstructed from different ratios of $TSG-6^{+/+}$ (green) and $TSG-6^{-/-}$ (red) KCs. HA released in the culture medium of epidermis reconstructed from mixtures of KCs $TSG-6^{+/+}$ and $TSG-6^{-/-}$ (a) or $TSG-6^{-/-}$ (b) was measured by ELISA-like assay (mean \pm SD; n = 3; two-way ANOVA; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 vs. $TSG-6^{+/+}$ 100%). CTL, control; HA, hyaluronan; KC, keratinocyte; RHE, reconstructed human epidermis.



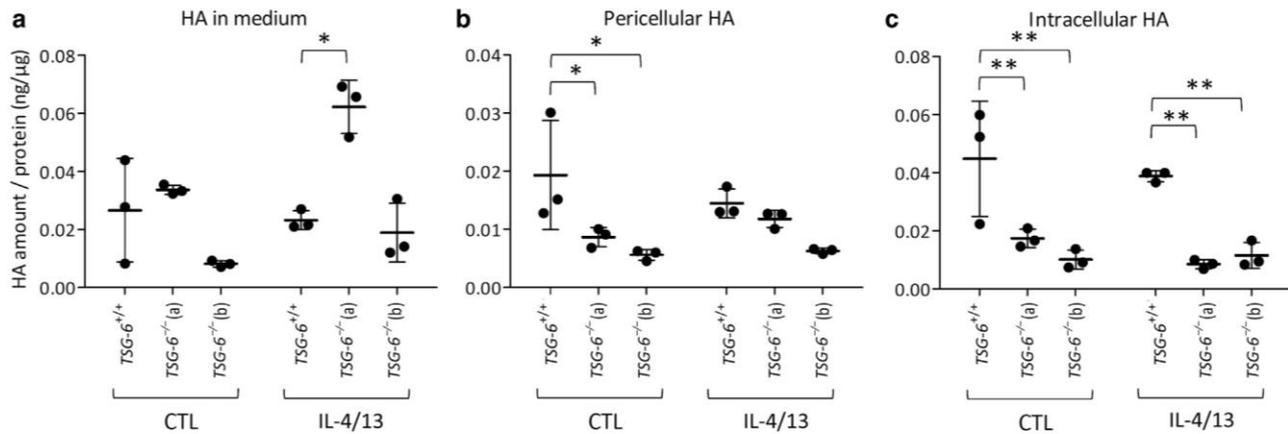


Figure 14. Change of HA localization in *TSG-6*^{-/-} KCs cultured in monolayers. Autocrine monolayers cultures of *TSG-6*^{+/+} or *TSG-6*^{-/-} (a and b) N/TERT KCs at confluence stage treated or not treated with IL-4 and IL-13 for 48 hours. HA amount (a) released in the culture medium present (b) in pericellular spaces and (c) in intercellular compartment measured by ELISA-like assay and relative to the total amount of protein (mean ± SD; n = 3; two-way ANOVA; **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. *TSG-6*^{+/+}). CTL, control; HA, hyaluronan; KC, keratinocyte.

(Manassas, VA) (<http://www.atcc.org>) by a comparison of an original frozen vial of cells (Bertrand-Vallery et al., 2010) with current cultured N/TERT cells. Normal and immortalized KCs were cultured as autocrine monolayer cultures (Minner et al., 2010) or were grown on a polycarbonate filter and exposed to the air–liquid interface for 11 days to produce a reconstructed epidermis (De Vuyst et al., 2014; Frankart et al., 2012). Whereas autocrine monolayers were cultured in EpiLife culture medium supplemented by amino acids (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and hydrocortisone (0.18 μg/ml; Sigma-Aldrich), RHEs were grown in EpiLife medium containing Human Keratinocytes Growth Supplement (Cascade Biologics, Mansfield, United Kingdom) and calcium ion (1.5 mM), KC GF (10 ng/ml) (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom), and vitamin C (50 mg/ml). Both cultures were maintained at 37 °C and 5% carbon dioxide.

Challenges applied to RHE to mimic AD or dermatophytosis

A described procedure was used to mimic AD alterations in RHE (De Vuyst et al., 2018). Briefly, on the 11th day of reconstruction and after cholesterol depletion with methyl-β-cyclodextrin (7.5 mM; Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium) for 2 hours, RHEs were incubated for 48 hours with IL-4 (50 ng/ml), IL-13 (50 ng/ml), and IL-25 (20 ng/ml) (PeproTech, London, United Kingdom). RHEs were eventually challenged with IL-4 and IL-13 only for 48 hours to produce AD-like alterations in a simpler way (do Nascimento Pedrosa et al., 2017).

Another challenge was applied using infection with *T. rubrum* arthroconidia (Faway et al., 2017). Briefly, topical application of dermatophyte arthroconidia in suspension in PBS over RHE was performed on the 11th day of reconstruction. After 4 hours of exposure to these dermatophytes, RHEs were washed with PBS and then re-exposed to air for 4 additional days of culturing. This protocol was adapted for infection of RHE using N/TERT KCs. Owing to a weaker barrier, an inoculum of 850 arthroconidia per cm² was used instead of 1,700 per cm².

Scratch assay

KCs migration was studied using a scratch assay in culture (Mound et al., 2017). Confluent monolayers were treated 1 hour with 10 μg/ml mitomycin C (#sc 3514B; Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, TX) before scraping using a p200 micropipette tip and then washed and incubated with fresh medium for 24 hours. Rescue was performed by adding 50 ng/ml recombinant human TSG-6 (#2104-TS; R&D Systems) in the culture medium during the 24 hours of scratch closure. The scratch closure was monitored by time-lapse imaging using an Iprasense Cytonote device (Iprasense, Montpellier, France) and analyzed by ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Histological staining, immunofluorescence, and HA labeling

For morphological analysis, RHE and skin biopsies were fixed in a 4% formaldehyde, 70% ethanol, and 5% acetic acid solution (Lin et al., 1997) and then dehydrated and embedded in paraffin to prepare 7 μm tissue sections using a microtome. Tissue sections were stained with hemalun-eosin(-safron). Infected RHEs were stained by periodic-acid schiff after incubation of sections with α-amylase (Faway et al., 2017).

For immunolabeling, tissue sections were incubated 1 hour at room temperature with primary anti-keratin 10 (1:100 dilution, Dako, Glostrup, Denmark), anti-involucrin (1:200 dilution, Sigma-Aldrich), and anti-loricrin (1:100 dilution, Abcam, Cambridge, United Kingdom) or overnight at 4 °C with primary anti-FLG (1:75 dilution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) antibodies and then incubated 1 hour at room temperature with secondary antibodies conjugated with Alexa fluorochrome A488: anti-mouse diluted 1:200 for keratin 10, involucrin, and FLG and anti-rabbit diluted at 1:500 for loricrin (Life Technologies, Carlsbad, CA).

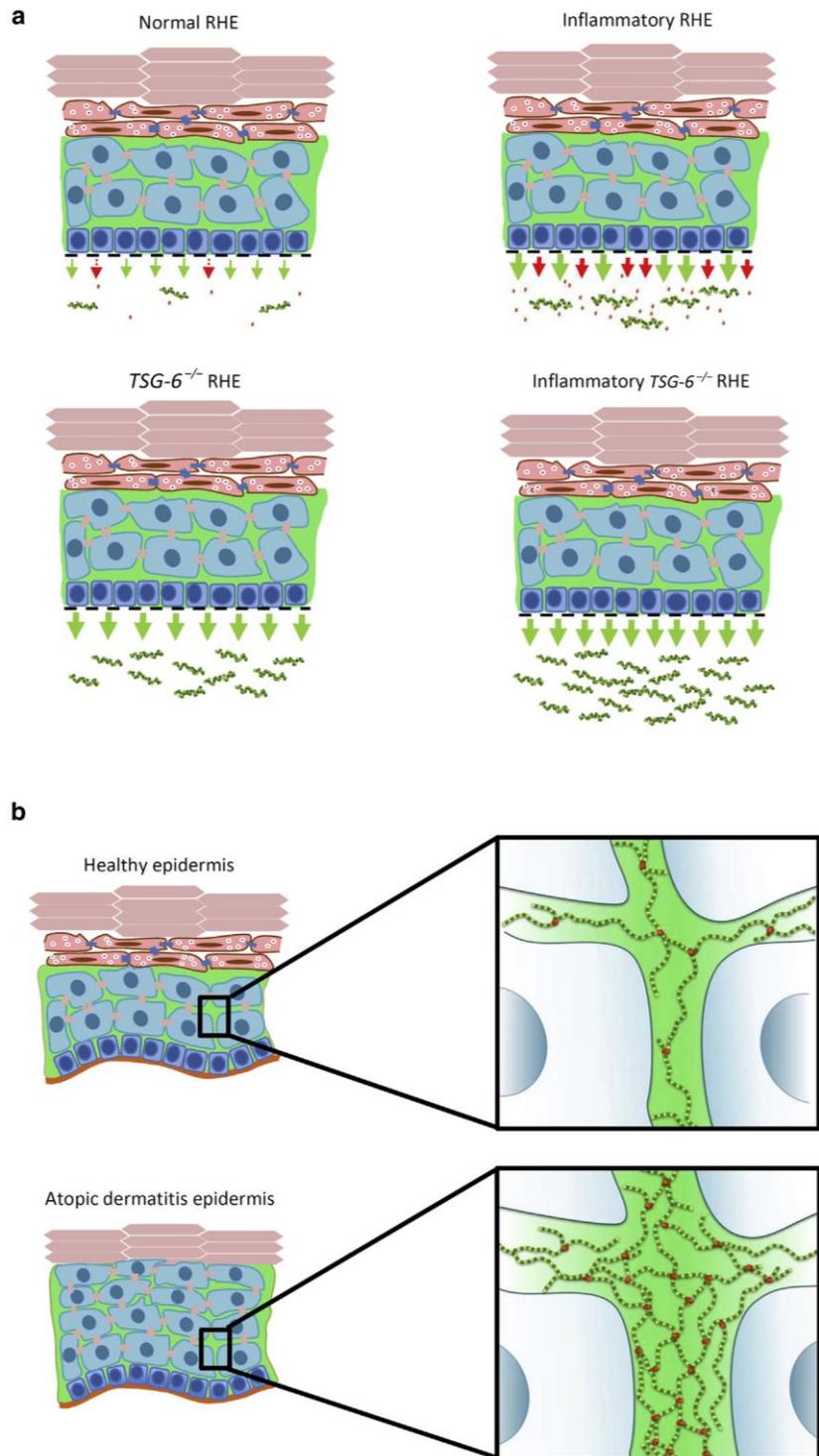
HA was localized on tissue sections using an overnight incubation at 4 °C with a biotinylated HA-binding protein at 1:100 dilution (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germany), followed by 1-hour incubation at room temperature with fluorescein-labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Sections were mounted with coverslips using Mowiol (Sigma-Aldrich) and analyzed under an Olympus BX63 microscope.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using a High Pure RNA isolation kit (Roche, Basel, Switzerland) for monolayers and an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) for RHE. First-strand cDNA was synthesized using

Figure 15. TSG-6 retains HA in the ECM of the epidermis. (a) Schematic representations of in vitro observations in *TSG-6^{+/+}* and *TSG-6^{-/-}* RHE challenged or not challenged. In control conditions, weak amounts of HA (green) and TSG-6 (red) are released in the culture medium. In inflammatory conditions, increased TSG-6 secretion goes along with enhanced HA release. In the absence of TSG-6, HA release is significantly increased, especially after the challenge. (b) Hypothetical role of TSG-6 in HA distribution and organization in healthy and lesional atopic dermatitis epidermis. In the healthy epidermis, the weak amount of secreted TSG-6 is involved in ECM organization by HA cross-linking. In atopic dermatitis lesions, enlarged intercellular spaces go along with enhanced HA production. Secreted TSG-6 links HA cables to form a dense matrix. ECM, extracellular matrix; HA, hyaluronan; RHE, reconstructed human epidermis.



SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) and amplified by FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) in the Light Cycler (Light Cycler 96 Instrument; Roche). Relative mRNA expression level was normalized to *RPLPO* reference gene (Minner and Poumay, 2009) and calculated using the $\Delta\Delta Cq$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Specific primers (Eurogentec, Liège, Belgium) were used at 300 nM and are listed in Table 3.

RNA-seq

Total RNA was extracted using the ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, WI) before checking integrity through an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNA-seq and standard analysis were performed by the GIGA-Genomics platform (University of Liège, Belgium). RNA-seq data are available in the ArrayExpress database at EMBL's European

Table 3. The Sequence of Primer Pairs Used for RT-qPCR

Gene Symbol	Forward Primer	Reverse Primer
<i>RPLP0</i>	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
<i>TSG-6</i>	GCTAGAGGCAGCCAGAAAA	ATCCAACCTCTGCCCTTAGCC
<i>HAS1</i>	CACCTACCAACCGCATGCT	GTCTGCTGGCTCAGCCACCG
<i>HAS2</i>	CCTCATCATCAAAGCCTGT	GATGCAAAGGGCAACTGTTT
<i>HAS3</i>	GCGATTCGGTGGACTACAT	GGATCCTCTCCAGGACTC
<i>Hyal1</i>	TCCAGATCTTCTATGACAGCAAAA	TCCTTGATGGCCTGACATGA
<i>Hyal2</i>	GCACTCCCAGTCTACGTCTTCA	GCACTCTCGCCAATGGTAGAG
<i>Hyal3</i>	GATCTGGGAGGTTCTGTCC	AGAGCTGGAGAGGCTCAGGT
<i>Kiaa1199</i>	TACTGGGACGAGGACTCAGG	TCACAGCCTTTCATGGAGCA
<i>CD44</i>	CATTGCAGTCAACAGTCAAGAA	ATTGCCACTGTTGATCACTAGCTT
<i>ITIH5</i>	ACTGTGCGTGGAGAAGTGTG	CGGGGTCTGATTTTCATCGT
<i>LL37</i>	CCAGGACGACACAGCAGTCA	CTTCACCAGCCCGTCTTC

Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MTAB-10095.

ELISA assay

TSG-6 protein levels were quantified in a culture medium using a homemade ELISA assay. Plates were coated overnight with an anti-TSG-6 capture antibody (#A38.1.20; Santa Cruz Biotechnology) and were blocked for 1 hour with 0.5% BSA in PBS. After 2 hours of incubation in the presence of samples of culture medium or in the presence of recombinant human TSG-6 protein (#2104-TS; R&D Systems) samples at different concentrations chosen to calibrate the assay, TSG-6 was secondarily detected using an anti-TSG-6 biotinylated antibody (#BAF2104; R&D Systems), horseradish peroxidase-streptavidin, and chromogenic substrate (R&D Systems). The concentration of TSG-6 protein is proportional to absorbance (λ : 450–570 nm) measured by spectrophotometer (Molecular Device, Berkshire, United Kingdom).

Procedures for HA analysis

The amount of HA present in the culture medium, in pericellular, and in intracellular compartments was analyzed using Hyaluronan DuoSet kit (R&D Systems) as described by Malaisse et al. (2014).

To measure the size of HA fragments, the total amount of HA recovered in the RHE culture medium was assessed using the Hyaluronan DuoSet kit. Samples were then prepared to load an identical amount of HA (10 ng of HA per sample) on a Sephacryl S-1000 column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Samples were eluted at 70 μ l/min with 0.15 M sodium acetate and 0.1% CHAPS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) to collect 30 fractions from each sample. Standard HA fragments were chromatographed in identical conditions.

In situ hybridization

RNAscope kit was used (Advanced Cell Diagnostics, Silicon Valley, CA) in accordance with the manufacturer's instructions (RNAscope 2.5 HD assay Red). Tissue sections were targeted by specific probes *Homo sapiens*-TNFAIP6 (reference 444421). *Homo sapiens*-PPIB (Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase B) probe (reference 313901) was used as the positive control, and DapB (*Bacillus subtilis* dihydrodipicolinate reductase) probe (reference 310043) as the negative control. Fast Red staining in sections counterstained by hemalun (blue) reveals sequence hybridization as described by Wang et al. (2012).

Genome editing by CRISPR/Cas9

N/TERT KCs genome was edited to generate *TNFAIP6*-knockout cells. The procedure is a modified version of what is described in the user guide provided with the Alt-R CRISPR-Cas9 system (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

Practically, CRISPR RNA (crRNA) *trans*-activating crRNA duplexes were formed by mixing crRNA (200 μ M) and *trans*-activating crRNA (200 μ M, #1072532; Integrated DNA Technologies), hybridizing them by heating up to 95 °C for 5 minutes, and then cooling them down to room temperature. Five crRNAs were designed using <http://crispor.tefor.net/>, <https://zlab.bio/guide-design-resources> and eu.idtdna.com website and are listed as follows: #Exon1 crRNA Up 5'-TTGCTATGGGAAGACTCA AGG-3', #Exon1 crRNA Down 5'-AAGTTCTTACCAAGCCATA TGG-3', #Exon3 crRNA Up 5'-ATT ATGGAATCCGCTCAAT AGG-3', #Exon6 crRNA Up 5'-GAGAAT CGACCTCTGAATTC TGG-3', and #Exon6 crRNA Down 5'-GGTCA TGACATTTCTGTG GGG-3' (Figure 5a). Duplexes were then mixed to Cas9 enzyme (#1081058; Integrated DNA Technologies) to form ribonucleoprotein complexes, which were electroporated (Amaza Nucleofector I device, #AAD-1001; Lonza, Bâle, Switzerland) in proliferative N/TERT KCs according to the manufacturer's instructions (Amaza Human Keratinocyte Nucleofector Kit of Lonza, #VAPD-1002). After 48 hours of recovery, edited cells were seeded in 96-well plates at low density to obtain clonal populations (limiting dilution).

The mutations in the *TNFAIP6* gene were amplified by PCR. PCR products corresponding to homologous alleles of *TSG-6* were isolated by TA cloning and sequenced by Sanger sequencing (Genewiz company, Takeley, United Kingdom). PCR primers (Eurogentec) used at 10 μ M were exon 1 forward 5'-ACAGCGAAAATGCCATTGG-3', exon 1 reverse 5'-TCTCAACAAGAGGCTCATGAGT-3', exon 3 forward 5'-TTGGAAGTGGCTATCTTTGCT-3', exon 3 reverse 5'-GG AACACAACCTCAATGTCGGG-3', exon 6 forward 5'-CATGCGG-CAATGAAACCACA-3', and exon 6 reverse 5'-AAGTGGCTAAATCTTCAGCT-3' (Figure 5b).

Statistical analyses

All data were analyzed using SigmaPlot software, version 11.0 (Systat Software, Chicago, IL). Statistical differences were evaluated by Student *t*-test, one-way ANOVA, and two-way ANOVA repeated measure tests, and error bars represented SD. All graphs were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Data availability statement

Dataset related to this article can be found at <https://data.mendeley.com/datasets/4fbbg2syzk/1>, an open-source online data repository hosted at Mendeley Data.

ORCIDiDs

Céline Evrard: <http://orcid.org/0000-0002-7450-0759>
 Emilie Faway: <http://orcid.org/0000-0003-3406-1103>
 Evelyne De Vuyst: <http://orcid.org/0000-0001-7152-1370>
 Olivier Svenssek: <http://orcid.org/0000-0001-9254-0060>
 Valérie De Glas: <http://orcid.org/0000-0001-7366-2601>
 David Bergerat: <http://orcid.org/0000-0003-0013-6621>
 Michel Salmon: <http://orcid.org/0000-0002-1728-8448>
 Olivier De Backer: <http://orcid.org/0000-0002-1490-4508>
 Bruno Flamion: <http://orcid.org/0000-0003-4458-7627>
 Hélène Le-Buanec: <http://orcid.org/0000-0002-2139-0357>
 Catherine Lambert de Rouvroit: <http://orcid.org/0000-0002-0273-8995>
 Yves Poumay: <http://orcid.org/0000-0001-5200-3367>

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: CE, CLDR, BF, YP; Data Curation: CE, CLDR, YP; Formal Analysis: CE; Funding Acquisition: CLDR, YP; Investigation: CE, VDG, EF, MS, DB; Methodology: CE, EF, EDV, OS, ODB, DB, HLB, CLDR, YP; Project Administration: CE, CLDR, BF, YP; Supervision: CE, CLDR, YP; Validation: CE, CLDR, YP; Visualization: CE, CLDR, YP; Writing - Original Draft Preparation: CE, CLDR, YP; Writing - Review and Editing: CE, CLDR, YP

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge B. Bienfait and J.S. Blairvacq for providing skin samples and A. Nikkels for providing atopic dermatitis biopsies. We gratefully thank K. De Swert, V. Bielarz, and D. Desnoeck for their technical support; M. Caruso for the bioinformatics analyses; J. Malaisse for schemas and advice; and Marc Thiry for his skills in transmission electron microscopy analysis. EF was financially supported by the Région Wallonne (MYCEPI, convention n°1910074), and OS is a research fellow funded by FRIA (Fund for Research training in Industry and Agriculture), Belgium.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

- Baranova NS, Foulcer SJ, Briggs DC, Tilakaratna V, Enghild JJ, Milner CM, et al. Inter- α -inhibitor impairs TSG-6-induced hyaluronan cross-linking. *J Biol Chem* 2013;288:29642–53.
- Baranova NS, Nilebäck E, Haller FM, Briggs DC, Svedhem S, Day AJ, et al. The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers. *J Biol Chem* 2011;286:25675–86.
- Bertrand-Vallery V, Boilan E, Ninane N, Demazy C, Friguet B, Toussaint O, et al. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK4A). *Biogerontology* 2010;11:167–81.
- Bocian C, Urbanowitz AK, Owens RT, Iozzo RV, Götte M, Seidler DG. Decorin potentiates interferon- γ activity in a model of allergic inflammation. *J Biol Chem* 2013;288:12699–711.
- Bourguignon LY. Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions. *Am J Pathol* 2014;184:1912–9.
- Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F. Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-gamma promotes phospholipase Cgamma1 activation, Ca(2+) signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J Biol Chem* 2004;279:29654–69.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 2001;20:499–508.
- Dabelsteen S, Pallesen EMH, Marinova IN, Nielsen MI, Adamopoulou M, Romer TB, et al. Essential functions of glycans in human epithelia dissected by a CRISPR-Cas9-Engineered human organotypic skin model. *Dev Cell* 2020;54:669–84.e7.
- Day AJ, Milner CM. TSG-6: a multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol* 2019;78–79:60–83.

- De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, De Glas V, de Rouvroit CL, Poumay Y. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol* 2014;1195:191–201.
- De Vuyst É, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Malaisse J, Mound A, Bourtembourg M, et al. Methyl- β -cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol* 2018;27:435–7.
- Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, et al. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* 2000;20:1436–47.
- do Nascimento Pedrosa T, De Vuyst E, Mound A, Lambert de Rouvroit C, Maria-Engler SS, Poumay Y. Methyl- β -cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model. *Arch Dermatol Res* 2017;309:63–9.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCB1 gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30:207–10.
- Enjalbert F, Dewan P, Caley MP, Jones EM, Morse MA, Kelsell DP, et al. 3D model of harlequin ichthyosis reveals inflammatory therapeutic targets. *J Clin Invest* 2020;130:4798–810.
- Farboud B, Jarvis E, Roth TL, Shin J, Corn JE, Marson A, et al. Enhanced genome editing with Cas9 ribonucleoprotein in diverse cells and organisms. *J Vis Exp* 2018;135:57350.
- Faway E, Cambier L, De Vuyst E, Evrard C, Thiry M, Lambert de Rouvroit C, et al. Responses of reconstructed human epidermis to *Trichophyton rubrum* infection and impairment of infection by the inhibitor PD169316. *J Invest Dermatol* 2019;139:2080–9.e6.
- Faway É, Cambier L, Mignon B, Poumay Y, Lambert de Rouvroit C. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: a new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. *Med Mycol* 2017;55:485–94.
- Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, Minner F, de Rouvroit CL, Poumay Y. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol* 2012;21:871–5.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997;242:27–33.
- Fülöp C, Szántó S, Mukhopadhyay D, Bárdos T, Kamath RV, Rugg MS, et al. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development* 2003;130:2253–61.
- Hennies HC, Poumay Y. Skin disease models in vitro and inflammatory mechanisms: predictability for drug development. *Handb Exp Pharmacol* 2021;265:187–218.
- Hubaux R, Bastin C, Salmon M. On the relevance of an in vitro reconstructed human epidermis model for drug screening in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2018;27:1403–7.
- Huth S, Huth L, Marquardt Y, Fietkau K, Dahl E, Esser PR, et al. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 5 (ITI5) is a natural stabilizer of hyaluronan that modulates biological processes in the skin. *Skin Pharmacol Physiol* 2020;33:198–206.
- Iriyama S, Nishikawa S, Hosoi J, Amano S. Basement membrane helps maintain epidermal hyaluronan content. *Am J Pathol* 2021;191:1010–9.
- Jadin L, Huang L, Wei G, Zhao Q, Gelb AB, Frost GI, et al. Characterization of a novel recombinant hyaluronan binding protein for tissue hyaluronan detection. *J Histochem Cytochem* 2014;62:672–83.
- Jokela TA, Lindgren A, Rilla K, Maytin E, Hascall VC, Tammi RH, et al. Induction of hyaluronan cables and monocyte adherence in epidermal keratinocytes. *Connect Tissue Res* 2008;49:115–9.
- Kavasi RM, Berdiaki A, Spyridaki I, Corsini E, Tsatsakis A, Tzanakakis G, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem Toxicol* 2017;101:128–38.
- Kishibe M, Bando Y, Tanaka T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Yoshida S. Kallikrein-related peptidase 8-dependent skin wound healing is associated with upregulation of kallikrein-related peptidase 6 and PAR2. *J Invest Dermatol* 2012;132:1717–24.
- Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: metabolism and function. *Biomolecules* 2020;10:1525.

- Lee MJ, Kim DH, Ryu JS, Ko AY, Ko JH, Kim MK, et al. Topical TSG-6 administration protects the ocular surface in two mouse models of inflammation-related dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:5175–81.
- Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1990;10:1982–8.
- Lesley J, Gál I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem* 2004;279:25745–54.
- Lin W, Shuster S, Maibach HI, Stern R. Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem* 1997;45:1157–63.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Malaise J, Bourguignon V, De Vuyst E, Lambert de Rouvroit C, Nikkels AF, Flamion B, et al. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol* 2014;134:2174–82.
- Mathay C, Pierre M, Pittelkow MR, Depiereux E, Nikkels AF, Colige A, et al. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol* 2011;131:46–58.
- Meyer LJ, Stern R. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol* 1994;102:385–9.
- Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci* 2003;116:1863–73.
- Milner CM, Tongsoongnoen W, Rugg MS, Day AJ. The molecular basis of inter-alpha-inhibitor heavy chain transfer on to hyaluronan. *Biochem Soc Trans* 2007;35:672–6.
- Minner F, Herphelin F, Poumay Y. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol* 2010;585:71–82.
- Minner F, Poumay Y. Candidate housekeeping genes require evaluation before their selection for studies of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2009;129:770–3.
- Moran MC, Pandya RP, Leffler KA, Yoshida T, Beck LA, Brewer MG. Characterization of human keratinocyte cell lines for barrier studies. *JID Innov* 2021;1:100018.
- Morioka Y, Yamasaki K, Leung D, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides inhibit hyaluronan-induced cytokine release and modulate chronic allergic dermatitis. *J Immunol* 2008;181:3915–22.
- Mound A, Lozanova V, Warnon C, Hermant M, Robic J, Guere C, et al. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862:958–71.
- Muto J, Sayama K, Gallo RL, Kimata K. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. *J Dermatol Sci* 2019;94:190–5.
- Nauroy P, Nyström A. Kallikreins: essential epidermal messengers for regulation of the skin microenvironment during homeostasis, repair and disease. *Matrix Biol Plus* 2020;6–7:100019.
- Park AY, Bourtembourg M, Chrétién A, Hubaux R, Lancelot C, Salmon M, et al. Modulation of gene expression in a sterile atopic dermatitis model and inhibition of *Staphylococcus aureus* adhesion by fucoidan. *Dermatopathology (Basel)* 2021;8:69–83.
- Pasonen-Seppänen S, Hyttinen JM, Rilla K, Jokela T, Noble PW, Tammi M, et al. Role of CD44 in the organization of keratinocyte pericellular hyaluronan. *Histochem Cell Biol* 2012;137:107–20.
- Pasonen-Seppänen S, Karvinen S, Törrönen K, Hyttinen JM, Jokela T, Lammi MJ, et al. EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 2003;120:1038–44.
- Perez A, Neskey DM, Wen J, Pereira L, Reategui EP, Goodwin WJ, et al. CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression. *Oral Oncol* 2013;49:306–13.
- Plager DA, Kahl JC, Asmann YW, Nilson AE, Pallanch JF, Friedman O, et al. Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis. *PLoS One* 2010;5:e11450.
- Quaranta M, Knapp B, Garzorz N, Mattii M, Pullabhatla V, Pennino D, et al. Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Sci Transl Med* 2014;6:244ra90.
- Reynolds G, Vegh P, Fletcher J, Poyner EFM, Stephenson E, Goh I, et al. Developmental cell programs are co-opted in inflammatory skin disease. *Science* 2021;371:eaba6500.
- Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, et al. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 2002;22:5157–72.
- Rosdy M, Pisani A, Ortonne JP. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Dermatol* 1993;129:227–34.
- Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2000;114:1184–7.
- Sandjeu Y, Haftek M. Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(Suppl. 4):23–30.
- Selbi W, Day AJ, Rugg MS, Fülöp C, de la Motte CA, Bowen T, et al. Overexpression of hyaluronan synthase 2 alters hyaluronan distribution and function in proximal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1553–67.
- Shakya S, Mack JA, Alipour M, Maytin EV. Cutaneous wounds in mice lacking TSG-6 exhibit delayed closure and an abnormal inflammatory response. *J Invest Dermatol* 2020;140:2505–14.
- Simpson RM, Meran S, Thomas D, Stephens P, Bowen T, Steadman R, et al. Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2009;175:1915–28.
- Smits JPH, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems IMJJ, van de Zande GWHJF, Zeeuwen PLJM, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep* 2017;7:11838.
- Tammi RH, Tammi MI, Hascall VC, Hogg M, Pasonen S, MacCallum DK. A preformed basal lamina alters the metabolism and distribution of hyaluronan in epidermal keratinocyte "organotypic" cultures grown on collagen matrices. *Histochem Cell Biol* 2000;113:265–77.
- Tan KT, McGrouther DA, Day AJ, Milner CM, Bayat A. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:317–27.
- Tan Q, Thomassen M, Burton M, Mose KF, Andersen KE, Hjelmberg J, et al. Generalized correlation coefficient for non-parametric analysis of microarray time-course data. *J Integr Bioinform* 2017;14:20170011.
- Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:79–87.
- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004;4:528–39.
- Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2012;14:22–9.
- Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 1997;272:13997–4000.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

DISCUSSION & RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Le but principal de la recherche qui a mené à cette thèse était de comprendre le rôle de la protéine TSG-6 produite au niveau de l'épiderme humain et sécrétée dans la matrice extracellulaire. Pour mener à bien cette recherche, nous avons surtout exploité les modèles de reconstruction d'épidermes en culture et la possibilité de les reconstruire également à partir de kératinocytes déficients pour le gène *TNFAIP6* grâce à l'édition de leur génome par CRISPR/Cas9. Cette approche récente, qui est en plein essor depuis le début des années 2020 et qui permet l'édition du génome des kératinocytes, présente plusieurs avantages pour étudier la fonction d'un gène et de la protéine qu'il code par rapport aux techniques qui utilisent l'interférence ARN. Quelques contraintes liées à l'édition d'ADN par CRISPR/Cas 9 existent néanmoins.

L'utilisation de modèles d'épidermes reconstruits en 3D pour l'étude de la protéine TSG-6 et de l'HA épidermiques présentent également des limitations certaines qui seront discutées dans cette dernière partie du manuscrit de thèse.

Toutefois, nous pouvons affirmer, grâce aux expériences développées à l'aide de ces outils, que la protéine TSG-6 se trouve impliquée dans le maintien de l'HA dans la MEC épidermique. Les conséquences de l'absence de la protéine TSG-6 et dès lors l'effet de la désorganisation de la MEC épidermique qui en résulte représentent ensemble, avec l'intervention normale des protéines TSG-6 dans le fonctionnement des kératinocytes épidermiques, des perspectives ouvertes par ce travail.

1. Etude du rôle d'une protéine par knockout dans des RHE

Afin de comprendre la fonction d'une protéine, il est commun d'utiliser des techniques visant à en assurer une surexpression, ou au contraire d'en diminuer l'expression, voire d'invalider le gène codant pour celle-ci.

1.1. Diminution d'expression (ARN interférant) *versus* invalidation génique (CRISPR/Cas9)

Les méthodes de *silencing* les plus communément utilisées font appel aux ARN interférant, à savoir les siRNA (*small interfering RNA*) et les shRNA (*small hairpin RNA*). Même si l'utilisation de ces approches mène toutes les deux à une diminution d'expression d'une protéine, il s'agit de molécules différentes avec des propriétés qui sont propres à chacune de ces catégories (Rao et al., 2009) (O'Keefe et al., 2013).

Les **siRNA** sont connus pour être incorporés dans les cellules de manière transitoire et y être dégradés assez rapidement dans le cytoplasme (Rao et al., 2009). Leur utilisation dans les kératinocytes en culture a cependant donné des résultats intéressants, y compris dans notre laboratoire. En effet, le

rôle de Rac1, une petite GTPase appartenant à la famille Rho, dans la différenciation des kératinocytes épidermiques cultivés en monocouche a été mis en évidence grâce à l'inhibition de Rac1 via l'utilisation de siRNA (Nikolova et al., 2008). Malgré leur durée de vie limitée, les siRNA peuvent néanmoins être employés pour diminuer de la même manière l'expression de gène dans des épidermes reconstruits où la différenciation des kératinocytes s'étale sur une dizaine de jours au moins (Bochner et al., 2017, Samuelov et al., 2017, Wagner et al., 2019, Wang et al., 2014, Kuchler et al., 2011, Tanabe et al., 2019). Afin d'obtenir une diminution d'expression de l'ARNm codant pour le gène d'intérêt de 80-90% de manière constante durant toute la reconstruction des épidermes, certaines équipes de recherche utilisent des concentrations en siRNA 5 à 20 fois plus élevées que celle qui est habituellement recommandée par les firmes pharmaceutiques, ce qui augmente par là les risques de *off-targets* (Tanabe et al., 2019, Elias et al., 2019, Gruber et al., 2011, Mildner et al., 2010, Wagner et al., 2019).

Les vecteurs codant pour des **shRNA** ont quant à eux la capacité de s'intégrer de manière stable dans le génome de la cellule hôte et produisent grâce à cette caractéristique un effet interférant qui persiste dans le temps (Rao et al., 2009). Une technique très largement utilisée pour diminuer l'expression d'ARNm au moyen de shRNA de manière stable, dans des cellules difficiles à transfecter comme les kératinocytes, est la transduction lentivirale. De nombreuses équipes de recherche, dont la nôtre, ont transduit avec succès des kératinocytes avec des particules lentivirales pour produire ces shRNA avant de reconstruire un épiderme (Gogler-Piglowska et al., 2018, Hayez et al., 2016, Jansen et al., 2012, Le Provost et al., 2010, Mainzer et al., 2018, Pendaries et al., 2014, Umahayara et al., 2020, Wang et al., 2017). Cette méthode a été utilisée avec succès par Jérémy Malaisse lors de l'étude du métabolisme de l'HA épidermique : un shRNA ciblant l'ARNm de l'UGDH (UDP-glucose 6-déshydrogénase), une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique nécessaire à l'activité des HAS, a permis de diminuer de manière efficace la production d'HA par les kératinocytes sans toutefois modifier la prolifération de ces cellules (Figure 41) (Malaisse et al., 2016). Comme avec l'utilisation de siRNA, cette méthode montre une efficacité élevée (de 80-90%) mais présente un risque moindre de produire des *off-targets*, bien que la raison n'en ait pas été identifiée (O'Keefe et al., 2013).

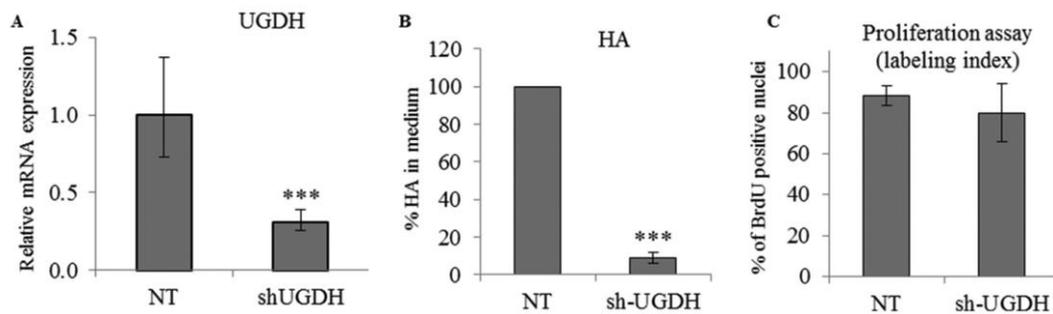


Figure 41 : Effet d’une diminution de l’expression de l’UGDH par shRNA sur (a) l’expression relative en ARNm de l’UGDH, (b) la quantité d’HA relarguée dans le milieu de culture et (c) la prolifération des kératinocytes cultivés en monocouche comparé à des kératinocytes ciblés par un shRNA non-target (NT) c’est-à-dire qui ne possède aucune cible connue dans le génome humain (Malaisse et al., 2016).

Finalement, ces dernières années ont vu se développer la technologie **CRISPR/Cas9**. Cette technique permet de générer des lignées cellulaires 100% déficientes pour un gène de manière permanente. Parmi les différentes méthodes existantes et présentées au point 2.1.2. de la section des Résultats, il a été mis en évidence que l’électroporation de l’ARNm codant pour la Cas9, ou l’électroporation de l’enzyme Cas9 directement sous sa forme protéique, étaient beaucoup plus efficaces que les techniques de transfection chimique et les méthodes faisant appel à l’introduction de plasmides (Liang et al., 2015). Une *review* récente a également fait le point sur les techniques d’introduction de la machinerie CRISPR dans les kératinocytes et présente l’électroporation d’ARNm ou de RNP comme plus efficace et plus sûre vis-à-vis des risques de *off-targets* par rapport à la transduction de vecteurs lentiviraux (Smits et al., 2021). Néanmoins, la plupart des recherches qui utilisent cette méthode dans des kératinocytes implique l’utilisation de plasmides (Fenini et al., 2018b, Slivka et al., 2019, Muraguchi et al., 2019, Dahlhoff et al., 2017, Dabelsteen et al., 2020, Enjalbert et al., 2020, Simpson et al., 2021).

Dans le cadre de notre recherche, ni la transfection chimique, ni l’électroporation de plasmides ne sont apparues efficaces pour atteindre notre objectif d’édition du gène *TNFAIP6*. Une hypothèse pour expliquer ce constat serait que le plasmide utilisé (LentiCRISPR V2) n’est pas compatible avec la transfection et l’électroporation. En effet, il a été montré que les plasmides de grandes tailles, comme c’est le cas du plasmide LentiCRISPR V2, peuvent engendrer une forte mortalité cellulaire (Lesueur et al., 2016). Ce plasmide est, comme d’ailleurs son nom l’indique, adapté pour la transduction lentivirale. Notons néanmoins que la transduction lentivirale effectuée à l’aide de ce plasmide dans des kératinocytes a quand même été réalisée avec succès pour cibler des gènes liés au métabolisme des glycanes dans l’épiderme (Dabelsteen et al., 2020). Cette méthode de transduction induit l’introduction de la machinerie Cas9 dans le génome de la cellule hôte, permettant à l’enzyme de couper sa cible en

continu. L'intégration stable de l'enzyme peut dès lors provoquer un plus grand risque de *off-targets*, de même que l'utilisation de vecteurs viraux non-intégratifs peut induire une persistance de l'expression de l'enzyme Cas9 durant plusieurs semaines (Chen et al., 2016). C'est pourquoi nous avons préféré nous diriger vers l'électroporation transitoire de ribonucléoprotéines, technique qui réduit les risques de *off-targets* (Farboud et al., 2018).

Afin de s'assurer que le phénotype observé est directement lié à l'absence du gène spécifiquement délété et non dû à des effets *off-targets*, il est courant de corriger le gène muté et de vérifier le retour au phénotype sauvage. Dans le cas d'une intégration transitoire de l'enzyme Cas9, il est possible de réparer la mutation induite par introduction de l'ADN complémentaire à l'ARNm codant pour la protéine d'intérêt dans les cellules mutées afin de réexprimer la protéine. Des oligonucléotides donneurs peuvent également être transfectés dans les cellules mutées afin de réparer la mutation par recombinaisons homologues (Smits et al., 2021). Finalement, un système de « *knockout-rescue* CRISPR » (krCRISPR) a été développé afin d'étudier des gènes essentiels (Wang et al., 2019). Ce système consiste à incorporer deux plasmides dans les cellules, un premier plasmide qui exprime l'enzyme Cas9 et la séquence cible gRNA, ainsi qu'un second plasmide qui exprime le gène de sauvetage de manière inductible (Wang et al., 2019). Dans le cas de nos cellules mutées pour la protéine TSG-6, la totalité du gène *TNFAIP6* a été délétée, soit presque 22 kilobases. Pour corriger cette mutation, il faudrait intégrer un plasmide exprimant l'ADNc de la protéine TSG-6, soit environ 900 pdb. Au vu de la mortalité engendrée par l'électroporation de plasmides dans les kératinocytes, nous n'avons pas testé ce type de réparation. A l'avenir, il pourrait pourtant être intéressant de transduire de manière stable, par infection lentivirale, nos kératinocytes TSG-6^{-/-} avec un plasmide exprimant l'ADNc de TSG-6 de manière inductible. Cela permettrait en effet de générer des lignées cellulaires KO mais dont le phénotype sauvage peut être récupéré de manière inductible durant la reconstruction des épidermes. Néanmoins, l'ajout de la protéine TSG-6 recombinante aux cultures en monocouche de kératinocytes TSG-6^{-/-} nous a toutefois permis de restaurer la capacité migratoire des kératinocytes. Dans les RHE, les effets potentiellement *off-target*, ont été investigués en étudiant les résultats de *RNA-sequencing*, c'est-à-dire par une étude de tous les transcrits cellulaires. Aucun des gènes renseignés comme potentielles cibles *off-target* n'a montré une diminution de son niveau d'expression. La possibilité de corriger les mutations et de récupérer le phénotype sauvage pour vérifier les effets des possibles *off-targets* représente un avantage majeur de la méthode CRISPR/Cas9 qui n'est pas réalisable en combinaison avec l'utilisation de siRNA ou de shRNA. Lors de l'utilisation d'ARN interférant, seule l'analyse à grande échelle des transcrits (ex : *microArray*) peut permettre de repérer la présence d'un éventuel *off-target* (O'Keefe et al., 2013).

D'autres biais que des *off-targets* peuvent également être générés lors d'une mutation volontaire de l'ADN. En effet, dans le cadre de notre étude, la presque totalité du gène *TNFAIP6* a été délété, entraînant par conséquent la délétion du miRNA 4773 qui se trouve sur le même locus. L'expression de ce miRNA4773 a été détectée dans des analyses à grande échelle. Notamment, lors du traitement de cellules de carcinome spino-cellulaire œsophagien (par du Telmisartan), la prolifération cellulaire est réduite par arrêt du cycle cellulaire et parallèlement, le miRNA4773 est surexprimé suggérant que ce miRNA est impliqué dans l'effet anti-tumoral généré par la molécule (Matsui et al., 2019). A l'inverse, dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, le miRNA4773 est un marqueur de malignité de la tumeur et est par conséquent plutôt associé à un effet pro-tumoral (Tong et al., 2015). Malgré la potentielle implication de ce miRNA dans le processus de prolifération, nos kératinocytes déficients pour le gène *TNFAIP6* ne semblent pas présenter de dérégulation de leur prolifération. Sur le même locus se trouve également un miscRNA (RN7SL124P) dont le rôle ne semble pas connu. Il est à noter que certains ARN non-codants annotés dans les bases de données telle que Ensembl.org correspondent à des séquences prédites mais dont l'existence n'est pas toujours certaine (communication personnelle de Olivier Svensek). Finalement, une délétion aussi importante que celle que nous avons réalisée pourrait également avoir un impact sur l'expression du gène suivant (*RIF1*) dans le cas où des promoteurs de ce dernier se trouveraient dans les introns de la séquence délétée. La protéine codée par le gène *RIF1* est impliquée dans le maintien de l'homéostasie des télomères et donc dans la stabilité génomique (Dan et al., 2014). L'analyse du transcrit de *RIF1* par *RNA sequencing* nous a permis de vérifier l'absence de conséquence de la délétion de *TNFAIP6* sur l'expression du gène *RIF1*. De plus, une déficience en Rif1 dans des cellules souches embryonnaires (ESC) induit une surexpression des gènes associés à la sénescence et notamment de p21 (Dan et al., 2014). Alors que l'expression relative en ARNm de p21 est similaire dans les kératinocytes TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} (b), les kératinocytes TSG-6^{-/-} (a) montrent une augmentation de l'expression de p21 mais sans modification de l'expression de *RIF1*. Cela suggère qu'il s'agirait de la variabilité individuelle des clones et souligne l'intérêt d'étudier plusieurs clones. Malgré les risques liés à la délétion d'une grande séquence, seule une délétion totale d'un gène peut assurer de la perte de la protéine et éviter la génération d'une protéine tronquée pouvant avoir d'autres effets inattendus sur les cellules. Idéalement, il conviendrait d'étudier, pour les comparer, à la fois des clones avec un codon stop prématuré et des clones totalement délétés pour s'assurer que le phénotype observé est uniquement la conséquence de la perte de l'expression de TSG-6. Au vu de l'efficacité de notre méthode d'édition, on pourrait également étudier l'impact de l'absence de la protéine TSG-6 sur des populations hétérogènes, présentant différents types de mutations et excluant ainsi les risques de sélectionner spécifiquement une cellule avec un phénotype particulier qui serait la conséquence d'un *off-target* ou de la délétion d'une portion du locus dont le rôle est majeur.

1.2. Invalidation génique par CRISPR/Cas9 dans les RHE : choix du type cellulaire

Les **kératinocytes primaires** humains sont disponibles dans le commerce ou peuvent également être isolés à partir d'un excès de peau normale obtenu par chirurgie plastique. Ces kératinocytes primaires sont capables d'établir un tissu aux propriétés proches d'un épiderme *in vivo*. Cependant, ce type de cellules présente plusieurs limites. Les kératinocytes primaires sont coûteux à l'achat et/ou à la production, notamment dans le cadre d'études à grande échelle. De plus, une certaine variabilité est inévitablement observée dans les données générées en raison du génotype des donneurs. Enfin, les kératinocytes primaires entrent en sénescence répllicative après une série de passages en culture et ont de ce fait une capacité d'expansion en culture limitée (Mound et al., 2017). Néanmoins, l'édition de kératinocytes primaires humains a déjà été réalisée avant d'induire leur différenciation (Fenini et al., 2018a). Afin d'augmenter leurs capacités d'expansion, les kératinocytes primaires peuvent être cultivés sur des fibroblastes 3T3-J2 et traités avec un inhibiteur de Rho kinase (Y-27632) (Gandham et al., 2013). Cet inhibiteur est également utilisé au sein de notre université dans le cadre de reconstruction d'épidermes de mouton mis au point par Nicolas Burton, afin de stimuler la prolifération de ces kératinocytes (Burton et al., 2019). Finalement, il pourrait être envisageable de sélectionner des holoclones, kératinocytes souches épidermiques possédant des capacités importantes de division. En effet, une seule de ces cellules est capable de produire un épiderme d'une surface équivalente à celle d'un adulte en seulement quelques semaines (Quatresooz et al., 2012). Les propriétés de prolifération et de différenciation en un épiderme en 3D par des holoclones ont d'ailleurs été évaluées dans le cadre de xénotreffes itératives (Fortunel et al., 2020).

Plusieurs alternatives à l'utilisation de kératinocytes primaires existent et ont été présentées dans la récente *review* de Smits (Smits et al., 2021). Certains chercheurs se sont tournés vers les **cellules IPS**, cellules souches pluripotentes induites, afin de les modifier génétiquement, puis de les différencier en kératinocytes (Guitart et al., 2016). Cependant, les kératinocytes obtenus après différenciation des cellules IPS apparaissent souvent immatures et ne ressemblent pas aux kératinocytes primaires, rendant difficile le passage à l'interface air-liquide lors de reconstruction d'épidermes en 3D (Smits et al., 2021).

D'autres études ont été menées sur des cellules immortalisées dont le principal avantage réside dans leur durée de vie illimitée et donc dans leur capacité à générer des populations monoclonales déficientes pour un gène donné.

Les **cellules HaCaT** ont été les premiers kératinocytes spontanément immortalisés, capables de montrer une certaine différenciation épidermique (Boukamp et al., 1988). Cependant, les cellules HaCaT présentent un programme de différenciation qui reste incomplet et qui empêche la

reconstruction des couches kératinisées de l'épiderme, autrement dit l'établissement d'une couche cornée (Jung et al., 2016). La fonction de barrière des épidermes reconstruits à partir de cellules HaCaT apparaît également moins efficace en raison de l'incapacité des cellules HaCaT à synthétiser correctement les lipides. Alors que les acides gras libres sont absents de la matrice lipidique, le contenu en céramides et sphingolipides est fortement diminué par rapport à un épiderme reconstruit à partir de kératinocytes primaires (Boelsma et al., 1999). Très récemment, il a été montré que la résistance électrique trans-épithéliale mesurée au travers d'une culture de cellules HaCaT n'augmente pas durant la culture (Moran et al., 2021). Simultanément, l'occludine n'est exprimée que de manière diffuse et la claudine 1 se trouve localisée au niveau du noyau, et non pas au niveau de la membrane plasmique des cellules, suggérant que les jonctions serrées ne sont pas correctement établies par les cellules HaCaT (Moran et al., 2021). Enfin, une dérégulation du profil transcriptomique des gènes associés à la formation de l'enveloppe cornée (filaggrine, loricrine, involucrine et kératine 10) en réponse aux cytokines (telles que l'IL-4, l'IL-17A ou l'interféron γ) est observée dans les cellules HaCaT quand on les compare aux kératinocytes primaires, soulignant par-là les énormes limites de ce type cellulaire particulier pour étudier des processus physiopathologiques propres à l'épiderme (Seo et al., 2012). Signalons toutefois que, malgré leur capacité très limitée à mimer les caractéristiques des kératinocytes épidermiques normaux au cours de la kératinisation, les cellules HaCaT en monocouches ont été utilisées pour étudier les fonctions de protéines spécifiques après délétion de leur gène par CRISPR/Cas9 (Dahlhoff et al., 2017) (Trothe et al., 2018) et même pour reconstruire des épidermes (Muraguchi et al., 2019), forcément avec des résultats d'une qualité très discutable.

Deux autres modèles d'épidermes reconstruits à partir de lignées cellulaires immortalisées ont également été générés. D'une part, Inoue *et al.* (2018) ont reconstruit des épidermes à partir des cellules appelées **kératinocytes dermiques humains 1** (HDK1) (Inoue et al., 2018). D'autre part, les **kératinocytes N/TERT** ont été développés et décrits comme des kératinocytes immortalisés, mais capables de se différencier en culture jusqu'à la kératinisation (Dickson et al., 2000, Rheinwald et al., 2002). Ces épidermes reconstruits à partir des deux types de cellules immortalisées sont caractérisés par un processus de différenciation très semblable au processus de différenciation observé lors de la reconstruction obtenue avec des kératinocytes primaires, conduisant à la formation d'une barrière épidermique compétente (Alloul-Ramdhani et al., 2014, Smits et al., 2017, Inoue et al., 2018, Van Drongelen et al., 2014, Moran et al., 2021).

Au vu de leurs similitudes fonctionnelles avec les kératinocytes primaires et grâce à leur immortalité qui facilite l'isolement de clones cellulaires, l'édition du génome par CRISPR/Cas9 des cellules N/TERT a été réalisée de plus en plus fréquemment au cours des deux dernières années. Par exemple, ces cellules ont été éditées, puis analysées par la production de RHE destinés à mimer des pathologies

cutanées comme l'ichtyose Harlequin (Enjalbert et al., 2020). Elles ont aussi été utilisées pour étudier le métabolisme des glycanes en ayant édité les différents gènes codant pour leurs synthèses (Dabelsteen et al., 2020), ou encore pour étudier l'implication de la protéine NIX dans la mitophagie qui caractérise la disparition des organites lors de la kératinisation épidermique (Simpson et al., 2021). De même quand Moran *et al.* (2021) ont publié l'intéressante étude comparative des kératinocytes primaires, des cellules HaCaT et des cellules N/TERT quant à leurs propriétés respectives de différenciation et de reconstruction épidermique, ces auteurs ont également annoncé la génération de cellules N/TERT KO pour la claudine 1 (Moran et al., 2021). Enfin, basé sur le même protocole que celui utilisé dans le cadre de cette thèse pour éditer *TNFAIP6*, l'édition de ces cellules, suivie de la production de RHE, a été réalisée avec Audrey Progneaux, dans notre laboratoire, pour cibler les récepteurs IL13R α 1 d'une part et IL2R γ d'autre part et étudier leurs rôles dans l'altération du phénotype des kératinocytes épidermiques au niveau des lésions de dermatite atopique (Progneaux et al., 2021). C'est encore le même protocole que nous avons partagé avec l'équipe d'Ellen Van den Bogaard à Nimègue pour parvenir à cibler le gène codant la filaggrine et analyser le rôle particulier de cette protéine dans l'établissement de la barrière épidermique et son altération dans plusieurs pathologies cutanées comme l'ichtyose vulgaire et même la dermatite atopique (Smits et al., 2021).

Il est tout de même essentiel de noter que les N/TERT-RHE présentent quelques différences par rapport aux NAK-RHE. Lors de la reconstruction des N/TERT-RHE, nous avons mesuré une résistance électrique transépithéliale (TEER) plus faible qu'avec les NAK-RHE. Fonctionnellement, cet affaiblissement de la barrière épidermique a été objectivé par l'infection accélérée des RHE par des dermatophytes. En effet, pour un même inoculum, les éléments fongiques ont plus vite infecté les couches vivantes des épidermes reconstruits à partir des cellules N/TERT que les NAK-RHE. En conséquence, l'inoculum utilisé pour infecter les N/TERT-RHE a dû être réduit de moitié. La TEER réduite s'explique vraisemblablement par un retard de localisation de l'occludine et de la claudine 1 en membrane plasmique et donc de l'organisation des jonctions serrées (Moran et al., 2021). D'autre part, la composition lipidique de la matrice entourant les cornéocytes n'est pas totalement identique aux NAK-RHE. Bien que les différents types de céramides et d'acides gras libres soient présents, certains d'entre eux se trouvent en quantité réduite dans les N/TERT-RHE par rapport aux NAK-RHE. D'ailleurs, il semblerait que les lipides soient moins bien organisés dans la matrice des N/TERT (Van Drongelen et al., 2014). Enfin, alors qu'il avait été montré que les traitements des NAK-RHE avec l'IL-4 ou l'IL-13 permettaient de mimer la spongiose et l'hypogranulose caractéristiques de la dermatite atopique (Do Nascimento Pedrosa et al., 2017), la couche granuleuse semble persister dans les N/TERT-RHE traités avec les IL-4 et IL-13 (Figure 42), même si les kératinocytes répondent au traitement en montrant un affaiblissement de la barrière.

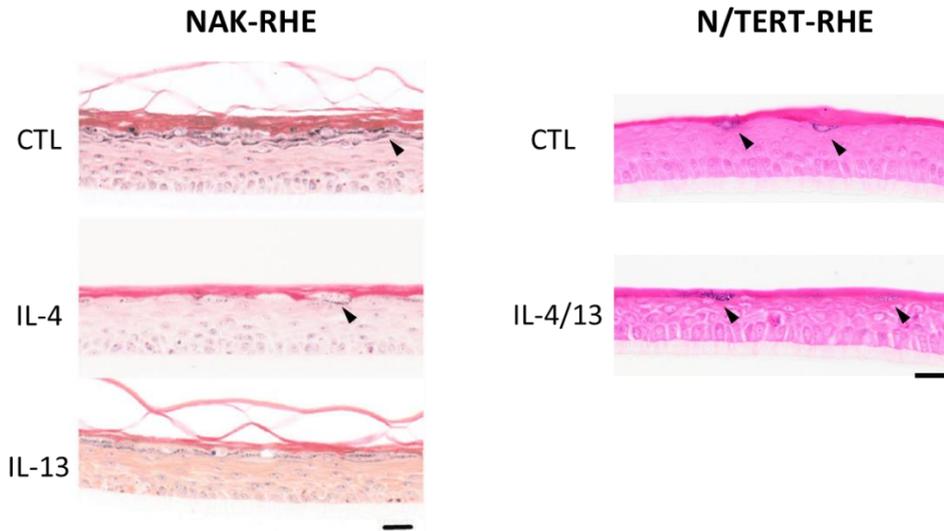


Figure 42 : Comparaison de l'effet du traitement aux IL-4 et IL-13 sur les NAK-RHE (Do Nascimento Pedrosa et al., 2016) et les N/TERT-RHE. Le traitement des NAK-RHE à l'IL-4 induit une perte de la couche granuleuse presque complète alors que le traitement IL-4/13 sur les N/TERT-RHE ne modifie pas la taille de la couche granuleuse. Barre d'échelle = 20 μ m

2. Etude de l'HA et de la protéine TSG-6 épidermique : limitations liées à l'utilisation des RHE

Alors qu'en conditions normales la protéine TSG-6 est très faiblement exprimée et sécrétée dans la MEC, des conditions inflammatoires menant à une réponse immunitaire de type Th2 ou Th1/17 induisent fortement l'expression et la sécrétion de la protéine TSG-6 par les kératinocytes épidermiques. Simultanément, l'HA est produit par les kératinocytes de manière plus importante lorsque les kératinocytes sont soumis à des stress et se retrouve accumulé entre les couches vivantes de l'épiderme. Grâce à l'édition des kératinocytes N/TERT et à la génération de lignées de kératinocytes TSG-6^{-/-}, nous avons mis en évidence que la protéine TSG-6, réputée anti-inflammatoire, est capable de maintenir davantage l'HA des épidermes reconstruits *in vitro* entre les cellules, dans la MEC épidermique. Cependant, l'utilisation de ce tissu produit en culture présente quelques limitations telles que la composition de la lame basale établie par les kératinocytes, ou encore l'absence de cellules immunitaires et molécules circulantes tel que l'inter- α -trypsine inhibiteur.

2.1. Implication de la lame basale

L'absence de la protéine TSG-6 dans le RHE induit une localisation de l'HA modifiée. Une moindre quantité d'HA est en effet mesurée dans le RHE KO pour TSG-6 et une plus grande concentration en HA est détectée de façon concomitante dans le milieu de culture sous-jacent.

Dans les modèles d'épiderme reconstruit *in vitro*, il est commun de mesurer la quantité d'HA épidermique synthétisé par les kératinocytes, puis relargué dans le compartiment sous-jacent à l'épiderme, soit dans le milieu de culture quand le tissu repose sur un filtre (Malaisse et al., 2014), soit dans la matrice de collagène si le tissu a été reconstruit sur cette matrice (Pasonen-Seppanen et al., 2003). Certaines recherches ont cependant observé que la perte d'HA, depuis l'épiderme vers le compartiment sous-jacent, semble être une conséquence d'une organisation incomplète de la lame basale dans les modèles ne contenant que des kératinocytes (Tammi et al., 2000) (Iriyama et al., 2021). Dans cet ordre d'idée, l'analyse d'un modèle *in vitro* de peaux équivalentes exposées aux UV a montré que l'inhibition des métalloprotéinases et des héparanases qui digèrent les composants de la lame basale protège l'intégrité de la lame basale et retient de ce fait 25% d'HA supplémentaire dans l'épiderme par rapport à la quantité d'HA retenue dans les épidermes où la lame basale n'est pas protégée par ces inhibiteurs (Iriyama et al., 2021). De la même manière, dans un modèle d'épiderme reconstruit de rat, la mise en place d'une lame basale entre l'épiderme et la matrice de collagène, par une incubation préalable avec des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), permet de retenir 75% environ de l'HA dans l'épiderme, alors que 80% de l'HA épidermique sont perdus en absence de cette lame basale (Tammi et al., 2000, Passi et al., 2004). Ces résultats obtenus *in vitro* pour évaluer l'importance de la lame basale dans la rétention de l'HA sont cohérents avec les études réalisées *in vivo*. En effet, lorsque l'épiderme de personnes âgées est exposé aux UV, cette exposition endommage la lame basale de l'épiderme et résulte en une quantité d'HA plus faible observée dans les épidermes exposés au soleil par rapport à l'HA mesuré au sein des épidermes non exposés (Iriyama et al., 2021).

Les RHE sont générés uniquement à partir de kératinocytes. Ces cellules dans la couche basale sécrètent des composants de la lame basale (collagène IV, laminine, entactine, perlécan) et établissent des hémidesmosomes pour ancrer leurs filaments intermédiaires à la surface du filtre de polycarbonate. Ces structures organisées par les kératinocytes sur le filtre peuvent être considérées comme des ébauches de la lame basale puisqu'il ne manque essentiellement que du collagène VII et de la fibronectine par rapport aux composants principaux d'une lame basale telle que rencontrée *in vivo* (Rosdy et al., 1993). Les observations par microscopie électronique à transmission de sections ultrafines produites au travers de la couche basale de nos RHE révèlent la présence d'hémidesmosomes, ainsi que d'une lamina lucida et d'une lamina densa (Figure 43). De plus, il a été mesuré précédemment que la proportion d'HA retenu dans le RHE est de l'ordre de 95% de sa production, et qu'une faible quantité seulement d'HA traverse la lame basale, même incomplète, pour se retrouver dans le milieu de culture sous-jacent (Malaisse et al., 2014). Néanmoins, il pourrait s'avérer intéressant d'ajouter les composants de lame basale manquant à notre modèle afin de le rendre plus robuste. Dans ce but, des cellules MDCK pourraient être ensemencées sur le filtre de

polycarbonate pour une période de culture d'une vingtaine de jours et ainsi produire et organiser pendant ce temps les composants de la lame basale avant de reconstruire l'épiderme (Tammi et al., 2000).

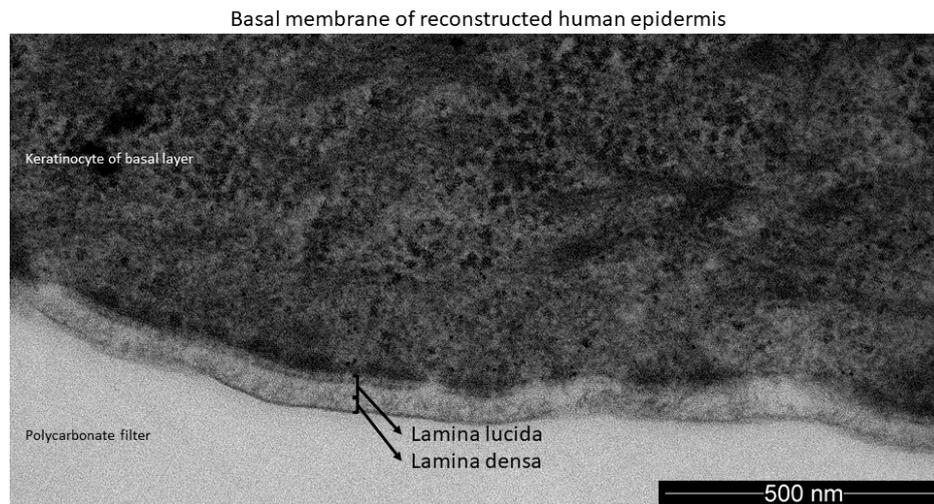


Figure 43 : Observation au microscope électronique à transmission d'un épiderme humain reconstruit *in vitro*. Visualisation de la lamina lucida et de la lamina densa, combinées avec des hémidesmosomes entre les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et le filtre de polycarbonate.

Sur base du métabolisme de l'HA épidermique (synthèse par la HAS1/HAS3 dans la MEC et dégradation par HYAL1 au niveau de la couche granuleuse), sachant par ailleurs que la lame basale crée au niveau de la jonction épidermo-dermique une séparation physique pour l'HA entre le derme et l'épiderme, et compte tenu du fait que la protéine TSG-6 retient également l'HA dans l'épiderme, on peut en conclure que la presque totalité de l'HA est métabolisé localement dans le compartiment épidermique. Seule une proportion assez minime de l'HA (de l'ordre de 10%) diffuserait vers le derme à travers la lame basale où il diffuserait vers les ganglions lymphatiques, puis la circulation sanguine, pour atteindre finalement le foie où l'HA serait dégradé.

2.2. Implication de l'ITI

Afin de former une MEC stable, la protéine TSG-6 est soit capable d'interagir directement avec l'HA, soit indirectement, en présence de l'inter- α -trypsin inhibiteur (ITI) circulant dans le sang, la protéine TSG-6 peut jouer un rôle enzymatique qui transfère une chaîne lourde (HC) de ITI sur le polymère formé par l'HA (Rugg et al., 2005). Sachant que l'affinité de la protéine TSG-6 pour l'ITI est plus importante que pour l'HA, il aurait été intéressant d'étudier cette interaction. D'autant plus que l'importance d'une interaction ITI-TSG-6-HA a été mise en évidence au cours de pathologies cutanées.

Par exemple, Shakya *et al.* (2020) ont montré la présence de complexes HC-HA au cours de la cicatrisation dans les peaux de souris (Shakya *et al.*, 2020).

Parmi les différents types de HC liés à l'ITI, la HC5 est majoritairement exprimée dans la peau, alors que les autres HC sont plutôt exprimées par les cellules du foie (Huth *et al.*, 2015). Tandis qu'en conditions saines la HC5 est restreinte au compartiment dermique où elle est exprimée par les fibroblastes, elle apparaît par contre localisée dans les couches de l'épiderme chez les patients atteints de dermatite atopique, de psoriasis, ou de dermatite de contact, simultanément avec l'infiltrat inflammatoire (Figure 44) (Huth *et al.*, 2015). Notons encore que d'autres HC ont également été localisées dans l'épiderme humain sain. Notamment, les HC1 et 2 semblent être associées aux kératinocytes, aux mélanocytes et aux cellules de Langerhans de l'épiderme (Tan *et al.*, 2011).

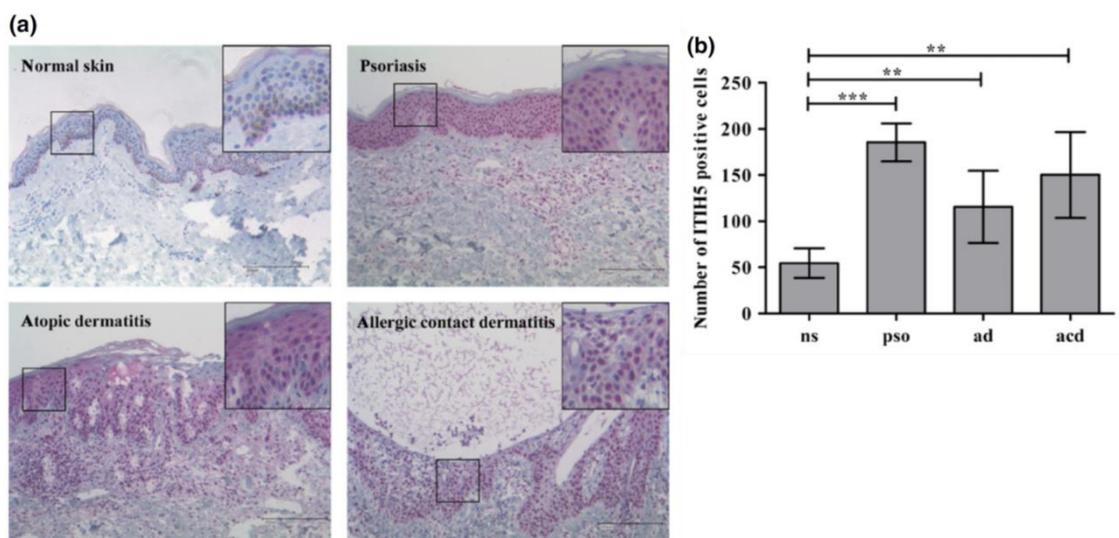


Figure 44 : (a) Analyse immunohistochimique de l'ITIHC5 et (b) quantification des cellules positives pour l'ITIHC5 dans des peaux présentant des pathologies inflammatoires cutanées par rapport à une peau saine (Huth *et al.*, 2015)

Puisque les épidermes reconstruits *in vitro* pour cette étude ont été produits en absence de derme sous-jacent et donc d'un réseau vasculaire (et dans un milieu ne contenant pas de sérum), il nous fallait, pour étudier l'interaction HC-TSG-6, ajouter une source d'ITIHC. Dans ce but, une tentative de reconstruction d'épiderme dans un milieu contenant du sérum a été réalisée. Malheureusement, nous avons dû constater que l'ajout de sérum lors de la production des épidermes impacte sérieusement leur morphologie, identifiable par la perte de l'aspect palissadique des cellules de la couche basale ainsi que par la présence de figure d'apoptose dans le tissu (Figure 45). Une option pour mieux contrôler la composition du milieu de culture pourrait être d'ajouter des ITIHC recombinants au milieu de culture des RHE. Cela permettrait vraisemblablement d'étudier les différents types de HC et à différentes concentrations.

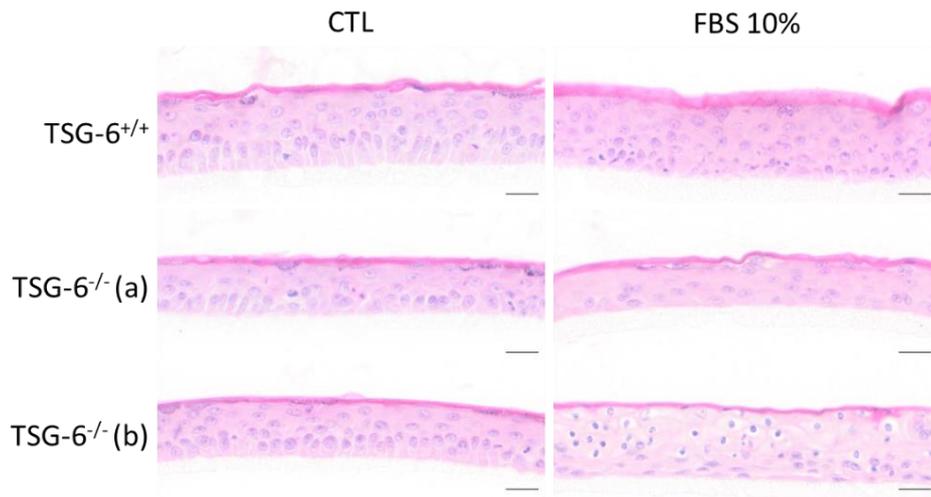


Figure 45 : Analyse morphologique (coloration hémalun/éosine) de RHE non traités (CTL) et de RHE traités 48h avec du FBS 10% (*Fetal Bovin Serum*). Barre d'échelle = 20 μ m

2.3. Implication des autres cellules et constituants de la MEC

Le modèle de reconstruction d'épiderme sur filtre de polycarbonate est un modèle d'épiderme constitué exclusivement de kératinocytes. Les autres cellules résidentes de l'épiderme (mélanocytes, cellules de Merkel et cellules de Langerhans) n'y sont pas présentes. Les autres cellules immunitaires (lymphocytes, neutrophiles), ainsi que le compartiment dermique composés de fibroblastes, sont également absents de ce modèle.

2.3.1. Les cellules immunitaires

La protéine TSG-6 est impliquée dans la régulation de l'inflammation. En effet, en contexte inflammatoire, suite à la libération de cytokines pro-inflammatoires, la protéine TSG-6 est sécrétée massivement (Day et Milner, 2019). Suite à la libération de ces cytokines, la matrice d'HA péri-cellulaire change d'organisation et les polymères d'HA se regroupent et s'associent sous forme de « câbles » d'HA par l'intermédiaire de la protéine TSG-6 (Jokela et al., 2008) (Kobayashi et al., 2020). Cette organisation en câble est fortement impliquée dans la régulation du recrutement des leucocytes au site enflammé. Les leucocytes ayant une forte affinité pour ces câbles d'HA, ils ont tendance à se retrouver séquestrés, ce qui permet de maîtriser l'inflammation (Getting et al., 2002) (Cao et al., 2004) (Abadi et al., 2016).

Les pathologies inflammatoires cutanées sont caractérisées par une infiltration de cellules immunitaires. Notamment au cours du développement des lésions de dermatite atopique, l'épiderme est caractérisé par une infiltration de lymphocytes qui sont d'ailleurs responsables de la réponse de type Th2 et sont les producteurs des IL-4 et IL-13 (De Vuyst et al., 2016). Quand se développent les

lésions de psoriasis et lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*, des neutrophiles migrent entre les kératinocytes de l'épiderme après avoir localement rompu la lame basale ce qui induit une migration depuis le derme vers l'épiderme (Katayama, 2018) (Schulz et al., 2019). Le recrutement des neutrophiles s'observe également lors de la cicatrisation cutanée. Il a d'ailleurs été montré qu'en absence de la protéine TSG-6, le recrutement des neutrophiles est clairement perturbé et la cicatrisation retardée (Shakya et al., 2020).

L'étude de la migration des neutrophiles dans un épiderme TSG-6^{-/-} en conditions inflammatoires serait intéressante. Pour ce faire, une coculture neutrophiles – RHE devrait être réalisée (Bitschar et al., 2020). Ce type de coculture a déjà été réalisé et il permet d'étudier l'impact des cytokines libérées par les cellules immunitaires sur les kératinocytes et sur leur capacité de réponse à une infection (Bitschar et al., 2020). Cette coculture pourrait aussi être d'un intérêt tout particulier dans le contexte des infections par *Trychophyton rubrum*.

Dans le modèle de RHE, les neutrophiles ne peuvent pas traverser le filtre de polycarbonate et donc l'étude de la migration des neutrophiles en absence de la protéine TSG-6 n'est pas envisageable dans de telles conditions expérimentales. Il pourrait néanmoins être intéressant d'étudier l'attraction des neutrophiles (tagués GFP) par les kératinocytes en plaçant les deux types cellulaires dans deux chambres initialement séparées (Chambre Ibidi par exemple) pour ensuite suivre la migration des neutrophiles vers les kératinocytes capables d'exprimer ou pas la protéine TSG-6. Il pourrait également être intéressant d'étudier la migration des neutrophiles dans des épidermes cultivés sur derme équivalent ; les cellules immunitaires pouvant être introduites dans la matrice décellularisée. En effet, l'ajout de lymphocytes T dans un équivalent dermique sous-jacent à un épiderme reconstruit *in vitro* a déjà été réalisé dans le cadre de l'étude des interactions entre les kératinocytes et le système immunitaire impliquées dans le psoriasis (van den Bogaard et al., 2014).

Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant de réaliser une co-culture RHE–macrophages. En effet, la protéine TSG-6 étant impliquée dans la polarisation des macrophages (M1 pro-inflammatoire vers M2 anti-inflammatoire) (Mittal et al., 2016) (Liu et al., 2021), il conviendrait de placer des macrophages polarisés M1 dans le milieu de culture sous-jacent aux épidermes reconstruits à partir des kératinocytes TSG6^{+/+} ou TSG-6^{-/-} et d'étudier l'impact sur les macrophages dans ce contexte.

2.3.2. Les fibroblastes

En absence de la protéine TSG-6, l'HA est moins retenu dans la MEC de l'épiderme et semble s'échapper davantage en diffusant vers le compartiment sous-jacent. Dans le cas de notre modèle *in vitro*, l'HA se retrouve dans le milieu de culture. Toutefois, si on l'étudie *in vivo*, cet HA migrant depuis l'épiderme se retrouve dans le compartiment dermique où il pourrait produire des conséquences sur les fibroblastes résidents.

En effet, il a été montré que l'ajout d'HA à des fibroblastes cultivés *in vitro* induit leur prolifération et leur migration ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la cicatrisation, notamment l'expression du collagène III et du TGF- β 3 (David-Raoudi et al., 2008) (Asparuhova et al., 2019). Dans le cas de cicatrisations cutanées, les HAS sont davantage exprimées par les fibroblastes, ce qui induit une production accrue d'HA de haut poids moléculaire et par conséquent une prolifération et une migration stimulée des fibroblastes (Kavasi et al., 2017). L'apport d'HA supplémentaire provenant de l'épiderme pourrait dès lors avoir un effet activateur sur la prolifération et la migration des fibroblastes. Cependant, l'étude de la peau des souris Tsg-6^{-/-} ne révèle aucune modification phénotypique en absence de stress (Fulop et al., 2003) (Shakya et al., 2020). On pourrait néanmoins investiguer ces questions en décidant de récupérer les milieux conditionnés des RHE TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} et d'incuber des fibroblastes avec ces milieux afin d'en établir l'impact éventuel et de mimer cet apport nouveau d'HA vers le compartiment dermique.

2.3.3. Les constituants de la MEC

La MEC est composée d'HA mais aussi de plusieurs GAG sulfatés parmi lesquels on trouve environ 60% d'héparan sulfate et 20% de chondroïtine sulfate (Tammi et al., 1987). Ces GAG sont liés de manière covalente à des *core-proteins* qui organisent les protéoglycans. Dans l'épiderme, différents protéoglycans occupent les espaces intercellulaires comme le glypican, les syndécans 1 à 4 et encore le versican (Sandjeu et Haftek, 2009). Alors que le glypican et les syndécans sont ancrés à la membrane plasmique, le versican est sécrété sous forme libre dans la MEC où il peut notamment interagir avec l'HA (Sandjeu et Haftek, 2009) (Wight, 2017). La perte de l'HA péri-cellulaire, en absence de la protéine TSG-6, induit probablement la désorganisation de la MEC et notamment la perte d'interaction avec le versican. Cependant, ce protéoglycan est impliqué dans la formation d'une matrice provisoire nécessaire aux leucocytes durant une réponse inflammatoire (Iozzo et al., 2015). L'étude des autres GAG et protéoglycans en absence de la protéine TSG-6 pourrait donc apporter des réponses complémentaires concernant le rôle de la MEC épidermique au cours de l'inflammation cutanée.

L'analyse à grande échelle de tous les transcrits produits par les RHE TSG-6^{-/-} (RNA-sequencing) a mis en évidence une diminution significative de l'expression de la décorine (Figure 46). Il s'agit d'un autre

protéoglycan, composé notamment de dermatan sulfate pour ses chaînes de glycosaminoglycan (Freinkel et Woodley, 2001). Les souris déficientes pour la décorine présentent surtout des modifications phénotypiques du derme, où on observe la formation d'un collagène anormalement structuré (Iozzo et al., 2015). *In vitro*, il a néanmoins été montré que la décorine est localisée également dans les couches suprabasales de l'épiderme (Velez-DelValle et al., 2011). En cas de dermatite de contact, les souris KO pour la décorine présentent une réaction inflammatoire plus faible que les souris sauvages, en résultat apparemment d'une déficience du recrutement des leucocytes (Bocian et al., 2013). Dans les lésions psoriasiques, la détection de la décorine est diminuée (Velez-DelValle et al., 2011). Ces études mettent d'abord en évidence un lien entre la décorine et le recrutement des cellules immunitaires, mais il semblerait également qu'un lien existe entre la protéine TSG-6 et la décorine. La décorine est également capable de se lier à l'EGFR pour induire une inhibition de la croissance cellulaire, dans ce cas en induisant l'activation de p21, un inhibiteur des CDK (Iozzo et al., 2015).

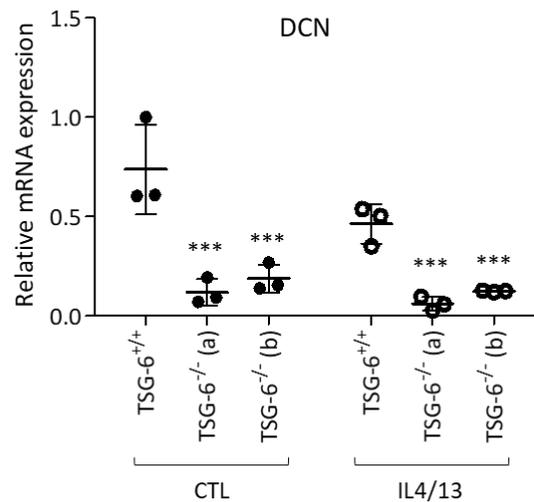


Figure 46 : Expression relative en ARNm de la décorine (DCN) dans les RHE TSG-6^{+/+} et les RHE TSG-6^{-/-} (a) et (b) en conditions contrôles et traitées aux IL-4 et IL-13. Diminution significative (***) p < 0.001 par rapport au RHE TSG-6^{+/+} dans les RHE déficients en TSG-6 par rapport aux RHE non-édités (n=3 ; ANOVA2 ; ±SD)

Il est évident qu'ensemble ces GAG et protéoglycans génèrent un environnement favorable pour la migration des cellules immunitaires. Mais ce n'est pas leur seul rôle puisqu'ils sont également impliqués dans la diffusion des nutriments, des facteurs de croissance et des cytokines dans la MEC (Sandjeu et Haftek, 2009) (Toole, 2001). On peut dès lors considérer que la protéine TSG-6 soit un élément-clé de la bonne organisation de la MEC, et donc de ses fonctions particulières, autant en situation normale que pathologique.

3. Impact de la désorganisation de la MEC sur la capacité de réponse des kératinocytes à des stimuli

Nous venons encore d'en parler ci-dessus, la protéine TSG-6 est largement exprimée et sécrétée dans la peau quand on y rencontre des conditions inflammatoires liées à une cicatrisation épidermique (Simpson et al., 2009) (Shakya et al., 2020). Mais nous avons aussi relevé dans nos études que la protéine TSG-6 est sécrétée de façon accrue par les kératinocytes en réponse à une infection fongique par des dermatophytes (Faway et al., 2019), ou lorsque les cellules épidermiques sont confrontées à des conditions d'une réponse immunitaire de type Th2 (Park et al., 2021). Dans ces conditions, l'HA est produit massivement et davantage retenu entre les kératinocytes par la protéine TSG-6, ce qui semble réduire la cohésion entre les kératinocytes et entraîner une augmentation des dimensions des espaces intercellulaires au travers desquels les cellules immunitaires sont appelées à migrer et où les cytokines et facteurs de croissance produits dans le tissu peuvent diffuser (Tammi et al., 2009). Notamment, lors d'un remodelage de la MEC associé au processus de cicatrisation, une matrice temporaire d'HA est formée et cette matrice riche en HA permet de réguler les signalisations des facteurs de croissance. Par exemple, il a été montré dans des épidermes lésés que l'HB-EGF, produit par les kératinocytes ou d'autres types cellulaires et retrouvé sous forme soluble, est le principal ligand de l'EGFR impliqué dans la cicatrisation de l'épiderme (Tammi et al., 2009). D'autre part, la matrice d'HA est également impliquée dans la séquestration de cytokines, telles que l'IL-8 afin de maîtriser la réaction inflammatoire (Dyer et al., 2014 et 2016). En absence de la protéine TSG-6, la matrice d'HA est désorganisée et ce médiateur pro-inflammatoire se retrouve libre, ce qui provoque une dérégulation de la cinétique de recrutement des neutrophiles et induit *in fine* une accumulation massive de neutrophiles (Shakya et al., 2020). Or un recrutement excessif de neutrophiles peut être délétère pour la cicatrisation (Kim et al., 2008) (Wilgus et al., 2013).

En résumé, la protéine TSG-6, par son action de réticulation et d'organisation de l'HA dans la MEC, semble primordiale pour la régulation de la présentation de cytokines et facteurs de croissance à leur récepteur.

3.1. Migration des kératinocytes

Il a récemment été montré que la souris déficiente pour TSG-6 présente un délai de cicatrisation par rapport à ses congénères sauvages (Shakya et al., 2020). Dans le cadre de notre recherche, nous nous sommes intéressés précisément à la capacité migratoire des kératinocytes TSG-6^{-/-}. Les études de *scratch assay* ont mis en évidence un retard important de migration des kératinocytes TSG-6^{-/-} (a) et un très faible retard des cellules TSG-6^{-/-} (b) par rapport aux kératinocytes TSG-6^{+/+} suggérant que le délai de cicatrisation des souris KO est au moins partiellement dépendant des capacités de migration

des kératinocytes. Dans le contexte qui nous intéresse, les défauts de migration des kératinocytes TSG-6^{-/-} peuvent être expliqués par plusieurs hypothèses.

Tout d'abord, il a été montré que la liaison de l'HA à son récepteur CD44 peut activer la migration des kératinocytes (Bourguignon et al., 2014). En effet, dans les kératinocytes, l'HA stimule la signalisation de RhoA par l'intermédiaire de CD44. La voie de RhoA mène à la phosphorylation des protéines du cytosquelette et l'organisation des filaments, ce qui résulte en la contractilité de l'assemblage actine-myosine. D'ailleurs, en absence de la signalisation de RhoA, la capacité migratoire des kératinocytes diminue (Bourguignon et al., 2014). De manière intéressante, l'interaction HA-TSG-6 augmente l'affinité de l'HA pour son récepteur CD44 (Baranova et al., 2013). Il est donc possible que l'absence de la protéine TSG-6 diminue les interactions de l'HA avec CD44 provoquant ainsi une diminution des voies de RhoA et par conséquent une diminution de la migration de ces kératinocytes.

Ensuite, la décorine est impliquée dans la migration de plusieurs types cellulaires tels que les fibroblastes (Velez-DelValle et al., 2011) ou encore les kératinocytes de la gaine externe de la racine du poil (Zhou et al., 2018). Ce protéoglycan est de plus fortement exprimé par les kératinocytes dysplasiques oraux et impliqué dans la migration et l'invasion de ce type de cellules cancéreuses (Dil et al., 2011). La diminution de l'expression de la décorine mesurée dans les kératinocytes TSG-6^{-/-} peut donc être mise en relation avec le retard de migration observé pour ces mêmes kératinocytes.

Finalement, la migration des kératinocytes est dépendante de l'établissement de contacts focaux, par l'intermédiaire des intégrines, entre les microfilaments d'actine des cellules et les glycoprotéines de la MEC, tels que le collagène, la laminine et la fibronectine (Hopkinson et al., 2013). Il a d'ailleurs été montré qu'un défaut de dépôt de fibronectine est à la base d'une diminution de migration des kératinocytes (Hopkinson et al., 2013). De manière intéressante, la protéine TSG-6 interagit avec la fibronectine pour organiser la MEC (Kutznestova et al., 2008). Il est donc possible qu'en absence de la protéine TSG-6, la MEC en général et la fibronectine en particulier dans le cas qui nous intéresse soient désorganisées, ce qui induirait un défaut dans l'établissement des contacts focaux et donc un ralentissement de la migration des kératinocytes.

Afin de comprendre les différences de capacité migratoire entre les deux clones TSG-6^{-/-}, il serait intéressant de réaliser une comparaison phénotypique de ces kératinocytes. L'étude par microscopie à contraste de phase révèle des différences entre les deux clones TSG-6^{-/-} (Figure 47). Le clone TSG-6^{-/-} (a) présente une morphologie plutôt fibroblastique avec de nombreuses extensions cytoplasmiques alors que les cellules TSG-6^{-/-} (b) sont bien polyédriques comme les kératinocytes TSG-6^{+/+}. De manière cohérente, les résultats tirés du *RNA sequencing* montre une expression augmentée de la vimentine dans les kératinocytes TSG-6^{-/-} (a) par rapport aux cellules TSG-6^{-/-} (b), suggérant que ces cellules

transitionnent possiblement vers une forme mésenchymateuse (Yan et al., 2010). Il est aussi intéressant de noter que les kératinocytes TSG-6^{-/-} présentent des différences dans l'expression relative en ARNm codant pour certaines intégrines. Dans l'épiderme, les kératinocytes expriment principalement les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ (Hopkinson et al., 2013) et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ au niveau des hémidesmosomes (Simpson et al., 2011). Alors que l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 9$ et $\beta 1$ sont similaires, les analyses de *RNA sequencing* montrent que l'expression des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 6$ et $\beta 4$ sont plus faibles dans le clone (a) par rapport au clone (b). De la même manière, les kératinocytes TSG-6^{-/-} (a) ont une moindre expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, qui lie notamment la fibronectine et est impliquée dans la réparation tissulaire (Watt et Jones, 1993), ce qui pourrait expliquer que les kératinocytes TSG-6^{-/-} (a) présentent un retard de migration plus important que les kératinocytes TSG-6^{-/-} (b). L'étude de migration d'un troisième clone permettrait d'avoir une idée plus précise de l'implication de la protéine TSG-6 dans la migration des kératinocytes. Il est à noter que l'analyse des transcrits, par *RNA sequencing*, d'un troisième clone a été réalisée et que les niveaux d'expression des sous-unités des intégrines sont comparables à ceux du clone (b).

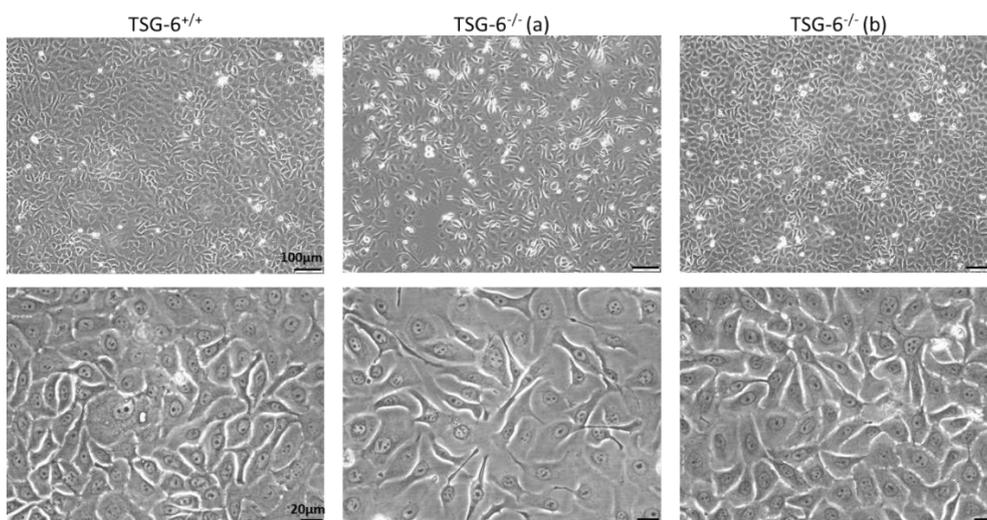


Figure 47 : Observation au microscope à contraste de phase de kératinocytes TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} cultivés en monocouche jusqu'au stade de confluence.

3.2. Réponses à l'(HB-)EGF

Comme précédemment expliqué, la matrice extracellulaire, formée notamment d'HA, peut séquestrer des molécules afin de maîtriser et réguler la réaction inflammatoire (Dyer et al., 2014). C'est notamment le cas de l'HB-EGF (Thönes et al., 2019). Ainsi, dans le contexte de la cicatrisation cutanée, il est connu que les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les fragments d'HA de bas poids moléculaire induisent la production d'HB-EGF (Mathay et al., 2008) (Kavasi et al., 2017). De même, dans la dermatite atopique, l'HB-EGF est particulièrement surexprimé par les kératinocytes, ce qui se

caractérise par un épiderme hyperplasique (Mathay et al., 2008 et 2011). Sans délai dans ces contextes inflammatoires, l'HB-EGF ancré en membrane est clivé et se retrouve sous forme soluble dans la MEC (Giltaire et al., 2011). A ce niveau, l'HB-EGF lie les GAG et se trouve stabilisé par la MEC, formant une sorte de réservoir dont le contenu peut être libéré de manière régulée (Thönes et al., 2019). Lorsqu'il est libéré, l'HB-EGF, comme l'EGF, peut alors se lier à l'EGFR pour activer en cascade les voies des MAP kinases, des PI3 kinases, mais aussi favoriser l'activation des STAT qui vont induire une augmentation de l'expression des HAS (Lee et al., 2019) (Monslow et al., 2009). D'autre part, la liaison de l'HB-EGF à l'EGFR stimule la migration cellulaire et accélère la cicatrisation par activation de la voie EGFR/MEK/ERK (Giltaire et al., 2011) (Uchiyama et al., 2019).

C'est pourquoi nous avons, dans un premier temps, traités des kératinocytes TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} cultivés en monocouche avec de l'EGF (Figure 48a). La phosphorylation de l'EGFR est apparue similaire quel que soit le génotype des kératinocytes traités. Une diminution de la phosphorylation de l'EGFR apparaît dans les trois clones étudiés traités aux interleukines et à l'EGF par rapport aux tissus traités uniquement à l'EGF. Il est envisageable que le traitement aux interleukines 4 et 13 induisent une relocalisation partielle de l'EGFR, le rendant moins disponible pour l'EGF. Dans un second temps, des épidermes reconstruits à partir de kératinocytes non édités et déficients pour la protéine TSG-6 ont été traités avec de l'EGF (Figure 48b ; résultats non-publiés).

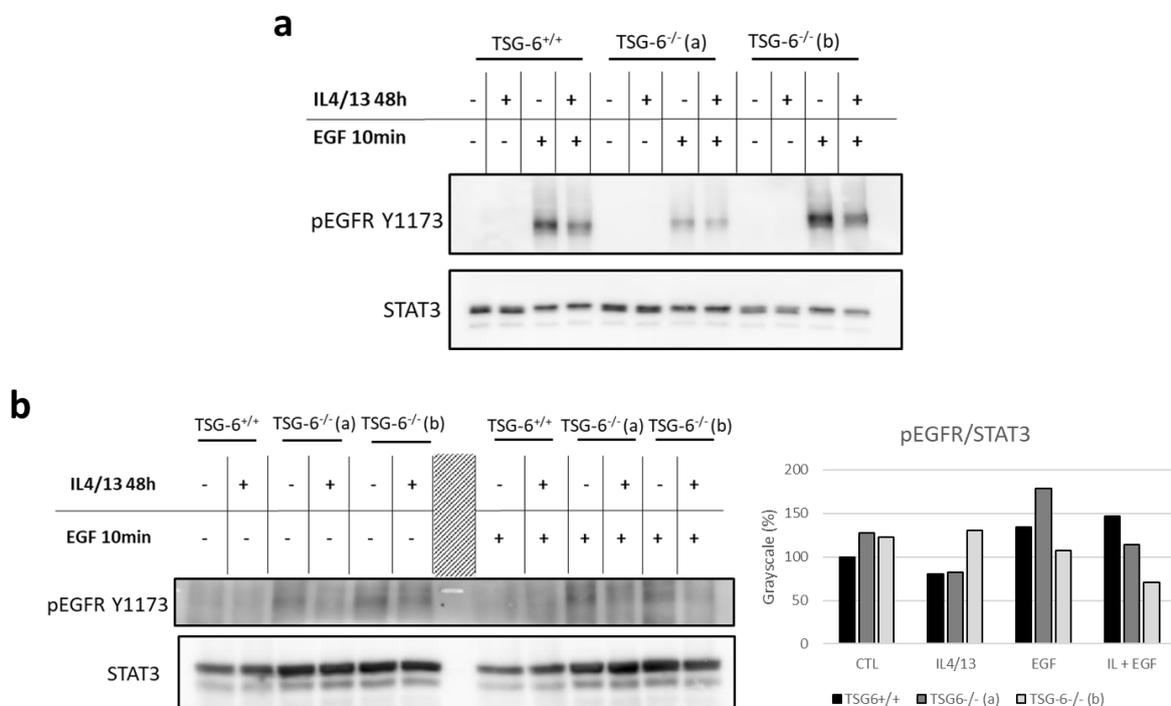


Figure 48 : Analyse protéique de la phosphorylation de l'EGFR (tyrosine 1173) suite à un traitement à l'EGF sur des kératinocytes TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} cultivés (a) en monocouche et (b) sur RHE. Le marqueur de charge est STAT3. (c) Quantification relative des niveaux de gris correspondants à la phosphorylation de l'EGFR dans les RHE par Image J (n=1)

Dans ces conditions, la phosphorylation de l'EGFR est apparue beaucoup plus faible que lors des traitements des cultures en monocouche, laissant apparaître un bruit de fond important et rendant compliquée l'interprétation des résultats, même après quantification (Figure 48c). Cette faible détection de la phosphorylation du récepteur de l'EGF peut s'expliquer par le fait que, bien que l'EGFR soit exprimé dans les couches basales et supra-basales de l'épiderme, il ne serait parfaitement actif que dans la couche basale. En effet, l'EGFR phosphorylé ne semble localisé que dans la couche basale (Getsios et al., 2009). Cette activation de l'EGFR restreinte au niveau des kératinocytes de la couche basale a été mise en évidence dans notre laboratoire suite à une exposition des RHE à des substances sensibilisantes (Frankart et al., 2012b). Getsios *et al.* (2009) suggèrent que la desmogléine 1, protéine impliquée dans la formation des jonctions intercellulaires de type desmosomes, serait impliquée dans la suppression de l'activité de l'EGFR dans les couches supra-basales afin de permettre aux kératinocytes de quitter leur état prolifératif et poursuivre leur processus de différenciation (Getsios et al., 2009). Néanmoins, alors que la phosphorylation du récepteur à l'EGF apparaît très faible, ERK apparaît phosphorylé dans les RHE TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} traités à l'EGF (Figure 49a) ou à l'HB-EGF (Figure 49b). Aucune différence n'est cependant observée entre les kératinocytes édités et les kératinocytes non édités. Les autres acteurs impliqués dans les voies de signalisation des MAPK, des STAT et des PI3K présentent jusqu'à présent des degrés de phosphorylation très variables d'une expérience à l'autre qui nous laissent penser que nos procédures et les technologies utilisées sont à revoir pour approfondir valablement cette intéressante question.

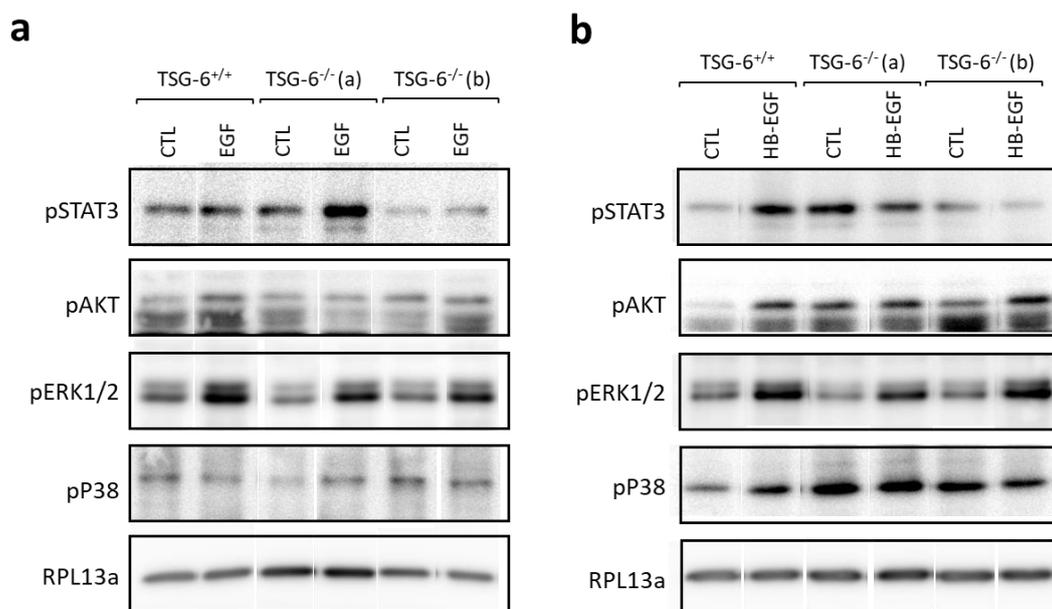


Figure 49 : Analyse protéique des voies de signalisation des MAPK, PI3K et STAT suite à un traitement de 10min à (a) l'EGF et (b) l'HB-EGF dans des RHE TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-}. Le marqueur de charge est RPL13a

En parallèle de l'étude de la présentation de l'(HB-)EGF à l'EGFR et les voies de signalisation qui en découlent, il serait intéressant d'explorer l'effet de la désorganisation de la matrice d'HA sur son récepteur CD44. Ce récepteur est localisé dans les membranes plasmiques au niveau des radeaux lipidiques, comme l'EGFR d'ailleurs (Pasonen-Seppanen et al., 2003). De plus, il a été mis en évidence, dans des lignées de cellules cancéreuses, que les récepteurs EGFR et CD44 interagissent clairement pour auto-réguler la synthèse de l'HA (Monslow et al., 2009). En se liant à CD44, l'HA peut notamment induire les voies de signalisation de PI3K qui produisent des effets sur le cytosquelette qui augmentent la migration des kératinocytes (Bourguignon et al., 2014).

3.3. Réponses aux infections par dermatophytes

Un des modèles identifiés dans cette étude pour surexprimer la protéine TSG-6 et étudier son rôle épidermique est le modèle d'infection des RHE par des éléments fongiques. L'infection par les dermatophytes mime une dermatophytose et surtout les réponses qu'elle induit au niveau des kératinocytes (Faway et al., 2017). Alors que l'infection se développe pendant 4 jours, la protéine TSG-6 apparaît surexprimée et massivement sécrétée au 4^{ème} jour de l'infection, lorsque les éléments fongiques ont colonisé la couche cornée de l'épiderme et atteignent par conséquent les couches formées par les kératinocytes encore vivants.

Étant donné que la protéine TSG-6 est une protéine anti-inflammatoire et donc potentiellement impliquée dans la maîtrise qu'exerce un tissu pour se protéger d'une situation qui peut être délétère, le développement et la progression de l'infection par dermatophytes sur des RHE déficients pour la protéine TSG-6 est actuellement en cours d'investigation par une étudiante de Master (mémoire 2021 de Chloé Matthys). Ces résultats non publiés nous apprennent déjà que les éléments fongiques dégradent la couche cornée et atteignent les couches vivantes des épidermes TSG-6^{-/-} plus rapidement que dans les épidermes TSG-6^{+/+}. Pourtant, les deux tissus présentent des barrières qui semblent comparables avant l'infection (mesure de résistance électrique trans-épithéliale et perméabilité à la *Lucifer yellow* sont similaires).

Une première hypothèse est suggérée par une possible faible activation des Toll-Like Receptors. Yuki *et al.* ont montré que l'application de composants de paroi bactérienne (peptidoglycans) à la surface de la couche cornée de l'épiderme déclenche rapidement les voies de signalisation dépendant des TLR 2 et 4 et que ces voies renforcent les jonctions serrées et par conséquent la fonction de barrière de l'épiderme (Yuki et al., 2011). Au cours d'une infection fongique, les dermatophytes qui adhèrent et envahissent les couches kératinisées superficielles de l'épiderme sécrètent des protéases (Monod et al., 2008), mais aussi des vésicules extracellulaires qui stimulent les kératinocytes à produire et

sécréter des médiateurs pro-inflammatoires (Bitencourt et al., 2018). Même si cela n'a pas été testé encore (mais constitue le projet de recherche mené depuis peu par Bastien Tirtiaux dans notre équipe), il est envisageable que ces vésicules extracellulaires et protéases diffusent entre les cornéocytes pour rejoindre la MEC des couches vivantes de l'épiderme. Si la conséquence est une activation des signalisations situées en aval des TLR, celles-ci peuvent induire des réponses qui vont renforcer la barrière pour lutter contre l'infection. En effet, des études *in vivo* ont montré que les kératinocytes des couches vivantes sécrètent des peptides antimicrobiens et que les TLR 2 et 4 se trouvent activés au niveau des kératinocytes vivants de l'épiderme, même quand l'infection reste confinée au niveau de la couche cornée (Brasch et al., 2014). Quand la protéine TSG-6 ne peut être exprimée, l'absence de l'organisation d'HA dans la MEC dont elle semble responsable pourrait fort bien affecter la présentation naturelle des ligands reconnus par les TLR. En effet, la barrière ne pouvant dans ce cas se trouver normalement renforcée, on peut émettre l'hypothèse qu'une invasion plus rapide des couches vivantes de l'épiderme par les dermatophytes est une conséquence assez probable d'une telle situation. Afin d'investiguer cette hypothèse, les voies de signalisation en aval des TLR, des MAPK et NFκB par exemple (Figure 50), vont être analysées dans des épidermes TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} infectés par les dermatophytes.

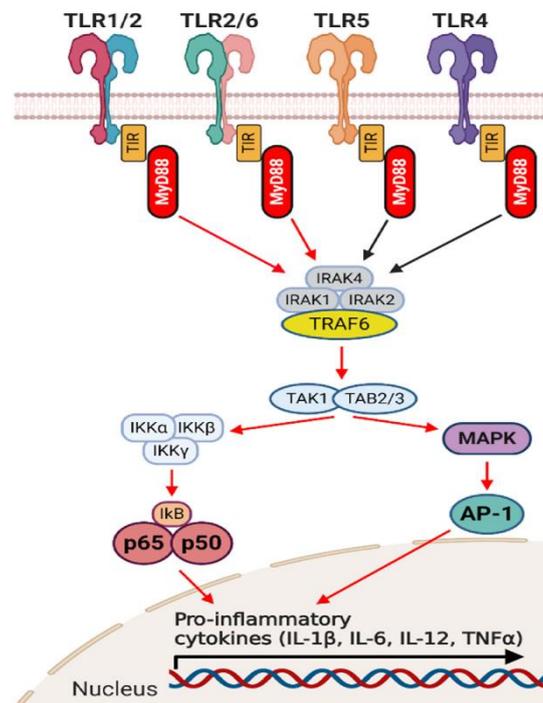


Figure 50 : Schéma des voies de signalisation en aval des TLR (Adapté de Di Lorenzo et al., 2020)

Une seconde hypothèse est davantage basée sur la composition des cornéocytes. En absence de la protéine TSG-6, l'HA a tendance à diffuser plus rapidement vers le compartiment sous-jacent à l'épiderme, ce qui ne peut laisser qu'une quantité amoindrie d'HA localisée entre les kératinocytes des

couches vivantes. Dans de telles conditions, il est concevable qu'une plus faible quantité d'HA soit disponible pour lier le récepteur CD44 et l'enzyme de dégradation HYAL2, impliqués ensemble dans la dégradation de l'HA via la coopération de CD44-HYAL2-HYAL1 au niveau de la couche granuleuse (Tammi et al., 2000) (Stern, 2003) (Malaisse et al., 2015). Si tel est le cas, seule une faible quantité de fragments d'HA pourrait se retrouver dans les cellules de la couche cornée et avoir comme conséquence directe une diminution de l'hydratation cutanée, éventuellement similaire à celle observée dans la dermatite atopique, laquelle est généralement due à l'absence de NMF. En conséquence, la barrière des RHE TSG-6^{-/-} pourrait s'en trouver légèrement déforcée et devenir plus susceptible aux infections fongiques ; rappelant d'ailleurs que les patients atteints de DA sont plus susceptibles aux infections bactériennes au niveau de leurs lésions (Breuer et al., 2001). Afin de tester cette hypothèse, l'hydratation des couches cornées des épidermes TSG-6^{-/-} devra être comparée à celle des épidermes normaux TSG-6^{+/+}.

3.4. Réponses aux cytokines Th2 (IL-4 et IL-13)

Dans le deuxième modèle permettant d'étudier les fonctions de la protéine TSG-6 en contexte inflammatoire, des RHE ont été traités avec des cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-13) dans le but de mimer la dermatite atopique. Dans les kératinocytes, ces interleukines lient les récepteurs de type I et de type II. Le récepteur de type II est constitué d'une sous unité d'IL-4R α et d'une sous unité d'IL-13R α 1 et est par conséquent capable de se trouver activé aussi bien par l'IL-4 que par l'IL-13 (Junghans et al., 1996) (Wongpiyabovorn et al., 2003). Le récepteur de type I composé d'une sous-unité d'IL-4R α et d'une sous unité d'IL-2R γ a longtemps été considéré comme ayant une localisation restreinte aux cellules immunitaires. Cependant, dans le cadre de sa recherche au sein de notre laboratoire, Audrey Progneaux a mis en évidence l'expression stimulable de ce récepteur de type I dans les kératinocytes humains (Progneaux et al., 2022 *en préparation*). Ces deux types de récepteur activent les voies des MAP kinases, ainsi que la voie des STAT et celle de la PI3K (Progneaux et al., 2022 *en préparation*). Enfin, l'IL-13 peut également lier l'IL-13R α 2 dont la présence à la surface des kératinocytes est aussi inductible et dont le rôle pour éventuellement détourner ce ligand du récepteur de type II n'est pas encore clair (Figure 51) (David et al., 2001).

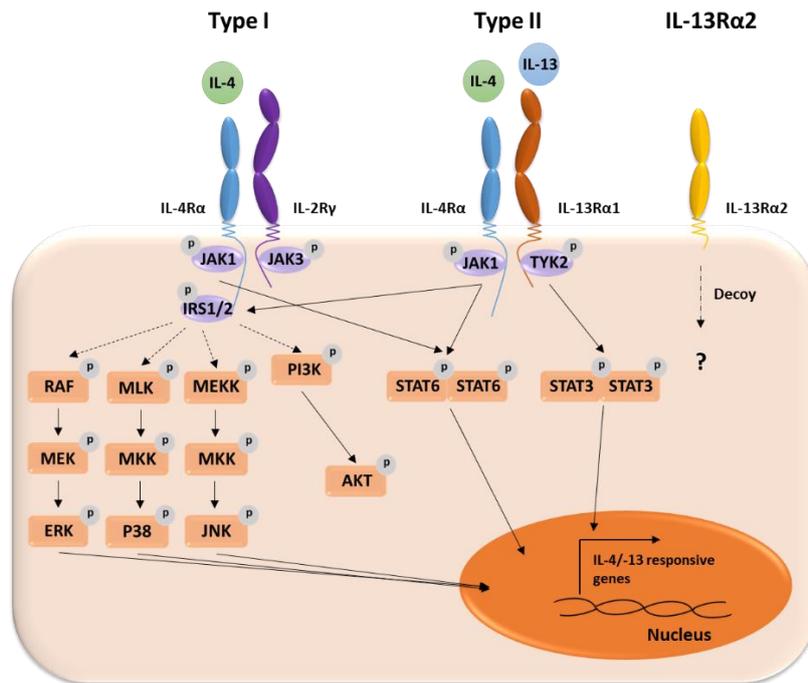


Figure 51 : Représentation schématique des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans les kératinocytes ainsi que leurs voies de signalisation (Progneaux et al., 2022 *en préparation*)

Il semblerait que la stimulation de l'expression de la protéine TSG-6, suite à un traitement aux IL-4 et IL-13 soit la conséquence de l'activation du récepteur de type II. En effet, dans les épidermes reconstruits à partir de kératinocytes déficients pour la sous unité IL-13Rα1, spécifique du récepteur de type II, le traitement aux interleukines ne montre aucune modification de l'expression en ARNm de TSG-6 (Figure 52a ; résultats non-publiés). Dans un épiderme déficient pour la sous unité IL-2Rγ typique du récepteur de type I, le traitement aux IL-4 et IL-13 induit une augmentation de l'expression de TSG-6, comme dans les kératinocytes non édités (Figure 52b).

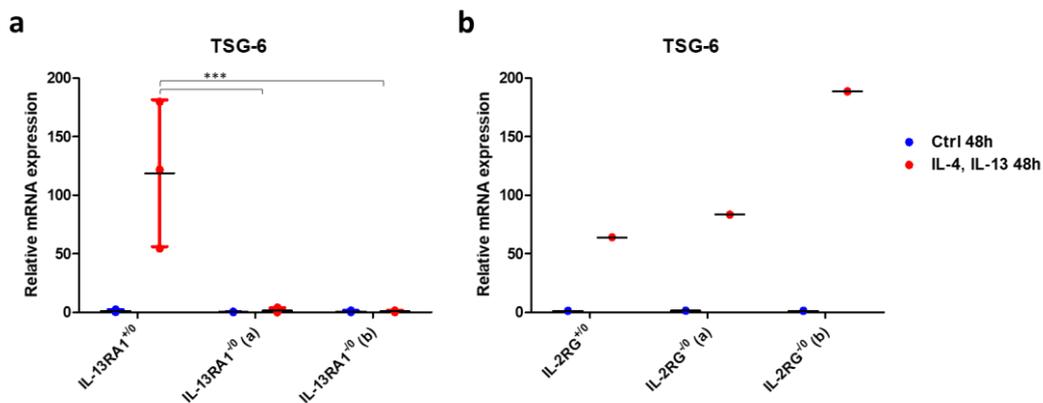


Figure 52 : Expression relative en ARNm de TSG-6 en conditions contrôles et traitées aux IL-4 et IL-13 dans les RHE déficients (a) pour la sous unité IL-13RA1 du récepteur de type II (n=3 ; ANOVA2 ; \pm SD ; ***p < 0.001) et (b) pour la sous unité IL-2RG du récepteur de type I (n=1)

Sachant que la présentation des cytokines à leur récepteur peut se trouver indirectement régulée par la protéine TSG-6, notamment par sa réticulation de la matrice d'HA, la signalisation en aval des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans les RHE TSG-6^{-/-} par rapport aux RHE non édités présente un intérêt dans la compréhension du rôle de la protéine TSG-6 et de l'HA présents dans la MEC épidermique. Les premiers résultats obtenus ne montrent toutefois quasiment pas de différence entre la signalisation intracellulaire des kératinocytes TSG-6^{-/-} et des kératinocytes TSG-6^{+/+} en réponse aux IL-4 et IL-13 (Figure 53). La phosphorylation des MAP kinases étudiées (ERK et p38) ne semble pas être affectée par le génotype des cellules, de même que la phosphorylation d'AKT. La phosphorylation de STAT6 semble également identique dans les RHE TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-} traités aux interleukines. En revanche, alors que la phosphorylation de STAT3 augmente à la suite du traitement aux interleukines des RHE non édités, il semblerait par contre que la phosphorylation de STAT3 soit légèrement atténuée dans les kératinocytes TSG-6^{-/-} exposés à ces interleukines. De manière intéressante, l'étude des souris Stat3^{-/-} a mis en évidence l'implication de cette protéine dans la migration des kératinocytes et la cicatrisation (Sano et al., 2008). L'absence de l'activation de STAT3, suite à un traitement aux interleukines, serait cohérente avec notre résultat qui montre que la migration des kératinocytes déficients pour la protéine TSG-6 se trouve retardée. Néanmoins, l'étude des phosphorylations montre jusqu'à présent une variabilité problématique qui rend difficile l'interprétation des résultats, et qu'il faut de ce fait considérer avec toutes les précautions requises. Pour plus de précision, ajoutons que des traitements aux interleukines plus brefs (10 min) pourraient être réalisés afin d'étudier la réponse rapide des kératinocytes en termes de signalisation. De plus, l'étude d'autres acteurs de ces voies de signalisation devraient également être réalisée pour compléter les observations déjà réalisées.

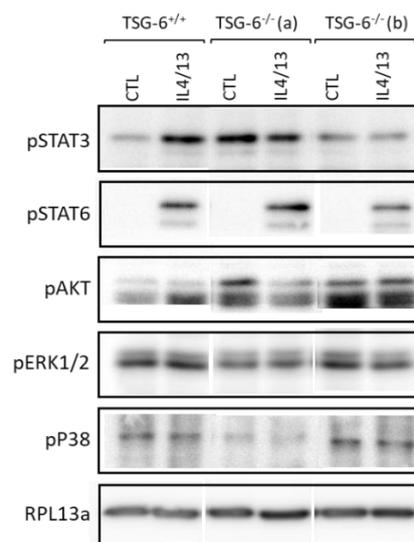


Figure 53 : Analyse protéique des voies de signalisation des MAPK, PI3K et STAT suite à un traitement de 48h aux IL-4/13 dans des RHE TSG-6^{+/+} et TSG-6^{-/-}. Le marqueur de charge est RPL13a

Pour terminer, il est intéressant de constater que l'expression accrue de la protéine TSG-6 dans un modèle *in vitro* qui mime la dermatite atopique est cohérente avec les études menées *in vivo* sur des peaux lésionnelles de dermatite atopique. L'étude d'ARNm provenant de peaux de patients atteints de DA, fournies par Hélène Le-Buanec, nous a en effet permis de mettre en évidence l'augmentation d'expression relative de TSG-6 dans cette pathologie cutanée par rapport aux peaux de patients sains. De manière intéressante, le niveau de surexpression de TSG-6 ne semble pas lié au niveau de sévérité de la pathologie, déterminé par le SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*). En effet, les patients présentant un score élevé attestant d'une forme sévère de la maladie ne présentent pas nécessairement un haut niveau d'expression de la protéine TSG-6 (données non publiées). Cette absence de corrélation peut s'expliquer par le fait que la dermatite atopique est une maladie complexe et multifactorielle dans laquelle de nombreux processus prennent place.

Cette augmentation de l'expression relative en ARNm de TSG-6 dans les peaux de DA est également observée dans plusieurs études à grande échelle menées sur des peaux lésionnelles de DA (Plager et al., 2010) (Quaranta et al., 2014) ainsi que dans d'autres pathologies similaires telle que la dermatite de contact (Tan et al., 2017). Notons que les analyses réalisées sur les peaux de DA concernent l'ensemble de la peau et par conséquent, tous les types cellulaires associés (kératinocytes, fibroblastes, cellules immunitaires, etc.). Une analyse transcriptomique d'un séquençage de l'ARN de chaque cellule indépendante (*single-cell RNA sequencing*) permet d'étudier l'expression en ARNm spécifique aux kératinocytes provenant de peaux saines et de peaux de patients atteints de DA (Reynolds et al., 2021). Cette analyse a mis en évidence que plusieurs kératinocytes extraits de peaux de DA expriment TSG-6 par rapport à la population de kératinocytes provenant de peaux saines (Evrard et al., 2021). De manière intéressante, on remarque que seulement certains kératinocytes expriment des transcrits de la protéine TSG-6 (Figure 3d de Evrard et al., 2021), de la même façon que l'hybridation *in situ* réalisée sur les épidermes reconstruits *in vitro* nous donne des images dans lesquelles l'ARNm de TSG-6 est restreint à seulement quelques cellules (Figure 6c de Evrard et al., 2021). Ces résultats suggèrent que la protéine TSG-6 est surexprimée *in vivo* dans les peaux lésionnelles de DA et qu'au moins une part de cette surexpression a lieu au niveau des kératinocytes épidermiques, comme démontré *in vitro*.

CONCLUSIONS

En compilant les résultats présentés dans ce manuscrit qui concernent le métabolisme de l'HA et la fonction de la protéine TSG-6 dans l'épiderme humain, nous proposons le modèle suivant pour englober l'essentiel des observations et des informations recueillies.

Dans un épiderme sain, l'HA est majoritairement synthétisé et libéré dans la MEC au niveau des couches basale et granuleuse de l'épiderme par la HAS1. Ces molécules d'HA de haut poids moléculaire sont faiblement réticulées par la protéine TSG-6 qui n'est sécrétée dans ces conditions qu'en relativement faible quantité dans la MEC. La rétention et l'organisation de l'HA permet de former une matrice dense et stable. Au niveau de la couche granuleuse, l'HA est internalisé et dégradé dans les cellules par interaction avec l'axe CD44-HYAL2-HYAL1. Des fragments d'HA de bas poids moléculaires sont ainsi produits et se retrouvent dans les cornéocytes où ils jouent probablement un rôle dans l'hydratation cutanée avec les NMF (Figure 54).

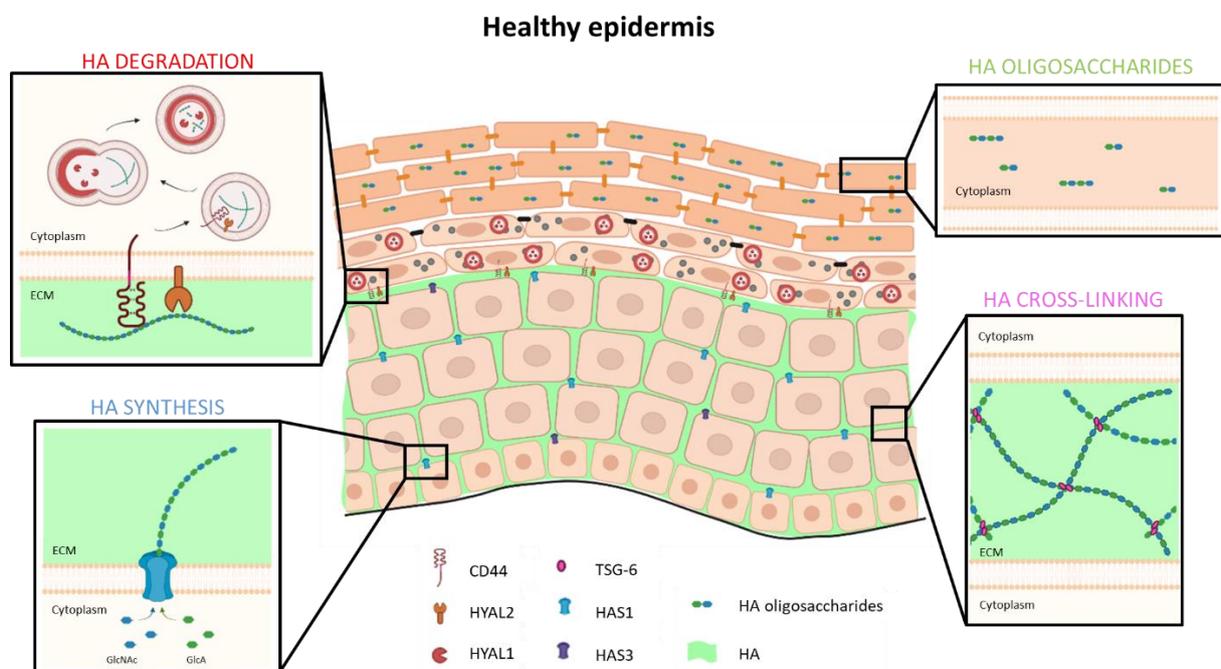


Figure 54 : Représentation schématique du métabolisme de l'HA dans un épiderme sain

Dans un épiderme pathologique, par exemple en cas de lésion de dermatite atopique, un basculement d'expression des HAS est observé. La HAS3 devient très active et sécrète de nombreux fragments d'HA de bas poids moléculaire dans la MEC. Simultanément, la protéine TSG-6 est produite et sécrétée en quantité plus importante et lie l'HA, ce qui pourrait favoriser sa rétention et son accumulation massive et contribuer au développement de la spongiose caractéristique de cette pathologie. Les lésions de dermatite atopique étant caractérisées par l'absence d'une couche granuleuse, il est possible que l'enzyme HYAL1 y soit absente puisque c'est normalement à ce niveau qu'elle se trouve. Il est d'ailleurs

intéressant de noter que les cornéocytes des souris *Hyal1*^{-/-} contiennent des molécules d'HA de haut poids moléculaire, alors que seuls des fragments inférieurs à 6×10^4 Daltons sont détectés dans les cornéocytes des souris sauvages. De même, la couche superficielle parakératosique typique de la dermatite de contact contient de l'HA de poids moléculaire supérieur à 6×10^4 Daltons (Wells et al., 1991). Nous proposons donc que les cornéocytes des lésions de DA présentent des fragments d'HA de plus haut poids moléculaire que dans les peaux saines. Alors que les fragments d'HA de bas poids moléculaire contribueraient à l'hydratation comme les NMF, les fragments d'HA de haut poids moléculaire présents en excès dans la couche cornée auraient un impact négatif sur les propriétés de cette couche, et par conséquent sur sa fonction de barrière. En effet, les fragments d'HA de poids moléculaire de haut poids moléculaire sont capables de retenir une plus grande quantité d'eau dans les tissus si on les compare aux petits fragments d'HA. On peut imaginer qu'une telle situation contrecarre la formation de la couche cornée normalement hydrophobe et conduit à une perméabilité épidermique potentiellement accrue (Figure 55).

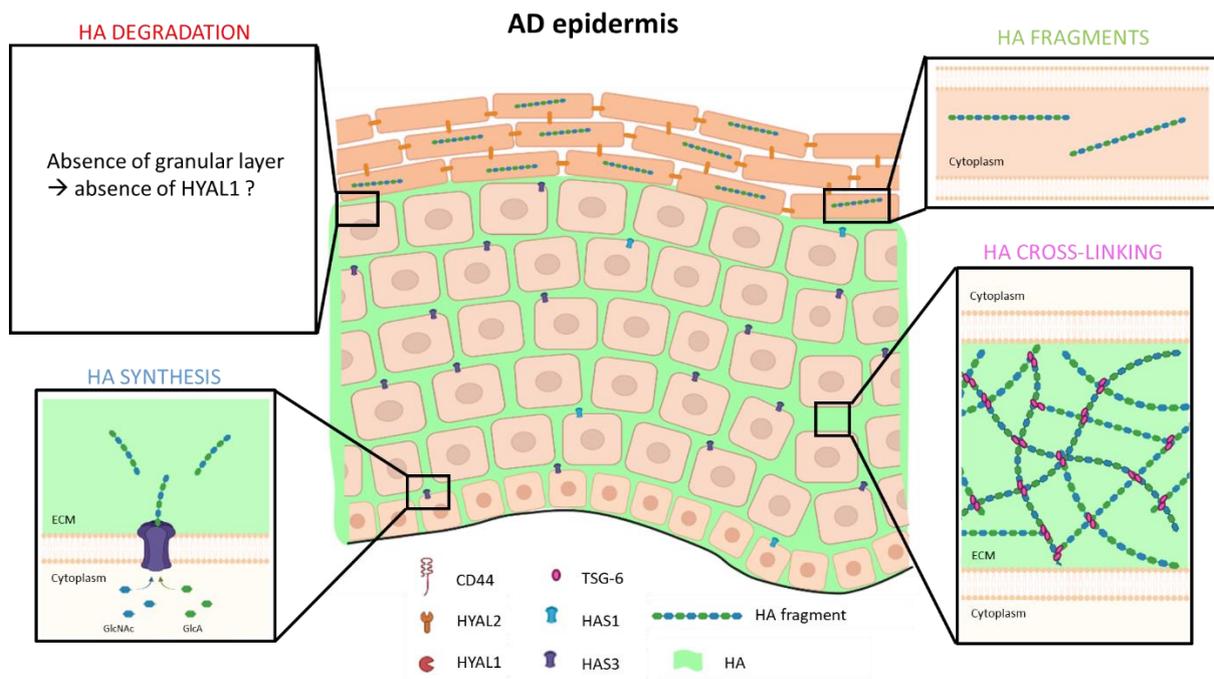


Figure 55 : Représentation schématique du métabolisme de l'HA dans un épiderme lésionnel de dermatite atopique

ANNEXES

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Review

Epidermal Hyaluronan in Barrier Alteration-Related Disease

Céline Evrard, Catherine Lambert de Rouvroit and Yves Poumay *

Department of Medicine, Research Unit for Molecular Physiology (URPhyM), Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, B-5000 Namur, Belgium; celine.evrard@unamur.be (C.E.); catherine.lambert@unamur.be (C.L.d.R.)

* Correspondence: yves.poumay@unamur.be; Tel.: +32-(0)81-72-42-57

Abstract: In skin, although the extracellular matrix (ECM) is highly developed in dermis and hypodermis, discrete intercellular spaces between cells of the living epidermal layers are also filled with ECM components. Herein, we review knowledge about structure, localization and role of epidermal hyaluronan (HA), a key ECM molecule. HA is a non-sulfated glycosaminoglycan non-covalently bound to proteins or lipids. Components of the basal lamina maintain some segregation between the epidermis and the underlying dermis, and all epidermal HA is locally synthesized and degraded. Functions of HA in keratinocyte proliferation and differentiation are still controversial. However, through interactions with partners, such as the TSG-6 protein, HA is involved in the formation, organization and stabilization of the epidermal ECM. In addition, epidermal HA is involved in the formation of an efficient epidermal barrier made of cornified keratinocytes. In atopic dermatitis (AD) with profuse alterations of the epidermal barrier, HA is produced in larger amounts by keratinocytes than in normal skin. Epidermal HA inside AD lesional skin is located in enlarged intercellular spaces, likely as the result of disease-related modifications of HA metabolism.

Keywords: hyaluronan; epidermal extracellular matrix; atopic dermatitis

Citation: Evrard, C.; Lambert de Rouvroit, C.; Poumay, Y. Epidermal Hyaluronan in Barrier Alteration-Related Disease. *Cells* **2021**, *10*, 3096. <https://doi.org/10.3390/cells10113096>

Academic Editor: Michèle T. Martin

Received: 14 October 2021
Accepted: 08 November 2021
Published: 9 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hyaluronan, also called hyaluronic acid (HA), is a linear non-sulfated glycosaminoglycan (GAG) present in extracellular matrices (ECM) of vertebrates [1]. In a 70 kg human body, HA represents around 15 g [2]. First identified in the vitreous humor, HA is also present in skin, muscles, skeleton, and synovial fluid where it plays a role in shock absorption. The skin contains 50% of total HA [3,4]. While the majority of cutaneous HA is localized in the dermis, a significant amount is found between keratinocytes of basal and spinous layers of epidermis [5]. In the epidermis, HA is involved in the establishment of a competent barrier and plays controversial roles in keratinocyte proliferation and differentiation. Some of these functions are made possible by its binding to the membrane receptor CD44 (see Section 3.5 below for further details on CD44) [6]. Other protein partners are involved in HA functions and ECM organization. In particular, the TSG-6 protein appears to be essential for the retention of HA in the epidermal ECM and its organization. The importance of HA in the skin has been reviewed by Kavasi et al., 2017 [7], and Muto et al., 2019 [8]. The present review focuses on HA in the epidermal extracellular matrix and its potential implication in atopic dermatitis, a disease associated with an altered epidermal barrier.

2. The Epidermal Extracellular Matrix

In skin, the ECM is most abundant in dermis and hypodermis. However, a discrete ECM is, nonetheless, present in the epidermis between cells of the living basal, spinous,

and granular layers, where keratinocytes are separated by intercellular spaces approximately 15–20 nm thick. Thereby, the epidermal ECM can solely be directly observed by transmission electron microscopy (Figure 1).

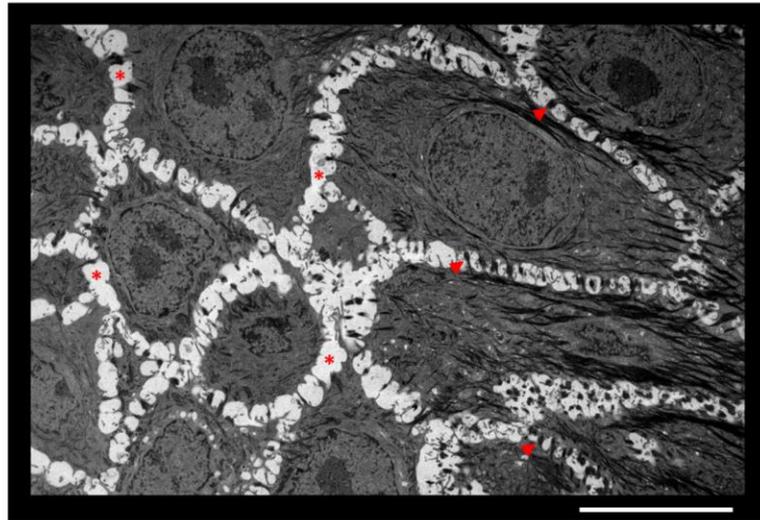


Figure 1. Intercellular spaces between keratinocytes of epidermis. Granular layer of an in vitro reconstructed human epidermis observed by transmission electron microscopy. Adjacent keratinocytes are separated by ECM (*) and anchored to each other by desmosomes (arrowheads). Scale bar = 10 μ m.

The sugar-rich composition of epidermal ECM was first revealed in 1951 using Alcian blue staining [9]. The epidermal ECM is accordingly largely composed of carbohydrate macromolecules called glycosaminoglycans (GAGs). Among GAGs, those with covalent link to serine residues in core-proteins give rise to proteoglycans. Heparan sulfate and chondroitin sulfate, for instance, account, respectively, for 60% and 20% of such GAGs in the epidermis [10], where they participate in formation of proteoglycans, such as glypican, syndecans (1 to 4), and versican [11–13]. Hyaluronan, the only non-sulfated GAG and the only GAG without link to proteins, is also found in the epidermal ECM [5]. An in vitro study of human keratinocytes has shown that HA accounts for 54% of GAGs released in culture medium by this cell type [14]. In human skin, the epidermal ECM contains 25 μ g of HA/g of fresh epidermis, while the dermis contains between 120 and 200 μ g of HA/g of fresh dermis [3,15]. Together, GAG and proteoglycans create a specialized intercellular environment favorable to the diffusion of nutrients, growth factors, and cytokines [12,16], as well as for eventual upcoming immune cells. Furthermore, some types of chondroitin sulfate proteoglycans (e.g., MCSP) are expressed in an age-dependent manner by epidermal cells that exhibit stem cell properties [17].

The ECM can be divided into two zones: the pericellular matrix and the intercellular matrix. The pericellular matrix is in close contact with neighboring cells, allowing direct interaction with cellular receptors [18]. In pericellular matrix, HA can interact with its trans-membrane receptor CD44, and cytokines and growth factors can rapidly bind their receptors. The intercellular matrix is found between cells without direct contact [18]. In the epidermis, intercellular spaces are very thin. Nevertheless, they can increase in certain pathologies, such as atopic dermatitis, which is characterized by an increased epidermal HA production able to retain a large amount of water, thereby creating spongiosis [19]. These increased spaces notably promote the migration of immune cells into the epithelial tissue.

3. Epidermal Hyaluronan

3.1. Molecular Structure of HA

HA is composed of repeated disaccharide units made of D-glucuronic acid (GlcUA) and D-N-acetylglucosamine (GlcNAc). These saccharides are bound by β -1.3 and β -1.4 linkages to form long linear polymers $[\beta$ 1.4-GlcUA- β 1.3-GlcNAc] $_n$ of high molecular weights, usually ranging from 10^5 to 10^7 Daltons, and from 2 to 25 μ m in length [20,21]. HA polymers interact with proteins [3], although they never bind through covalent link. Specific HA-interacting proteins are called hyaladherins or HA-binding proteins (HABP). Some of them, such as CD44 and RHAMM, are membrane-bound, and recognized as two HA receptors on cell plasma membrane. Other hyaladherins are secreted into the ECM, such as the TNF α -stimulated-gene-6 (TSG-6) protein involved in extracellular cross-linking of HA [22]. Some proteoglycans, such as versican, are also able to bind HA via their N-terminal domain, thereby creating complex molecular networks in the ECM [2,16,23]. Moreover, since HA carries negative charges, this macromolecule can retain a large amount of water (up to 70% of its weight) through its remarkable hydrophilicity. Such characteristics of HA confer viscoelastic properties to the HA-containing tissues and spaces [4,21].

3.2. Synthesis of HA

HA is synthesized by enzymes located at the inner side of the plasma membrane and simultaneously exported as polymers directly in the ECM. These enzymes, called HA synthases (HAS), are glycosyltransferases [24]. The substrates utilized by HAS enzymes are UDP- α -N-acetyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc) and UDP- α -D-glucuronate (UDP-GlcUA) originating from cellular metabolism of glucose [25]. In mammals, three HAS isoenzymes have been identified: HAS1, HAS2, and HAS3. Encoded by genes located on different chromosomes (19q13.3 for *HAS1*, 8q24.12 for *HAS2* and 16q22.1 for *HAS3*), HAS enzymes share 55 to 70% identity [26]. They contain, between N-terminal and C-terminal regions, a central region harboring 75–87% similarity [27]. All three enzymes have seven transmembrane domains [24] and have distinct binding domains for the two substrates [25]. Although structurally similar, the three HAS enzymes are characterized by very different temporal expression patterns, by the sizes of generated HA polymers, and by different enzymatic activities [27]. HAS activity is partially dependent on the concentration of available cellular UDP-GlcNAc. While their V_{max} do not show any significant differences, the K_m of HAS1 enzyme is more elevated than the K_m of HAS2 and HAS3 enzymes, showing that HAS1 exhibits a lower affinity for its substrate than HAS2 and HAS3 [27]. Consequently, HAS1 enzyme is unable to form HA polymers if the amount of available UDP-GlcNAc is low. On the other hand, the activity of HAS2 appears poorly influenced by substrate concentration, and the activity of HAS3 remains independent of UDP-GlcNAc concentration [28].

HAS1 mRNA is expressed during early stages of embryonic development (gastrulation and neurulation) and during cell differentiation. This synthase has a low enzymatic activity since the amount of product formed per minute is low. HAS1 enzyme uses large amounts of UDP-GlcNAc, allowing the production of high molecular weight HA polymers [27,28]. In the epidermis, an in vitro study showed that *HAS1* mRNA is expressed during keratinocyte differentiation [29]. HAS2 enzyme is essential during embryonic development [30]. While *HAS2* mRNA is very weakly expressed in adult tissues, its overexpression causes skin changes. In particular, *Has2* mRNA overexpression induces an increased amount of HA with increased thickness of the skin, as in the skin of the Sharpei dog breed [31]. Similarly, naked mole rats carry mutations in *Has2* gene that cause an abnormally enhanced synthesis of high molecular weight HA [32]. Conversely, in elderly humans, the typical thinning of the skin is accompanied by decreased *HAS2* mRNA expression [33]. HAS2 is characterized by a slightly higher activity than HAS1 and generates

in vitro HA polymers of comparable molecular weights. However, HA polymers generated by HAS2 in vivo in transfected cells exhibit higher molecular weights than those made by HAS1 [27]. HAS3 is the most active enzyme and synthesizes, therefore, low molecular weight polymers (100–1000 kDa) [27]. This enzyme is predominantly expressed in inflammatory processes (reviewed in Tavianatou et al., 2019 [34]), including inflamed skin [35]. Accordingly, Malaisse et al. (2014) [29] highlighted that *HAS3* mRNA is overexpressed in lesional atopic dermatitis skin, while *HAS1* mRNA was preferentially expressed in healthy epidermis. However, in a different study, divergent data indicate abundant mRNA expression of *HAS3* in healthy keratinocytes [36].

HAS activity can be modulated by growth factors and cytokines, such as keratinocyte growth factor (KGF), epidermal growth factor (EGF), tumor necrosis factor α (TNF- α), transforming growth factor β (TGF- β), and bone morphogenetic protein (BMPs), as well as by extracellular UTP [37–39]. Post-translational modifications of HAS enzymes can occur [40]. Phosphorylation [41,42] and O-GlcNAcylation [43] of HAS enzyme increases their activities. However, the link between post-translational modifications and changes in enzymatic activity remains unknown. Finally, some mono-ubiquitination of HAS2 could be involved in its enzymatic activity, as mutated lysine residue 190, the acceptor site for ubiquitin, is responsible for HAS2 enzyme inactivation [44].

3.3. Degradation of HA

The half-life of HA is relatively short in the epidermis, ranging from 1 to 2 days [3,45]. Enzymes responsible for HA degradation are endoglycosidases and exoglycosidases. Hyaluronidases (HYAL) are members of the endoglycosidase family and specifically cleave the β -1.4 bonds in HA polymers. The residual oligosaccharides are then hydrolyzed by exoglycosidases into β -D-glucuronate and β -N-acetyl-D-hexosamine [46]. In humans, five hyaluronidase-like genes and one pseudogene (*HYALP1*) have been identified. They share 40% similarity. *HYAL1*, 2, and 3 are located on chromosome 3p21.3 and have similar genomic structure with four exons. *HYAL4*, *HYAL5* (*PH20*), and *HYALP1* are located on chromosome 7q31.3 and present one extra exon compared to *HYALs* encoded on chromosome 3. Beside the hyaluronidase-like genes, another enzyme implicated in HA catabolism has been identified. *KIAA1199*, also named *CEMIP* (cell-migration inducing protein) or *HYBID* (HA-binding protein involved in HA depolymerization), is located on chromosome 15q25.1 and presents no significant similarity with other hyaluronidases [47]. *HYAL1*, *HYAL2*, *KIAA1199*, and *PH20* enzymes are able to cleave HA polymers [47,48]. While *PH20* has an activity restricted to spermatozoa, *KIAA1199*, *HYAL1*, and *HYAL2* are active in various somatic tissues. *KIAA1199* enzyme is notably involved in the regulation of infection-related dermis inflammation as its absence has been shown to increase inflammation and antimicrobial activity [49]. It is also implicated in photoaging skin through its action on fibroblasts [50]. It degrades HA by means of endocytosis of clathrin-coated membrane regions [50]. Only *HYAL1* and *HYAL2* are expressed by keratinocytes [51,52].

Hyaluronidase 1 is responsible for the cleavage of HA polysaccharides into di- or tetra-saccharides [47]. *HYAL1* is active in the skin and more specifically in keratinocytes within the granular layer [51]. In terms of subcellular localization, *HYAL1* is specifically localized in lysosomes, an acidic compartment (pH about 3.7) necessary for its activity, as the optimal pH for *HYAL1* is 3–4 [53,54]. Hyaluronidase 2 is structurally similar to *HYAL1* but has a different activity and localization. *HYAL2* protein is anchored to the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and generates fragments of HA around 20kDa of molecular weights [55,56]. *HYAL2* can be active at acidic (4) and neutral (7.5) pH [48]. In the epidermis, *HYAL2* enzyme is anchored in cell membranes of viable layers [52].

A cellular model of HA degradation based on the involvement of both *HYAL1* and *HYAL2* enzymes was proposed in the early 2000s [45,57]. Pericellular HA is believed to bind its CD44 receptor at the plasma membrane. *HYAL2* protein is also anchored to the

cell membrane, close to CD44, creating intimate vicinity between membrane-bound HA and HYAL2 protein, resulting in enzymatic degradation of HA polymers into 20kDa oligosaccharides, which then become internalized in endosomes, along with the enzyme. When HA fragments-containing endosomes fuse with lysosomes, the low pH inside the resulting compartment initiates the HYAL1-driven digestion of HA fragments into di- or tetra-saccharides.

At epidermal tissue levels, HA detected using procedures based on HABP appears mainly localized between keratinocytes that constitute basal and spinous layers, but it is not detected in granular and cornified layers [29]. While CD44 and HYAL2 proteins are anchored in the membrane of living layers [52,58], HYAL1 enzyme is active in lysosomal compartment of granular layer [51]. Over the course of differentiation, some residual intracellular HA oligosaccharides seem to end up inside cornified keratinocytes where they most likely play a role in skin hydration together with natural moisturizing factors (NMF) [20,51] (Figure 2). During keratinocyte migration towards the most superficial layers and as a result of the acidification of the upper layers, filaggrin becomes degraded into small free metabolites and amino acids, thereby forming NMF essential to skin hydration, barrier homeostasis and superficial desquamation. Skin hydration is a crucial factor involved in tissue resistance to mechanical stress and contributes to its resilience [59].

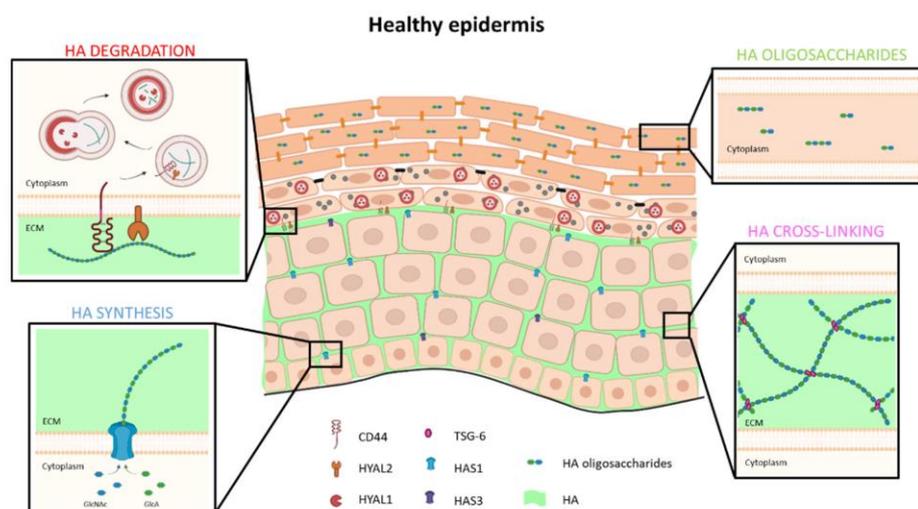


Figure 2. Model of HA metabolism in healthy human epidermis. HA is synthesized and extruded by HAS1 and, to a lesser extent, by HAS3 in ECM of basal and spinous layers. In ECM, TSG-6 protein binds and cross-links HA to trap it locally and form a dense matrix. In the granular layer, extracellular HA binds CD44. Simultaneously, HA is degraded into oligosaccharides by HYAL2 and internalized in endosomes which fuse with lysosomes. At acidic pH of lysosomes, HYAL1 enzyme is active and degrades HA in di- or tetra-saccharides. These low molecular weight HA are then found in corneocytes, where they participate in cutaneous hydration.

One might wonder whether HA present in the ECM of epidermis is exclusively metabolized by keratinocytes or whether exchanges occur between the dermis and the epidermis. Studies based on *in vitro* reconstructed epidermal models have shown that epidermal HA synthesized by keratinocytes is subsequently found under the epidermal tissue (either in medium [29], or in the supporting collagen matrix [60]), suggesting that HA molecules can escape the epidermis and diffuse into sub-epidermal spaces and, by extension, into the dermis. The skin epidermal-dermal junction is organized by basement membrane (BM) components that create the essential structure between epidermal and dermal HA. Indeed, when the epidermis of elderly people is exposed to sunlight, the BM is some-

how damaged by UV exposure, and smaller amounts of HA are observed in exposed epidermis than in unexposed tissue. In addition, the inhibition of metalloproteinases and heparanases, in an in vitro model of full thickness skin equivalent exposed to UV, protects the BM integrity and retains 25% additional HA when compared to HA amount in control epidermis [61]. Consistently, in in vitro rat epidermis model, the setting up of a BM between the epidermis and the collagen matrix was shown to retain approximately 75% HA in the epidermis, whereas 80% of HA was lost in absence of BM [62,63]. In reconstructed human epidermis (RHE) models on polycarbonate filters, cells in the basal layer secrete basement membrane components (lamina densa and lamina lucida) and form hemidesmosomes. Structures organized by RHE on the filter can only be considered as BM-like structures since they lack collagen VII and fibronectin, for instance, in contrast to normal BM [64]. Nevertheless, the proportion of HA retained in RHEs is approximately 95%, since a very small amount of epidermal HA appears released into the underlying medium [29]. In addition to the importance of BM in the retention of epidermal HA, the TSG-6 protein in the extracellular matrix is involved in some cross-linking with HA chains and seems able to prevent HA from “sinking” into the underlying compartment [65] (Figure 2). In summary, a large amount of HA synthesized by keratinocytes does remain in the epidermal matrix and is locally degraded, but about 10% of epidermal HA diffuses into the dermis through the BM and reaches local lymph and blood vessels, in which HA then circulates towards lymph nodes, or the liver, where it is degraded.

3.4. Functions of HA in the Epidermis

3.4.1. Regulation of Keratinocyte Proliferation

In keratinocytes, interaction of HA with its CD44 receptor activates signaling pathways that induce proliferation [66].

Three decades ago, the detection of HA on the surface of newly divided keratinocytes firstly indicated a potential link between elevated HA production and cell division [67]. Indeed, another study incubated in vitro rat epidermis with EGF (Epidermal Growth Factor) to induce keratinocyte proliferation and reported simultaneous increased HA production [60]. Consistent with those studies, topical application of HA bound to phosphatidylethanolamine on aged mouse skin (allowing HA diffusion through the hydrophobic cornified barrier) was found able to induce keratinocyte proliferation and associated epidermal thickening [68]. Moreover, injection of HA into a human cutaneous wound model was shown to accelerate re-epithelialization without altering inflammation [69]. When keratinocytes are treated with 4-methylumbelliferone (4-MU), an inhibitor of HA synthesis, an expected decrease in HA production was found in this cell type, accompanied by inhibited proliferation and decreased cell migration related to perturbed cytoskeleton [70]. However, our group more recently observed that 4-MU was likely not suitable to investigate keratinocyte proliferation since the inhibitor affects this process in a HA-independent manner [71]. Despite this limitation, studies have demonstrated some involvement of HA in cell proliferation without the use of 4-MU. Notably, addition of exogenous HA to an organotypic tissue culture provoked an induction of keratinocyte proliferation and related epidermal thickening. In addition, expression of some molecules involved in the epidermal-dermal junction was also reported as increased by the addition of HA [72]. More recently, a treatment with 1-ethyl- β -N-acetylglucosamine (β -NAG2), a substrate converted into UDP-N-acetylglucosamine by cellular metabolism, was found to stimulate HA production in a cultured epidermis, together with increased proliferation of basal cells [73].

However, despite many studies that indicated links between HA production and keratinocyte proliferation, our effort to identify a causal link between these two events remained unsuccessful. Indeed, our group reported that neither a treatment of reconstructed epidermis with an exogenous hyaluronidase activity from a *Streptomyces* bacte-

rium (StrepH), nor an inhibited HA synthesis caused by knocking down *UGDH* gene expression (UDP-glucose 6-dehydrogenase) in keratinocytes produced any significant consequences on keratinocyte proliferation [71]. In summary, the eventual ability of HA to directly modulate keratinocyte proliferation is a question that remains controversial.

3.4.2. Regulation of Keratinocyte Differentiation

When studying the role of HA in epidermal differentiation, studies have reported HA as being a repressor of the process. In 2003, for instance, a study carried out on rat keratinocytes illustrated that treatment of those cells with KGF (Keratinocyte Growth Factor) was inducing an accumulation of HA by increased HAS2 and HAS3 expression. Simultaneously, the expression levels for differentiation markers, such as the keratin 10 or filaggrin, were conversely reduced [74]. When reconstructed rat epidermis were treated with the exogenous StrepH hyaluronidase, the expression of keratin 10 and filaggrin were found increased as a consequence of HA degradation [63]. Still, another study using StrepH on mouse epidermis to degrade HA led to similar conclusions as the treatment with StrepH was reducing the epidermal thickness by half its normal value. In such conditions, the expression of keratin 10 and filaggrin appear higher than in tissues cultured with intact HA [75]. Those results can be explained if keratinocytes treated with exogenous hyaluronidase are committed earlier towards terminal differentiation, impeding to reach the normal tissue thickness during epidermal reconstruction.

Conversely, other studies have puzzlingly demonstrated an activating effect of HA on epidermal differentiation. However, since different sizes of HA polymers may induce different, or even opposite effects on signaling pathways, HA of different sizes may differentially regulate differentiation of epidermal keratinocytes. An increase in HA amounts production was found to trigger expression of markers, such as claudin and occludin, involved in the formation of tight junctions in differentiated granular keratinocytes [76]. Experiments studying human epidermis treated with 1-ethyl- β -N-acetylglucosamine (β -NAG2) indicated, with increased HA production, some concomitant increase in filaggrin and transglutaminase 1 expression. However, this accelerated differentiation can be slowed down to basal levels by blocking the β -NAG2 substrate converting enzyme [73].

Interestingly, the stimulation of differentiation by HA seems also mediated by its interaction with the CD44 receptor. Bourguignon et al. (2004) demonstrated that HA-CD44 interaction was involved in cytoskeletal functions that are essential for keratinocyte adherence and differentiation [77]. Moreover, the addition of exogenous HA was shown to increase the expression of keratin 10, involucrin, and profilaggrin under the dependence of CD44 receptor [78], and the absence of CD44 in the epidermis consistently resulted in decreased keratin 10 and filaggrin expression [79]. Again, another study performed regarding the addition of small HA (tetra-saccharide) molecules to keratinocyte cultures has reported an increased expression of keratin 10 when phosphorylation of CD44 and increased cytosolic calcium concentration happen [80].

Finally, studies conducted by Malaisse et al. (2016) in our laboratory concluded that HA production by keratinocytes and their differentiation process are independent events. Indeed, human reconstructed epidermis incubated with 4-MU or StrepH reveal no impact on the expression of either keratin 10, filaggrin, or involucrin. In addition, even further, keratinocytes deficient for the *UGDH* enzyme reveal no alteration in their differentiation process [71]. In summary, the relation between HA and keratinocyte differentiation is once again not yet elucidated.

To conclude, possible roles of HA during keratinocyte proliferation or differentiation and their overall importance for epidermal physiology are still a matter of debate. However, although the role of HA in keratinocyte proliferation remains unresolved, its CD44 receptor is a marker of cell stemness [81]. CD44 is a marker for cancer stem cells in several epithelia, but also of keratinocytes enriched for epidermal stem cells with long-term repopulating ability. On the other hand, the maintenance of stem cells and their property

for self-renewal are favored when the environment is enriched in HA [82], suggesting involvement of HA and CD44 in the maintenance of an epidermal stem cell character.

3.4.3. Involvement in the Epidermal Barrier Settings and Integrity

The final step in keratinocyte differentiation is keratinization, which means production of the impermeable cornified layer, the most superficial layer of the epidermis. During this late stage of epidermal differentiation, cells become embedded in a lipid ceramide-rich matrix which seals intercellular spaces between the fully differentiated cornified keratinocytes. This process maintains a waterproof barrier on the skin surface [83]. During this process, as early as in the granular layer, lamellar bodies elaborated by the Golgi apparatus are triggered to fuse with the apical plasma membrane of keratinocytes and discharge their content (e.g., sphingomyelin, glycosphingolipids, phospholipids, cholesterol), as well as several acid hydrolases (serine protease, phospholipase A2, sphingomyelinase, β -glucocerebrosidase) in the extracellular matrix, ready to cleave substrates at low pH [84,85]. Between the shedding of lamellar bodies in the *stratum granulosum* and the establishment of a dense matrix in the *stratum corneum*, lipids undergo maturation, thanks to enzymes released jointly by the lamellar bodies. These enzymes are indeed involved in the cleavage of glycosphingolipids into ceramides, and phospholipids into fatty acids. Ceramides account for 50% of *stratum corneum* lipids and are covalently bound to envelope proteins, mainly to involucrin [86]. Cholesterol is another major matrix constituent and accounts for 25% of matrix lipids [86,87]. HA and its CD44 receptor are involved in the establishment of this lipid barrier.

HA and CD44 are involved in formation of lamellar bodies and in the polarization of their secretion. In Cd44 knock-out mice, content and polarized secretion of lamellar bodies are clearly disturbed [78]. While, in normal conditions, lipids are exclusively secreted at the apical pole of granular layer cells, at the interface with the cornified cells, the absence of Cd44 results in dual apical and basolateral secretion of lamellar bodies, indicating unpolarized secretion. In addition, HA-mediated cholesterol synthesis is blocked in those conditions. Indeed, whereas HA increases cholesterol concentration in the epidermis, Cd44^{-/-} keratinocytes treated with HA do not produce cholesterol. As a major consequence, defects in lipid production and polarized secretion impair the formation of the epidermal barrier [78]. In agreement with those observations, the addition of small HA molecules (tetra-saccharide) increases the expression level of enzymes responsible for ceramide synthesis, as well as the intracellular ceramide-content in human keratinocytes in vitro. This HA-mediated enhancement of lipid content improves the water retention in *stratum corneum* of mice following cutaneous UVA irradiation, as assessed by decreased transepithelial water loss [88]. The absence of CD44 also impacts the organization and, thus, the function of epidermal tight junctions. During development, Cd44^{-/-} mice exhibit on day 18.5 of embryogenesis a transient 1-day delay in skin barrier establishment. Such a delay corresponds with alteration in availability and organization of tight junction proteins [89]. In summary, the HA-CD44 interaction is involved in the maintenance of the epidermal barrier integrity and both molecules influence each other. HA influences CD44 expression [90]. Conversely, in the absence of CD44, a smaller amount of HA is detected in the epidermis, which then appears thinner [78].

3.5. Epidermal Hyaladherins

In the ECM, HA is able to interact through non-covalent binding with a large number of molecules called hyaladherins or HA-binding proteins. These HA partners are extracellularly localized or attached to the cell membrane [21]. Among cellular partners, the best known are the CD44 receptor and the RHAMM receptor.

CD44 (Cluster of Differentiation 44) is a 19 exons-encoded transmembrane glycoprotein which exhibits numerous isoforms produced as a consequence of alternative splicing and post-translational modifications [6] that modulate CD44 affinity for HA [91,92]. In the epidermis, 18 different transcripts encoding CD44 isoforms have been identified [58]. All

variants of CD44 share an extracellular domain able to bind HA, named LINK domain. Other molecules, such as GAGs (heparan sulfate, dermatan sulfate, chondroitin sulfate), are also bound by CD44 receptors, depending on the type of isoforms. GAG-CD44 interaction has been found able to enhance the presentation of growth factors to their specific receptors [58]. HA-CD44 interaction allows the formation of a pericellular matrix [93] involved in the regulation of keratinocyte differentiation [6] and in the development of skin barrier [89]. Actually, HA-CD44 binding induces several various signaling pathways, depending on the size of HA polymers. Indeed, high molecular weight HA molecules bind to the CD44 receptor by mostly irreversible hydrogen bonds and activate RhoA-like RhoGTPase signaling pathways that lead to cell proliferation and migration. In contrast, low molecular weight HA form weaker, more reversible hydrogen bonds, and activate Rac1-like pathways that favor cell adhesion and differentiation [6,34]. The variable effects produced by different HA molecules that exhibit different molecular weight were recently presented in detail and reviewed by Tavianatou et al., 2019 [34].

RHAMM (Receptor for HA-mediated mobility) is another HA receptor characterized by several isoforms that localize at the cell surface, in the cytoplasm, in the nucleus, and even in the ECM. Poorly expressed in physiological conditions, RHAMM receptor is overexpressed in cancer cells and in inflammatory conditions, such as during skin scarring. This receptor is able to regulate keratinocyte migration. Indeed, in *Rhamm*^{-/-} mice, the migration of keratinocytes during wound healing was considerably disturbed [94].

3.5.1. The Case of Epidermal TSG-6 Protein

In the category of extracellular hyaladherins, there exist some proteoglycans, especially versican in the epidermis, but we will emphasize here an anti-inflammatory protein named TSG-6 (TNF α stimulated gene 6). This TSG-6 protein harbors a LINK domain very similar to the LINK domain characterized in the CD44 receptor and responsible for HA-binding [95]. However, interactions between HA and the TSG-6 protein appear stronger than those observed between HA and the CD44 receptor [96]. Interestingly though, binding HA to the TSG-6 protein increases the affinity of HA for its CD44 receptor [97,98]. A possible explanation can be found in the observation that HA binding induces dimerization of TSG-6 protein, causing cross-linking of HA chains, matrix condensation, and increased physical proximity of HA polymers to CD44 receptors [99]. Cross-linking of HA chains and their consequences on the organization of the ECM further occur through inter- α -trypsin inhibitor (ITI), a protein with an even higher affinity for HA than TSG-6. ITI is a plasma glycoprotein belonging to a family of protease inhibitors composed of two heavy chains (HC) linked by ester bonds to chondroitin sulfate and to a bikunin. When ITI localizes at the same site as HA and TSG-6 protein, it can catalyze the formation of a covalent HC-HA bond. This reaction takes place in two steps. Firstly, one ITI heavy chain is transferred to TSG-6 protein by a first transesterification reaction. Secondly, the heavy chain is transferred to an acetylglucosamine residue of HA [100]. Such HC-HA complexes form a more widespread and hydrated HA network than the network resulting from HA-TSG-6 complexes [97]. Six heavy chains have been identified, and HC1 and HC2 have been detected in the normal epidermis [101]. The predominantly expressed heavy chain in human skin (at the dermal level) is HC5, whose expression is increased in inflammatory skin conditions, such as allergic contact dermatitis [102]. HC5 has been shown to bind and stabilize HA, and to participate in matrix formation [103]. The TSG-6 protein, although possessing anti-inflammatory properties, is expressed and secreted in the epidermis under physiological conditions [101]. We recently found that the epidermal TSG-6 protein is involved in the retention of HA between keratinocytes, in the thin intercellular spaces between epidermal cells [65]. The HA maintained between keratinocytes by TSG-6 protein creates space and reduces cohesion between keratinocytes, allowing the diffusion of cytokines and growth factors [104]. Furthermore, the TSG-6 protein is widely expressed and secreted in skin under inflammatory conditions related to a proper epidermal wound healing [105,106]. It is also secreted by keratinocytes in response to epidermal infection by

dermatophytes [107], or when epidermal cells are challenged by Th2-immune conditions [65,108]. Simultaneously, HA is massively produced in inflammatory conditions resulting in increased intercellular spaces in which cells can migrate [104]. Of course, the TSG-6 protein is expressed and secreted by many other cell types than epidermal keratinocytes. It may, therefore, play other roles than those discussed in the epidermis, as it is detailed by Day and Milner, in their recent 2019 review on this protein and its function [22].

4. Epidermal HA in Atopic Dermatitis

4.1. Atopic Dermatitis

As one well-characterized pathological condition observed in skin, atopic dermatitis can exemplify how much HA can be involved when some abnormal tissue conditions occur. Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by xerosis, spongiosis, and hypogranulosis, as well as altered skin barrier [109]. The etiology is controversial since many factors are involved: environmental factors, genetic predisposition, defective barrier, and immune dysregulation [110]. There are two main hypotheses proposed regarding the development of AD. According to the “outside-inside” hypothesis, patients have a defective epidermal barrier that potentially allows allergens and/or pathogens entry in the skin, leading to inflammatory and immune responses. Conversely, the “inside-outside” hypothesis suggests that a preexisting immune dysregulation initially impacts the barrier. Indeed, any triggered release of Th2 cytokines (such as interleukins 4, 13, 25) exhibits proven ability to weaken the epidermal barrier. In respect to both hypotheses, the situation created during atopic dermatitis actually leads to some vicious circle which reinforces the diseased state [19]. Available review papers, e.g., De Vuyst et al., 2017 [111], and Huet et al., 2018 [112], propose models to study atopic dermatitis based on *in vitro* reconstructed human epidermis. The inside-outside condition can be mimicked by creating inflammatory conditions in the models, for instance, when RHE are incubated with mixtures of cytokines typically elevated in AD (IL-4, -13, -31, -22, -25, and/or TNF α). The presence of Th2 cytokines results in decreased expression of late differentiation markers, such as keratin 10, filaggrin, involucrin, and loricrin, along with a reduction in ceramides and free fatty acids content. Together, such alterations in the epidermal differentiation program that is responsible to create and maintain the epidermal barrier contribute to the impairment of its function. According to the outside-inside hypothesis, genetic factors in this case may be involved in barrier defects. In favor of this hypothesis, RHE produced by filaggrin-deficient keratinocytes display increased permeability and increased sensitivity to Th2 cytokines treatment. In addition, many other environmental factors, such as abuse of detergent products on the skin, affect the lipid-based epidermal barrier *in vivo* [110].

4.2. Implication of HA in Atopic Dermatitis

Remaining low in normal conditions, the mRNA expression of *HAS3* has been reported as upregulated in AD skin conditions, simultaneously with well-recognized AD markers, i.e., *CA2* and *NELL2* [29,113]. Indeed, differences in *HAS* expression profiles have been reported between healthy epidermis, mainly expressing *HAS1* mRNA, and the epidermis of AD patients where elevated *HAS3* expression is found (*HAS2* remains scarcely expressed in adult epidermis) [29] (Figure 3). Similarly, when inflammatory conditions related to UVB exposure are imposed to keratinocytes, *HAS3* mRNA expression is upregulated [36,114], and *HAS3* mRNA is also overexpressed upon stimulation by interferon γ , whilst diminished following TGF β challenge [115]. Consistently, *HAS3* enzyme exhibits high activity and produces low molecular weight HA fragments [27]. Such low molecular weight fragments participate to tissue inflammation because they behave in the epidermis as DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) and bind Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR 4 (for more details, see the review by Tavianatou et al., 2019 [34]). TLRs, through activation of NF κ B, are the initiators of release of pro-inflammatory cytokines, as well as

inducers of *HAS3* overexpression, thereby amplifying local synthesis of low molecular weight HA and reinforcing the inflammatory response as a consequence [116]. In addition, the heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) released from keratinocytes in atopic dermatitis also increases *HAS3* expression [29,117].

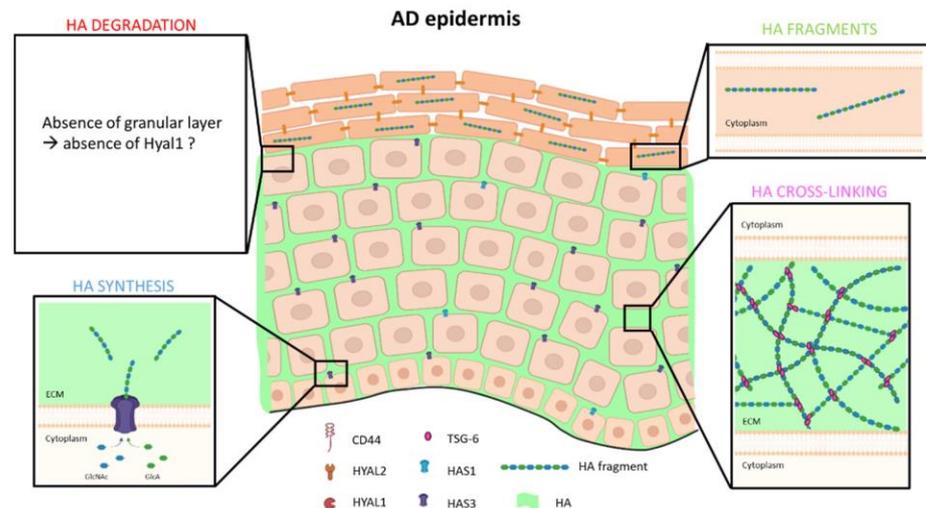


Figure 3. Model of HA metabolism in atopic dermatitis epidermis. Low molecular weight HA fragments are synthesized and extruded by HAS3 enzyme in ECM of basal and spinous layers, while HAS1 mRNA is less expressed. In inflammatory conditions, TSG-6 protein is more expressed in parallel with an increase HA production, allowing a strong cross-linking. As atopic dermatitis is characterized by hypogranulosis, expression and activity of HYAL1 are probably disturbed, and HA fragments are found in corneocytes.

Overexpression of *HAS3* in a model mimicking atopic dermatitis causes massive accumulation of HA in the intercellular spaces between keratinocytes of the living epidermal layers [19]. Increase in the amount of intercellular HA is consistent with enhanced detection of HA in ECM of severe eczema skin in parallel with *HAS3* overexpression [118]. Accumulation of HA in intercellular spaces can also be related to spongiosis, typical of AD skin. In severe eczema, some reduced expression of epidermal cadherins results in water entry in the tissue and spongiosis [118]. The presence of HA in larger amounts than in normal skin might be responsible for water retention between keratinocytes and for spongiosis. Alternatively, the enlargement of intercellular spaces due to reduced cadherin-driven junctions might favor accumulation of HA in the available space. Of interest, as HA is particularly retained in intercellular spaces by TSG-6 protein [65] (Figure 3), and TSG-6 protein is increasingly produced *in vivo* in AD skin, such as *in vitro* in reconstructed epidermis challenged with Th2 cytokines, this anti-inflammatory protein might favor the accumulation of HA in pathologies, such as AD [65].

In inflammatory epidermis, overproduction of HA is accompanied by overexpression of the CD44 receptor. Abundance of this receptor is thought to play a role in recapture of HA released in excess, in order to finally reduce and resolve inflammation [35]. In parallel with HA endocytosis, hyaluronidases 1 and 2 enzymes degrade HA, according to the model proposed by Tammi et al., 2001 [57].

AD is an inflammatory condition characterized by an absent granular layer, where HYAL1 enzyme is located and active in physiological conditions [51]. According to this model, HYAL1 may be less active in AD lesional epidermis (Figure 3). In line with this hypothesis, *Hyal1*^{-/-} mouse epidermis is characterized by high-molecular-weight HA contained in cornified keratinocytes [51], whereas solely fragments below 6×10^4 Daltons are

detected in cornified cells of wild-type epidermis [20]. Consistently, the typical parakeratotic superficial layer during contact dermatitis contains HA of molecular weight superior than 6×10^4 Daltons [119]. While low molecular weight fragments would contribute to hydration, such as NMF [20], high molecular weight HA in excess in the cornified layer would have a negative impact on properties of this layer and, therefore, on its barrier function. Indeed, high molecular weight HA are able to efficiently retain larger overall content of water in comparison with small fragments of HA, counteracting the formation of the normally hydrophobic cornified layer and leading to some potentially increased epidermal permeability.

In epidermal ECM, HA can interact with other matrix components. Notably, versican, a proteoglycan secreted in the ECM of the basal layer of epidermis, is able to interact with HA [12,120]. This proteoglycan is involved in the formation of a provisional matrix required by leukocytes during inflammatory response, such as the one observed in AD [23]. Decorin, another proteoglycan, is secreted between cells of the suprabasal layers of the epidermis [121]. Decorin mRNA expression was significantly decreased when the HA extracellular matrix is disorganized, due to the lack of the TSG-6 protein [65]. In contact dermatitis, decorin-deficient mice exhibit a weaker inflammatory response than wildtype mice as a consequence of impaired leukocyte recruitment [122]. Those studies highlight the importance of the organization of the epidermal matrix composed of GAGs (HA) and proteoglycans (versican and decorin) in the regulated recruitment of immune cells in an inflammatory context. Moreover, when HA chains are properly cross-linked and organized by the TSG-6 protein, certain pro-inflammatory growth factors and cytokines (such as IL-8) can be sequestered [123,124], thereby limiting the presentation of the ligands to their respective receptors and, thus, regulating the attraction of neutrophils toward the inflamed site [106].

Atopic dermatitis is characterized by hyperplasia. Epidermal thickening is apparently a consequence of overexpressed EGF receptor (EGFR) [125] and HB-EGF [29,126]. HB-EGF is rapidly cleaved and available as a soluble ligand in the ECM during the inflammatory setting [127]. HB-EGF can then bind EGFR and activate downstream pathways that can induce epidermal proliferation and elevated *HAS3* mRNA expression [29,117,128]. In parallel, stimulation of EGFR induces the expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-8, that recruit leukocytes [125]. Interestingly, EGFR is localized in plasma membranes cholesterol-rich lipid rafts, close to CD44 [60]. It has been shown, in cancer cell lines, that EGFR and CD44 receptors interact to auto-regulate HA synthesis [117].

In summary, HA and other ECM components (proteoglycans, cytokines, growth factors) appear to support HA production in order to generate an organized matrix for the efficient and controlled recruitment of inflammatory cells in cutaneous pathologies.

5. Conclusion

HA is a glycosaminoglycan found in intercellular spaces. Although secreted in many vertebrate tissues, 50% of HA is localized in the skin. Predominantly detected in the dermis, HA is, nonetheless, also located between keratinocytes in living layers of the epidermis, where it appears involved in development and maintenance of a competent epidermal barrier. In addition, HA plays controversial roles in proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes. The enzyme HAS1 seems mainly responsible for the production of HA in the epidermis in normal conditions, but a switch in expression of the different HAS enzymes in the pathological epidermis, characterized by overexpressed HAS3, alters the molecular characteristics of epidermal HA in skin diseases. For its degradation, HA is processed via a CD44-HYAL2-HYAL1 axis, suggesting that HA is potentially internalized and degraded into very low molecular weight fragments when it reaches the granular cell layer of the epidermis. This review discusses the recently noticed involvement of HA and its metabolism in barrier alteration-related diseases, such as atopic dermatitis.

Further studies are still awaited to fully understand the role played by HA in the epidermis, either under physiological conditions, but also in the context of skin diseases.

Author Contributions: C.E., C.L.d.R. and Y.P. wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Acknowledgments: The authors acknowledge Emilie Faway (University of Namur) and Marc Thiry (University of Liège) for providing TEM pictures of RHE.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Meyer, K.; Palmer, J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107*, 629–634.
- Laurent, T.C.; Fraser, E. Hyaluronan. *FASEB J.* **1992**, *6*.
- Fraser, J.R.; Laurent, T.C.; Laurent, U.B. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **1997**, *242*, 27–33, doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- Nusgens, B. Hyaluronic acid and extracellular matrix: A primitive molecule? *Ann. De Dermatol. Et De Vénérologie* **2010**, *137 Suppl*, S3–S8.
- Tammi, R.; Ripellino, J.A.; Margolis, R.U.; Tammi, M. Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Derm.* **1988**, *90*, 412–414, doi:10.1111/1523-1747.ep12456530.
- Bourguignon, L.Y. Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions. *Am J Pathol* **2014**, *184*, 1912–1919, doi:10.1016/j.ajpath.2014.03.010.
- Kavasi, R.M.; Berdiaki, A.; Spyridaki, I.; Corsini, E.; Tsatsakis, A.; Tzanakakis, G.; Nikitovic, D. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem Toxicol* **2017**, *101*, 128–138, doi:10.1016/j.fct.2017.01.012.
- Muto, J.; Sayama, K.; Gallo, R.L.; Kimata, K. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. *J Derm. Sci* **2019**, *94*, 190–195, doi:10.1016/j.jdermsci.2019.01.009.
- Montagna, W.; Chase, H.; Melaragno, H. Histology and cytochemistry of human skin. I. Metachromasia in the mons pubis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1951**, *1(12)*, 591–597.
- Tammi, R.H.; Hyyryläinen, A.M.H.; Maibach, H.I.; Tammi, M.I. Ultrastructural localization of keratinocyte surface associated heparan sulphate proteoglycans in human epidermis. *Histochemistry* **1987**, *87*, 243–250.
- Malgouries, S.; Thibaut, S.; Bernard, B.A. Proteoglycan expression patterns in human hair follicle. *Br J Derm.* **2008**, *158*, 234–242, doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08339.x.
- Sandjeu, Y.; Haftek, M. Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *J Physiol Pharm.* **2009**, *60 Suppl 4*, 23–30.
- Le Bitoux, M.-A.; Callejon, S.; Rodriguez Aller, M.; Denis, A.; Pernet, I.; Haftek, M. Syndecans and CD44 in Normal Human Keratinocyte Cultures: Modulation with Medium Composition and All-trans Retinoic Acid. *Open Dermatol. J.* **2009**, *3*, 32–41.
- Brown, K.W.; Parkinson, E.K. Glycoproteins and glycosaminoglycans of cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.* **1983**, *61*, 325–338.
- Mier, P.D.; Wood, M. The acid mucopolysaccharides of mammalian skin. *Br J Derm.* **1969**, *81*, 528–533.
- Toole, B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **2001**, *12*, 79–87, doi:10.1006/scdb.2000.0244.
- Giangreco, A.; Goldie, S.J.; Failla, V.; Saintigny, G.; Watt, F.M. Human skin aging is associated with reduced expression of the stem cell markers beta1 integrin and MCSP. *J Invest Derm.* **2010**, *130*, 604–608, doi:10.1038/jid.2009.297.
- Theocharis, A.D.; Skandalis, S.S.; Gialeli, C.; Karamanos, N.K. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *97*, 4–27, doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- De Vuyst, E.; Giltaire, S.; Lambert de Rouvroit, C.; Malaisse, J.; Mound, A.; Bourtembourg, M.; Poumay, Y.; Nikkels, A.F.; Chretien, A.; Salmon, M. Methyl-beta-cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Derm.* **2018**, *27*, 435–437, doi:10.1111/exd.13113.
- Sakai, S.; Yasuda, R.; Sayo, T.; Ishikawa, O.; Inoue, S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Derm.* **2000**, *114*, 1184–1187, doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00992.x.
- Toole, B.P. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 528–539, doi:10.1038/nrc1391.
- Day, A.J.; Milner, C.M. TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol* **2019**, *78–79*, 60–83, doi:10.1016/j.matbio.2018.01.011.
- Iozzo, R.V.; Schaefer, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* **2015**, *42*, 11–55, doi:10.1016/j.matbio.2015.02.003.
- Weigel, P.H.; Hascall, V.C.; Tammi, M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 13997–14000, doi:10.1074/jbc.272.22.13997.

25. Weigel, P.H.; DeAngelis, P.L. Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 36777–36781, doi:10.1074/jbc.R700036200.
26. Spicer, A.P.; McDonald, J.A. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 1923–1932, doi:10.1074/jbc.273.4.1923.
27. Itano, N.; Sawai, T.; Yoshida, M.; Lenas, P.; Yamada, Y.; Imagawa, M.; Shinomura, T.; Hamaguchi, M.; Yoshida, Y.; Ohnuki, Y.; et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 25085–25092, doi:10.1074/jbc.274.35.25085.
28. Rilla, K.; Oikari, S.; Jokela, T.A.; Hyttinen, J.M.; Karna, R.; Tammi, R.H.; Tammi, M.I. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 5973–5983, doi:10.1074/jbc.M112.443879.
29. Malaise, J.; Bourguignon, V.; De Vuyst, E.; Lambert de Rouvroit, C.; Nikkels, A.F.; Flamion, B.; Poumay, Y. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Derm.* **2014**, *134*, 2174–2182, doi:10.1038/jid.2014.147.
30. Camenisch, T.D.; Spicer, A.P.; Brehm-Gibson, T.; Biesterfeldt, J.; Augustine, M.L.; Calabro, A.; Kubalak, S.; Klewer, S.E.; McDonald, J.A. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J. Clin. Investig.* **2000**, *106*, 349–360, doi:10.1172/jci10272.
31. Zanna, G.; Docampo, M.J.; Fondevila, D.; Bardagi, M.; Bassols, A.; Ferrer, L. Hereditary cutaneous mucinosis in shar pei dogs is associated with increased hyaluronan synthase-2 mRNA transcription by cultured dermal fibroblasts. *Vet Derm.* **2009**, *20*, 377–382, doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00799.x.
32. Tian, X.; Azpurua, J.; Hine, C.; Vaidya, A.; Myakishev-Rempel, M.; Ablaeva, J.; Mao, Z.; Nevo, E.; Gorbunova, V.; Seluanov, A. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* **2013**, *499*, 346–349, doi:10.1038/nature12234.
33. Terazawa, S.; Nakajima, H.; Tobita, K.; Imokawa, G. The decreased secretion of hyaluronan by older human fibroblasts under physiological conditions is mainly associated with the down-regulated expression of hyaluronan synthases but not with the expression levels of hyaluronidases. *Cytotechnology* **2015**, *67*, 609–620, doi:10.1007/s10616-014-9707-2.
34. Tavianatou, A.G.; Caon, I.; Franchi, M.; Piperigkou, Z.; Galesso, D.; Karamanos, N.K. Hyaluronan: Molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J* **2019**, *286*, 2883–2908, doi:10.1111/febs.14777.
35. Barnes, L.; Carraux, P.; Saurat, J.H.; Kaya, G. Increased expression of CD44 and hyaluronate synthase 3 is associated with accumulation of hyaluronate in spongiotic epidermis. *J Invest Derm.* **2012**, *132*, 736–738, doi:10.1038/jid.2011.384.
36. Kakizaki, I.; Itano, N.; Kimata, K.; Hanada, K.; Kon, A.; Yamaguchi, M.; Takahashi, T.; Takagaki, K. Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch Biochem Biophys* **2008**, *471*, 85–93, doi:10.1016/j.abb.2007.12.004.
37. Stern, R.; Asari, A.A.; Sugahara, K.N. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol* **2006**, *85*, 699–715, doi:10.1016/j.ejcb.2006.05.009.
38. Pienimäki, J.P.; Rilla, K.; Fulop, C.; Sironen, R.K.; Karvinen, S.; Pasonen, S.; Lammi, M.J.; Tammi, R.; Hascall, V.C.; Tammi, M.I. Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 20428–20435, doi:10.1074/jbc.M007601200.
39. Jokela, T.; Karna, R.; Rauhala, L.; Bart, G.; Pasonen-Seppänen, S.; Oikari, S.; Tammi, M.I.; Tammi, R.H. Human Keratinocytes Respond to Extracellular UTP by Induction of Hyaluronan Synthase 2 Expression and Increased Hyaluronan Synthesis. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 4861–4872, doi:10.1074/jbc.M116.760322.
40. Tammi, R.H.; Passi, A.G.; Rilla, K.; Karousou, E.; Vigetti, D.; Makkonen, K.; Tammi, M.I. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J* **2011**, *278*, 1419–1428, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x.
41. Bourguignon, L.Y.; Gilad, E.; Peyrollier, K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 19426–19441, doi:10.1074/jbc.M610054200.
42. Kasai, K.; Kuroda, Y.; Takabuchi, Y.; Nitta, A.; Kobayashi, T.; Nozaka, H.; Miura, T.; Nakamura, T. Phosphorylation of Thr(328) in hyaluronan synthase 2 is essential for hyaluronan synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**, *533*, 732–738, doi:10.1016/j.bbrc.2020.08.093.
43. Moretto, P.; Karousou, E.; Viola, M.; Caon, I.; D’Angelo, M.L.; De Luca, G.; Passi, A.; Vigetti, D. Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes. *J Diabetes Res* **2015**, *2015*, 167283, doi:10.1155/2015/167283.
44. Karousou, E.; Kamiryo, M.; Skandalis, S.S.; Ruusala, A.; Asteriou, T.; Passi, A.; Yamashita, H.; Hellman, U.; Heldin, C.H.; Heldin, P. The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 23647–23654, doi:10.1074/jbc.M110.127050.
45. Stern, R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: Are we there yet? *Glycobiology* **2003**, *13*, 105R–115R, doi:10.1093/glycob/cwg112.
46. Linker, A.; Meyer, K.; Weissmann, B. Enzymatic Formation of Monosaccharides from Hyaluronate. *J. Biol. Chem.* **1955**, *213*, 237–248, doi:10.1016/s0021-9258(18)71060-0.
47. Csoka, A.; Frost, G.; Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* **2001**, *20*, 499–508.
48. Kaul, A.; Short, W.D.; Wang, X.; Keswani, S.G. Hyaluronidases in Human Diseases. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 3204. doi:10.3390/ijms22063204.

49. Dokoshi, T.; Zhang, L.J.; Li, F.; Nakatsuji, T.; Butcher, A.; Yoshida, H.; Shimoda, M.; Okada, Y.; Gallo, R.L. Hyaluronan Degradation by Cemip Regulates Host Defense against Staphylococcus aureus Skin Infection. *Cell Rep* **2020**, *30*, 61–68 e64, doi:10.1016/j.celrep.2019.12.001.
50. Yoshida, H.; Okada, Y. Role of HYBID (Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization), Alias KIAA1199/CEMIP, in Hyaluronan Degradation in Normal and Photoaged Skin. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 5804. doi:10.3390/ijms20225804.
51. Malaisse, J.; Evrard, C.; Feret, D.; Colombaro, V.; Dogne, S.; Haftek, M.; de Rouvroit, C.L.; Flamion, B.; Poumay, Y. Hyaluronidase-1 Is Mainly Functional in the Upper Granular Layer, Close to the Epidermal Barrier. *J Invest Derm.* **2015**, *135*, 3189–3192, doi:10.1038/jid.2015.299.
52. Kurdykowski, S.; Mine, S.; Bardey, V.; Danoux, L.; Jeanmaire, C.; Pauly, G.; Brabencova, E.; Wegrowski, Y.; Maquart, F.X. Ultraviolet-B irradiation induces differential regulations of hyaluronidase expression and activity in normal human keratinocytes. *Photochem Photobiol* **2011**, *87*, 1105–1112, doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00959.x.
53. Boonen, M.; Puissant, E.; Gilis, F.; Flamion, B.; Jadot, M. Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *446*, 1155–1160, doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.070.
54. Puissant, E.; Gilis, F.; Dogne, S.; Flamion, B.; Jadot, M.; Boonen, M. Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages. *Traffic* **2014**, *15*, 500–515, doi:10.1111/tra.12162.
55. Harada, H.; Takahashi, M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 5597–5607, doi:10.1074/jbc.M608358200.
56. Girish, K.S.; Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci* **2007**, *80*, 1921–1943, doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037.
57. Tammi, R.; Rilla, K.; Pienimäki, J.P.; MacCallum, D.K.; Hogg, M.; Luukkonen, M.; Hascall, V.C.; Tammi, M. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 35111–35122, doi:10.1074/jbc.M103481200.
58. Teye, K.; Numata, S.; Ishii, N.; Krol, R.P.; Tsuchisaka, A.; Hamada, T.; Koga, H.; Karashima, T.; Ohata, C.; Tsuruta, D.; et al. Isolation of All CD44 Transcripts in Human Epidermis and Regulation of Their Expression by Various Agents. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160952, doi:10.1371/journal.pone.0160952.
59. Fluhr, J.W.; Elias, P.M.; Man, M.Q.; Hupe, M.; Selden, C.; Sundberg, J.P.; Tschachler, E.; Eckhart, L.; Mauro, T.M.; Feingold, K.R. Is the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification? *J Invest Derm.* **2010**, *130*, 2141–2144, doi:10.1038/jid.2010.74.
60. Pasonen-Seppänen, S.; Karvinen, S.; Torronen, K.; Hyttinen, J.M.; Jokela, T.; Lammi, M.J.; Tammi, M.I.; Tammi, R. EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: Correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Derm.* **2003**, *120*, 1038–1044, doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12249.x.
61. Iriyama, S.; Nishikawa, S.; Hosoi, J.; Amano, S. Basement Membrane Helps Maintain Epidermal Hyaluronan Content. *Am J Pathol* **2021**, *191*, 1010–1019. doi:10.1016/j.ajpath.2021.03.007.
62. Tammi, R.H.; Tammi, M.I.; Hascall, V.C.; Hogg, M.; Pasonen, S.; MacCallum, D.K. A preformed basal lamina alters the metabolism and distribution of hyaluronan in epidermal keratinocyte “organotypic” cultures grown on collagen matrices. *Histochem Cell Biol* **2000**, *113*, 265–277, doi:10.1007/s004180000128.
63. Passi, A.; Sadeghi, P.; Kawamura, H.; Anand, S.; Sato, N.; White, L.E.; Hascall, V.C.; Maytin, E.V. Hyaluronan suppresses epidermal differentiation in organotypic cultures of rat keratinocytes. *Exp Cell Res* **2004**, *296*, 123–134, doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.031.
64. Rosdy, M.; Pisani, A.; Ortonne, J.P. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Derm.* **1993**, *129*, 227–234, doi:10.1111/j.1365-2133.1993.tb11839.x.
65. Evrard, C.; Faway, E.; De Vuyst, E.; Svensek, O.; De Glas, V.; Bergerat, D.; Salmon, M.; De Backer, O.; Flamion, B.; Le-Buanec, H.; et al. Deletion of TNFAIP6 gene in human keratinocytes demonstrates a role for TSG-6 to retain hyaluronan inside epidermis. *JID Innov.* **2021**, doi:10.1016/j.xjidi.2021.100054.
66. Pure, E.; Assoian, R.K. Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cell Signal* **2009**, *21*, 651–655, doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.024.
67. Tammi, R.; Tammi, M. Correlations between Hyaluronan and Epidermal Proliferation as Studied by [3H]Glucosamine and [3H]Thymidine Incorporations and Staining of Hyaluronan on Mitotic Keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **1991**, *195*, 524–527.
68. Symonette, C.J.; Kaur Mann, A.; Tan, X.C.; Tolg, C.; Ma, J.; Perera, F.; Yazdani, A.; Turley, E.A. Hyaluronan-phosphatidylethanolamine polymers form pericellular coats on keratinocytes and promote basal keratinocyte proliferation. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 727459, doi:10.1155/2014/727459.
69. Nyman, E.; Henricson, J.; Ghafouri, B.; Anderson, C.D.; Kratz, G. Hyaluronic Acid Accelerates Re-epithelialization and Alters Protein Expression in a Human Wound Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **2019**, *7*, e2221, doi:10.1097/GOX.0000000000002221.
70. Rilla, K.; Pasonen-Seppänen, S.; Rieppo, J.; Tammi, M.; Tammi, R. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J Invest Derm.* **2004**, *123*, 708–714, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23409.x.
71. Malaisse, J.; Pendaries, V.; Hontoir, F.; De Glas, V.; Van Vlaender, D.; Simon, M.; Lambert de Rouvroit, C.; Poumay, Y.; Flamion, B. Hyaluronan Does Not Regulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Differentiation. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 6347–6358, doi:10.1074/jbc.M115.661348.

72. Gu, H.; Huang, L.; Wong, Y.P.; Burd, A. HA modulation of epidermal morphogenesis in an organotypic keratinocyte-fibroblast co-culture model. *Exp Derm.* **2010**, *19*, e336-339, doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01052.x.
73. Endo, Y.; Yoshida, H.; Ota, Y.; Akazawa, Y.; Sayo, T.; Hanai, U.; Imagawa, K.; Sasaki, M.; Takahashi, Y. Accelerated human epidermal turnover driven by increased hyaluronan production. *J Derm. Sci* **2021**, *101*, 123–133, doi:10.1016/j.jdermsci.2020.12.002.
74. Karvinen, S.; Pasonen-Seppanen, S.; Hyttinen, J.M.; Pienimaki, J.P.; Torronen, K.; Jokela, T.A.; Tammi, M.I.; Tammi, R. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 49495–49504, doi:10.1074/jbc.M310445200.
75. Maytin, E.V.; Chung, H.H.; Seetharaman, V.M. Hyaluronan Participates in the Epidermal Response to Disruption of the Permeability Barrier in Vivo. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1331–1341, doi:10.1016/s0002-9440(10)63391-3.
76. Farwick, M.; Gauglitz, G.; Pavicic, T.; Kohler, T.; Wegmann, M.; Schwach-Abdellaoui, K.; Malle, B.; Tarabin, V.; Schmitz, G.; Korting, H.C. Fifty-kDa hyaluronic acid upregulates some epidermal genes without changing TNF-alpha expression in reconstituted epidermis. *Ski. Pharm. Physiol* **2011**, *24*, 210–217, doi:10.1159/000324296.
77. Bourguignon, L.Y.; Singleton, P.A.; Diedrich, F. Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-gamma promotes phospholipase Cgamma1 activation, Ca(2+) signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 29654–29669, doi:10.1074/jbc.M403608200.
78. Bourguignon, L.Y.; Ramez, M.; Gilad, E.; Singleton, P.A.; Man, M.Q.; Crumrine, D.A.; Elias, P.M.; Feingold, K.R. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J Invest Derm.* **2006**, *126*, 1356–1365, doi:10.1038/sj.jid.5700260.
79. Shatirishvili, M.; Burk, A.S.; Franz, C.M.; Pace, G.; Kastilan, T.; Breuhahn, K.; Hinterseer, E.; Dierich, A.; Bakiri, L.; Wagner, E.F.; et al. Epidermal-specific deletion of CD44 reveals a function in keratinocytes in response to mechanical stress. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2461, doi:10.1038/cddis.2016.342.
80. Kage, M.; Tokudome, Y.; Matsunaga, Y.; Hariya, T.; Hashimoto, F. Effect of hyaluronan tetrasaccharides on epidermal differentiation in normal human epidermal keratinocytes. *Int J Cosmet Sci* **2014**, *36*, 109–115, doi:10.1111/ics.12105.
81. Szabo, A.Z.; Fong, S.; Yue, L.; Zhang, K.; Strachan, L.R.; Scalapino, K.; Mancianti, M.L.; Ghadially, R. The CD44+ ALDH+ population of human keratinocytes is enriched for epidermal stem cells with long-term repopulating ability. *Stem Cells* **2013**, *31*, 786–799, doi:10.1002/stem.1329.
82. Chanmee, T.; Ontong, P.; Kimata, K.; Itano, N. Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells. *Front Oncol* **2015**, *5*, 180, doi:10.3389/fonc.2015.00180.
83. Eckhart, L.; Lippens, S.; Tschachler, E.; Declercq, W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1833*, 3471–3480, doi:10.1016/j.bbamer.2013.06.010.
84. Moreci, R.S.; Lechler, T. Epidermal structure and differentiation. *Curr Biol* **2020**, *30*, R144-R149, doi:10.1016/j.cub.2020.01.004.
85. Gunathilake, R. The Human Epidermal Antimicrobial Barrier: Current Knowledge, Clinical Relevance and Therapeutic Implications. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.* **2015**, *10*, 84–97.
86. Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.M. The skin: An indispensable barrier. *Exp Derm.* **2008**, *17*, 1063–1072, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
87. Matsui, T.; Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* **2015**, *27*, 269–280, doi:10.1093/intimm/dxv013.
88. Kage, M.; Tokudome, Y. Hyaluronan tetrasaccharides stimulate ceramide production through upregulated mRNA expression of ceramide synthesis-associated enzymes. *Arch Derm. Res* **2016**, *308*, 95–101, doi:10.1007/s00403-015-1615-6.
89. Kirschner, N.; Haftek, M.; Niessen, C.M.; Behne, M.J.; Furuse, M.; Moll, I.; Brandner, J.M. CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *J Invest Derm.* **2011**, *131*, 932–943, doi:10.1038/jid.2010.390.
90. Gruber, J.V.; Holtz, R.; Riemer, J. Hyaluronic acid (HA) stimulates the in vitro expression of CD44 proteins but not HAS1 proteins in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and is HA molecular weight dependent. *J Cosmet Derm.* **2021**, doi:10.1111/jocd.14188.
91. Tammi, R.; MacCallum, D.; Hascall, V.; Pienimaki, J.; Hyttinen, M.; Tammi, M. Hyaluronan Bound to CD44 on Keratinocytes Is Displaced by Hyaluronan Decasaccharides and Not Hexasaccharides. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28878–28888.
92. Jokela, T.; Oikari, S.; Takabe, P.; Rilla, K.; Karna, R.; Tammi, M.; Tammi, R. Interleukin-1beta-induced Reduction of CD44 Ser-325 Phosphorylation in Human Epidermal Keratinocytes Promotes CD44 Homomeric Complexes, Binding to Ezrin, and Extended, Monocyte-adhesive Hyaluronan Coats. *J Biol Chem* **2015**, *290*, 12379–12393, doi:10.1074/jbc.M114.620864.
93. Pasonen-Seppanen, S.; Hyttinen, J.M.; Rilla, K.; Jokela, T.; Noble, P.W.; Tammi, M.; Tammi, R. Role of CD44 in the organization of keratinocyte pericellular hyaluronan. *Histochem Cell Biol* **2012**, *137*, 107–120, doi:10.1007/s00418-011-0883-2.
94. Tolg, C.; Liu, M.; Cousteils, K.; Telmer, P.; Alam, K.; Ma, J.; Mendina, L.; McCarthy, J.B.; Morris, V.L.; Turley, E.A. Cell-specific expression of the transcriptional regulator RHAMM provides a timing mechanism that controls appropriate wound re-epithelialization. *J Biol Chem* **2020**, *295*, 5427–5448, doi:10.1074/jbc.RA119.010002.
95. Tammi, M.I.; Day, A.J.; Turley, E.A. Hyaluronan and homeostasis: A balancing act. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 4581–4584, doi:10.1074/jbc.R100037200.
96. Higman, V.A.; Briggs, D.C.; Mahoney, D.J.; Blundell, C.D.; Sattelle, B.M.; Dyer, D.P.; Green, D.E.; DeAngelis, P.L.; Almond, A.; Milner, C.M.; et al. A refined model for the TSG-6 link module in complex with hyaluronan: Use of defined oligosaccharides to probe structure and function. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 5619–5634, doi:10.1074/jbc.M113.542357.

97. Baranova, N.S.; Foulcer, S.J.; Briggs, D.C.; Tilakaratna, V.; Enghild, J.J.; Milner, C.M.; Day, A.J.; Richter, R.P. Inter-alpha-inhibitor impairs TSG-6-induced hyaluronan cross-linking. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 29642–29653, doi:10.1074/jbc.M113.477422.
98. Lesley, J.; Gal, I.; Mahoney, D.J.; Cordell, M.R.; Rugg, M.S.; Hyman, R.; Day, A.J.; Mikecz, K. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 25745–25754, doi:10.1074/jbc.M313319200.
99. Baranova, N.S.; Nileback, E.; Haller, F.M.; Briggs, D.C.; Svedhem, S.; Day, A.J.; Richter, R.P. The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 25675–25686, doi:10.1074/jbc.M111.247395.
100. Rugg, M.S.; Willis, A.C.; Mukhopadhyay, D.; Hascall, V.C.; Fries, E.; Fulop, C.; Milner, C.M.; Day, A.J. Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 25674–25686, doi:10.1074/jbc.M501332200.
101. Tan, K.T.; McGrouther, D.A.; Day, A.J.; Milner, C.M.; Bayat, A. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: Differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin. *J Eur Acad Derm. Venereol* **2011**, *25*, 317–327, doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03792.x.
102. Huth, S.; Heise, R.; Vetter-Kauczok, C.S.; Skazik, C.; Marquardt, Y.; Czaja, K.; Knuchel, R.; Merk, H.F.; Dahl, E.; Baron, J.M. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 5 (ITIH5) is overexpressed in inflammatory skin diseases and affects epidermal morphology in constitutive knockout mice and murine 3D skin models. *Exp Derm.* **2015**, *24*, 663–668, doi:10.1111/exd.12704.
103. Huth, S.; Huth, L.; Marquardt, Y.; Fietkau, K.; Dahl, E.; Esser, P.R.; Martin, S.F.; Heise, R.; Merk, H.F.; Baron, J.M. Inter-alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 5 (ITIH5) Is a Natural Stabilizer of Hyaluronan That Modulates Biological Processes in the Skin. *Ski. Pharm. Physiol* **2020**, *33*, 198–206, doi:10.1159/000509371.
104. Tammi, R.H.; Tammi, M.I. Hyaluronan accumulation in wounded epidermis: A mediator of keratinocyte activation. *J Invest Derm.* **2009**, *129*, 1858–1860, doi:10.1038/jid.2009.91.
105. Simpson, R.M.; Meran, S.; Thomas, D.; Stephens, P.; Bowen, T.; Steadman, R.; Phillips, A. Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* **2009**, *175*, 1915–1928, doi:10.2353/ajpath.2009.090045.
106. Shakya, S.; Mack, J.A.; Alipour, M.; Maytin, E.V. Cutaneous Wounds in Mice Lacking TSG-6 Exhibit Delayed Closure and an Abnormal Inflammatory Response. *J Invest Derm.* **2020**, *140*, 2505–2514, doi:10.1016/j.jid.2020.04.015.
107. Faway, E.; Cambier, L.; De Vuyst, E.; Evrard, C.; Thiry, M.; Lambert de Rouvroit, C.; Mignon, B.; Poumay, Y. Responses of Reconstructed Human Epidermis to Trichophyton rubrum Infection and Impairment of Infection by the Inhibitor PD169316. *J Invest Derm.* **2019**, *139*, 2080–2089 e2086, doi:10.1016/j.jid.2019.03.1147.
108. Park, A.Y.; Bourtembourg, M.; Chretien, A.; Hubaux, R.; Lancelot, C.; Salmon, M.; Fitton, J.H. Modulation of Gene Expression in a Sterile Atopic Dermatitis Model and Inhibition of Staphylococcus aureus Adhesion by Fucoidan. *Dermatopathol. (Basel)* **2021**, *8*, 69–83, doi:10.3390/dermatopathology8020012.
109. Eichenfield, L.F.; Tom, W.L.; Chamlin, S.L.; Feldman, S.R.; Hanifin, J.M.; Simpson, E.L.; Berger, T.G.; Bergman, J.N.; Cohen, D.E.; Cooper, K.D.; et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Derm.* **2014**, *70*, 338–351, doi:10.1016/j.jaad.2013.10.010.
110. Cork, M.J.; Robinson, D.A.; Vasilopoulos, Y.; Ferguson, A.; Moustafa, M.; MacGowan, A.; Duff, G.W.; Ward, S.J.; Tazi-Ahmini, R. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene-environment interactions. *J Allergy Clin Immunol* **2006**, *118*, 3–21; quiz 22–23, doi:10.1016/j.jaci.2006.04.042.
111. De Vuyst, É.; Mound, A.; Lambert de Rouvroit, C.; Poumay, Y. Modelling atopic dermatitis during the morphogenetic process involved in reconstruction of a human epidermis. *Curr. Res. Transl. Med.* **2016**, *64*, 179–183, doi:10.1016/j.retram.2016.10.005.
112. Huet, F.; Severino-Freire, M.; Cheret, J.; Gouin, O.; Praneuf, J.; Pierre, O.; Misery, L.; Le Gall-Ianotto, C. Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *J Derm. Sci* **2018**, *89*, 213–218, doi:10.1016/j.jdermsci.2017.11.015.
113. Hubaux, R.; Bastin, C.; Salmon, M. On the relevance of an in vitro reconstructed human epidermis model for drug screening in atopic dermatitis. *Exp Derm.* **2018**, *27*, 1403–1407, doi:10.1111/exd.13810.
114. Tobiishi, M.; Sayo, T.; Yoshida, H.; Kusaka, A.; Kawabata, K.; Sugiyama, Y.; Ishikawa, O.; Inoue, S. Changes in epidermal hyaluronan metabolism following UVB irradiation. *J Derm. Sci* **2011**, *64*, 31–38, doi:10.1016/j.jdermsci.2011.06.006.
115. Sayo, T.; Sugiyama, Y.; Takahashi, Y.; Ozawa, N.; Sakai, S.; Ishikawa, O.; Tamura, M.; Inoue, S. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J Invest Derm.* **2002**, *118*, 43–48, doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01613.x.
116. Ghatak, S.; Maytin, E.V.; Mack, J.A.; Hascall, V.C.; Atanelishvili, I.; Moreno Rodriguez, R.; Markwald, R.R.; Misra, S. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *Int J Cell Biol* **2015**, *2015*, 834893, doi:10.1155/2015/834893.
117. Monslow, J.; Sato, N.; Mack, J.A.; Maytin, E.V. Wounding-induced synthesis of hyaluronic acid in organotypic epidermal cultures requires the release of heparin-binding egf and activation of the EGFR. *J Invest Derm.* **2009**, *129*, 2046–2058, doi:10.1038/jid.2009.9.
118. Ohtani, T.; Memezawa, A.; Okuyama, R.; Sayo, T.; Sugiyama, Y.; Inoue, S.; Aiba, S. Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Derm.* **2009**, *129*, 1412–1420, doi:10.1038/jid.2008.394.
119. Wells, A.F.; Lunding, A.; Michaëlsson, G. Histochemical localization of hyaluronan in psoriasis, allergic contact dermatitis and normal skin. *Acta Derm Venereol* **1991**, *71*, 232–238.

120. Wight, T.N. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biol* **2017**, *60–61*, 38–56, doi:10.1016/j.matbio.2016.12.001.
121. Velez-DelValle, C.; Marsch-Moreno, M.; Castro-Munozledo, F.; Kuri-Harcuch, W. Decorin gene expression and its regulation in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *411*, 168–174, doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.122.
122. Bocian, C.; Urbanowitz, A.K.; Owens, R.T.; Iozzo, R.V.; Gotte, M.; Seidler, D.G. Decorin potentiates interferon-gamma activity in a model of allergic inflammation. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 12699–12711, doi:10.1074/jbc.M112.419366.
123. Dyer, D.P.; Salanga, C.L.; Johns, S.C.; Valdambri, E.; Fuster, M.M.; Milner, C.M.; Day, A.J.; Handel, T.M. The Anti-inflammatory Protein TSG-6 Regulates Chemokine Function by Inhibiting Chemokine/Glycosaminoglycan Interactions. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 12627–12640, doi:10.1074/jbc.M116.720953.
124. Dyer, D.P.; Thomson, J.M.; Hermant, A.; Jowitt, T.A.; Handel, T.M.; Proudfoot, A.E.; Day, A.J.; Milner, C.M. TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8. *J Immunol* **2014**, *192*, 2177–2185, doi:10.4049/jimmunol.1300194.
125. Mascia, F.; Mariani, V.; Girolomoni, G.; Pastore, S. Blockade of the EGF Receptor Induces a Deranged Chemokine Expression in Keratinocytes Leading to Enhanced Skin Inflammation. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 303–312, doi:10.1016/s0002-9440(10)63654-1.
126. Mathay, C.; Pierre, M.; Pittelkow, M.R.; Depiereux, E.; Nikkels, A.F.; Colige, A.; Poumay, Y. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Derm.* **2011**, *131*, 46–58, doi:10.1038/jid.2010.272.
127. Giltaire, S.; Lambert, S.; Poumay, Y. HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 1651–1659, doi:10.1002/jcp.22496.
128. Lee, J.E.; Kim, Y.A.; Yu, S.; Park, S.Y.; Kim, K.H.; Kang, N.J. 3,6-Anhydro-L-galactose increases hyaluronic acid production via the EGFR and AMPKalpha signaling pathway in HaCaT keratinocytes. *J Derm. Sci* **2019**, *96*, 90–98, doi:10.1016/j.jdermsci.2019.10.005.



Responses of Reconstructed Human Epidermis to *Trichophyton rubrum* Infection and Impairment of Infection by the Inhibitor PD169316

Emilie Faway¹, Ludivine Cambier², Evelyne De Vuyst¹, Céline Evrard¹, Marc Thiry³, Catherine Lambert de Rouvroit¹, Bernard Mignon² and Yves Poumay¹

Despite the threatening incidence of dermatophytosis, information is still lacking about the consequences of infection on epidermal barrier functions and about the keratinocyte responses that alert immune components. To identify the mechanisms involved, arthroconidia of the anthropophilic dermatophyte *Trichophyton rubrum* were prepared to infect reconstructed human epidermis (RHE) in vitro. Integrity of the barrier was monitored during infection by measurements of transepithelial electrical resistance and dye-permeation through the RHE. Expression and release of pro-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides by keratinocytes inserted into the RHE were assessed, respectively, by quantitative reverse transcriptase–PCR (to analyze mRNA content in tissue extracts) and by ELISA (to detect proteins in culture media). Results reveal that infection by *T. rubrum* is responsible for disruption of the epidermal barrier, including loss of functional tight junctions. It additionally causes simultaneous expression and release of cytokines and antimicrobial peptides by keratinocytes. Potential involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway was evaluated during infection by targeted inhibition of its activity. Intriguingly, among several p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors, PD169316 alone was able to inhibit growth of *T. rubrum* on Sabouraud agar and to suppress the process of infection on RHE. This suggests that PD169316 acts on a specific target in dermatophytes themselves.

Journal of Investigative Dermatology (2019) 139, 2080–2089; doi:10.1016/j.jid.2019.03.1147

INTRODUCTION

Dermatophytosis is a superficial mycosis, whose prevalence is estimated between 20 and 25% in the global human population and has increased over the last decade (Havlickova et al., 2008; Hayette and Sacheli, 2015; Seebacher et al., 2008; Zhan and Liu, 2017). The anthropophilic *Trichophyton rubrum* species is the most common dermatophyte responsible for glabrous skin infections (Lee et al., 2015; Tomoyuki et al., 2014), which are generally limited to the stratum corneum (SC) (Weitzman and Summerbell, 1995). The confinement of fungal hyphae and spores in superficial epidermal layers is thought to be associated with both the epidermal barrier itself and the appropriate activation of the immune system (Martinez-Rossi et al., 2017; Mignon et al., 2008; Vermout et al., 2008). The latter is known to induce not only innate immune responses but also

an adaptive immune response involving TCR-mediated immunity, which is critical for fungal clearance and clinical recovery (Burstein et al., 2018; Calderon and Hay, 1984; Heinen et al., 2018). However, the consequences of dermatophytic infection on the epidermal barrier and on the keratinocyte responses that alert innate immune components remain poorly understood.

The epidermal barrier protects the organism against external aggressions and water loss (Bäsler et al., 2016). Its efficiency is possible because of the collaboration between its physical components, that is, the SC and tight junctions (TJs), antimicrobial peptides (AMPs), cells of the immune system, and the skin microbiome (Brandner, 2016; Proksch et al., 2008). The SC is composed of corneocytes held together by corneodesmosomes across the intercellular lipid matrix and is extremely resistant to physical stress, as well as relatively impermeable to water and many chemicals (Haftek, 2015; van Smeden and Bouwstra, 2016). TJs are intercellular junctions established between granular keratinocytes and are responsible for the paracellular impermeability in the epidermis (Kirschner et al., 2013).

In case of infection, keratinocytes are the cells initially encountered by dermatophytes. They can detect pathogens via pathogen-associated molecular pattern recognition, by using pattern recognition receptors: toll-like receptors (TLRs) 2, 4, and 6, notably (Brasch et al., 2014; Cambier et al., 2016; García-Madrid et al., 2011). Activation of pattern recognition receptors on keratinocytes induces signaling pathways, leading to expression and release of pro-

¹URPHYM-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium; ²FARAH, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium; and ³Cell and Tissue Biology Unit, GIGA–Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium

Correspondence: Yves Poumay, URPHYM-NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium. E-mail: yves.poumay@unamur.be

Abbreviations: AMP, antimicrobial peptide; CN, copy number; hBD, human β -defensin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PBS, phosphate buffered saline; RHE, reconstructed human epidermis; SC, stratum corneum; TJ, tight junction; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor

Received 21 December 2018; revised 22 March 2019; accepted 25 March 2019; accepted manuscript published online 12 April 2019; corrected proof published online 10 June 2019

inflammatory cytokines and AMP. Particularly, the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway can be activated in response to environmental stresses and its involvement is implied in a variety of cellular processes, including inflammation (Kyriakis and Avruch, 2012; Zarubin and Han, 2005). Interestingly, the p38 MAPK signaling pathways were involved in AMP expression by keratinocytes exposed to a cell wall component of *Candida albicans* (Li et al., 2011) and were found to be activated in keratinocytes exposed to *Trichophyton equinum* dermatophytes (Achterman et al., 2015). Moreover, several studies performed in vitro on keratinocyte monolayers have shown increased expression and release of cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8, in response to stimulation by dermatophytes (Nakamura et al., 2002; Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007).

In addition, the exposure of keratinocytes cultured as monolayers to fungal cells is poorly representative of in vivo infection. In vivo models of dermatophytosis using guinea pigs (Baldo et al., 2010) or mice (Cambier et al., 2014; Heinen et al., 2018) are useful to study the immune responses against dermatophytosis, but differences could exist with human infection. Therefore, cultures of human skin equivalents appear to be quite relevant models to study human dermatophytosis.

Such a model of dermatophytosis was setup through infection of reconstructed human epidermis (RHE) by arthroconidia of the anthropophilic species *T. rubrum* (Faway et al., 2017). This model appears rather representative of human dermatophytosis, with fungal components proliferating over time and invading the SC. Herein, this model has been used in order to assess damage to the epidermal barrier, as well as to detect specific activation of keratinocyte responses during infection. While investigating the potential involvement of the p38 MAPK signaling pathway in the reported keratinocyte responses to infection, the unique effects of PD169316 compound were highlighted on growth and infection properties of dermatophytes—PD169316 compound being a well-known inhibitor of p38 MAPK.

RESULTS

Fungal hyphae invaded the SC by progressing between corneocytes

Progression of fungal elements through RHE infected by *T. rubrum* arthroconidia was monitored over time by morphological analysis (Figure 1a). A progressive invasion into SC was observed: on the first day, hyphae emerging from arthroconidia spread over the SC surface and penetrated SC by sneaking between corneocytes (Figure 1b); on the fourth day, hyphae were found in the intercellular space through the full thickness of SC (Figure 1c).

T. rubrum infection simultaneously altered integrity of the epidermal barrier and activated keratinocyte responses

The epidermal barrier integrity of RHE was assessed during infection by measurement of transepithelial electrical resistance and assessment of its permeability to Lucifer yellow fluorescent dye (Figure 2a–c). Sudden barrier alterations appeared on the fourth day following infection. Conversely, the barrier was strengthened over time in non-infected RHE. Additionally, inside-out permeability of RHE was studied

using biotin dissolved in culture medium, revealing that the integrity of TJs was reduced on the fourth day after infection (Figure 2d). Accordingly, the TJ protein claudin-1 exhibited an altered distribution in infected RHE, as assessed by immunostaining (see Supplementary Figure S1 online).

Infection of RHE further triggered mRNA expression in keratinocytes, as well as the cells' release of cytokines (IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF α , TSLP, and G-CSF), of protein TNF α -stimulated gene 6, and AMP (human β -defensin-2 [hBD2] and -3 [hBD3], S100A7) as revealed, respectively, by quantitative reverse transcriptase–PCR (RT-qPCR) and ELISA (Figure 2e and f and see Supplementary Figure S2 online). Conversely, except for transglutaminase-1, which was slightly overexpressed 1 day after infection, the expression of differentiation markers (filaggrin, involucrin, or loricrin) or of TLR2, TLR5, and TLR6 exhibited no alteration during infection (see Supplementary Figure S3 online). Expression and release of all factors studied remained unaltered inside RHE exposed either to phosphate buffered saline (PBS) alone or to heat-killed arthroconidia.

The copy number (CN) for the *DEFB4* gene, encoding hBD2, can range from 2 to 12 and is linked to variations in basal expression levels for hBD2 (Hollox et al., 2003). High CN in patients affords reduced susceptibility to dermatophytosis (Jaradat et al., 2015). The most frequent *DEFB4* CN in the population is 4, hence a CN of <4 is considered “low” and that of >4 as “high” (Jaradat et al., 2013). Eight primary keratinocyte cultures in our laboratory were genotyped to count *DEFB4* CN. Data revealed between 3 and 5 CN for this gene (see Supplementary Figure S4 online). Keratinocytes with 3 *DEFB4* CN were selected for RHE production in this study.

p38 MAPK inhibitor PD169316 hampers infection of RHE by affecting dermatophyte growth

Because activation of p38 MAPK has been associated with infection by dermatophytes (Achterman et al., 2015) and is also found in untreated RHE (Figure 3), a potential role for p38 MAPK during *T. rubrum* infection of RHE was investigated using the PD169316—a p38 MAPK-specific inhibitor. No further activation of p38 MAPK can be observed during RHE infection (Figure 3a). Thus, the actual inhibition of p38 MAPK activity by PD169316 was assessed through detection of phosphorylation of heat shock protein 27—considering that this is a known phosphorylation target of p38 MAPK in keratinocytes (Garmyn et al., 2001)—in RHE exposed to H₂O₂ in order to activate p38 MAPK signaling pathway (Peus et al., 1999; Mathay et al., 2008) (Figure 3b).

Interestingly, the presence of PD169316 prevents the epidermal barrier alterations that are usually induced on the fourth day after *T. rubrum* infection (Figure 4a–c). Furthermore, the extent of SC invasion by arthroconidia is also reduced (Figure 4d) whereas the overexpression of IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF α , hBD2, and hBD3, usually induced by infection, is not observed in the presence of PD169316 (Figure 4e and see Supplementary Figure S5 online).

Because p38 MAPK activity seems unaltered during infection of RHE, a potential effect of PD169316 on *T. rubrum* growth itself was hypothesized and studied by seeding arthroconidia on Sabouraud agar (2% glucose and 1% peptone) containing PD169316. After a 7-day incubation

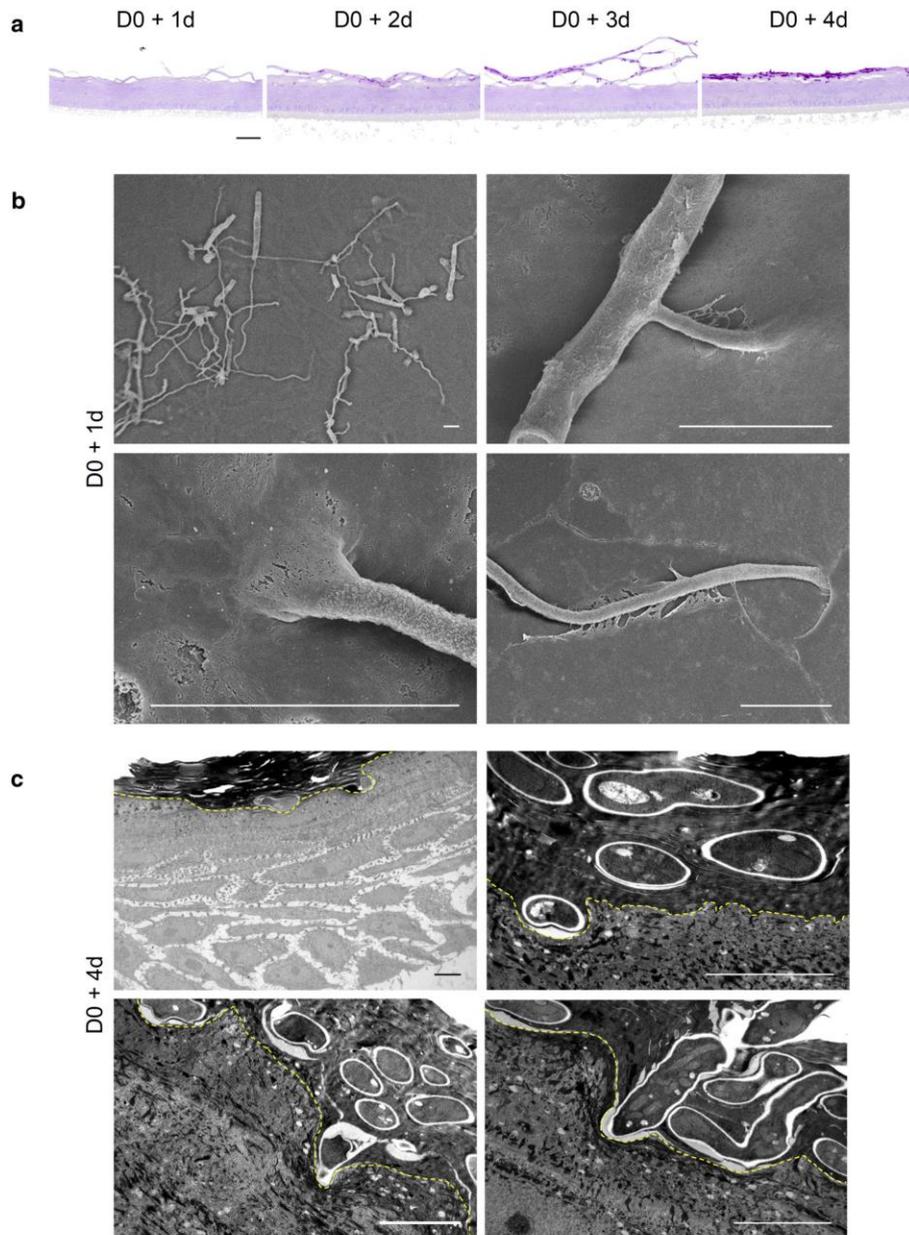


Figure 1. Fungal hyphae invade SC in RHE by progressing through intercellular space. (a) PAS staining with α -amylase treatment of histological sections prepared from RHE infected by *Trichophyton rubrum* arthroconidia for 1 (D0 + 1 day), 2 (D0 + 2 days), 3 (D0 + 3 days), or 4 (D0 + 4 days) days. Scale bar = 50 μ m. (b, c) SC colonization and invasion of RHE by *T. rubrum* arthroconidia respectively assessed (b) by scanning electron microscopy performed 1 day after infection (D0 + 1 day) or (c) by transmission electron microscopy performed 4 days after infection (D0 + 4 days). Yellow dotted lines indicate limits between SC and *stratum granulosum*. Scale bars = 5 μ m. PAS, periodic-acid Schiff; RHE, reconstructed human epidermis; SC, *stratum corneum*.

at 27 °C, the number of colony-forming units was reduced in the presence of PD169316, and colonies appeared smaller and more compact, while fungal hyphae seemed thinner and presented fewer septa when analyzed through scanning electron microscopy (Figure 5a and b). In good accordance with PD169316 having an effect on dermatophytes, the growth of *T. rubrum* arthroconidia on lyophilized RHE was impaired by PD169316 (Figure 5c). Similar growth inhibition

was observed for two other species, *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton benhamiae*, seeded on Sabouraud agar containing PD169316 (Figure 5d and e). Conversely though, other p38 MAPK inhibitors, namely SB202190, SB203580, VX-702, and BIRB796, did not alter growth of *T. rubrum* (Figure 6), *T. interdigitale*, or *T. benhamiae* (see Supplementary Figure S6 online) on Sabouraud agar, nor the infection of RHE by *T. rubrum* arthroconidia (data not

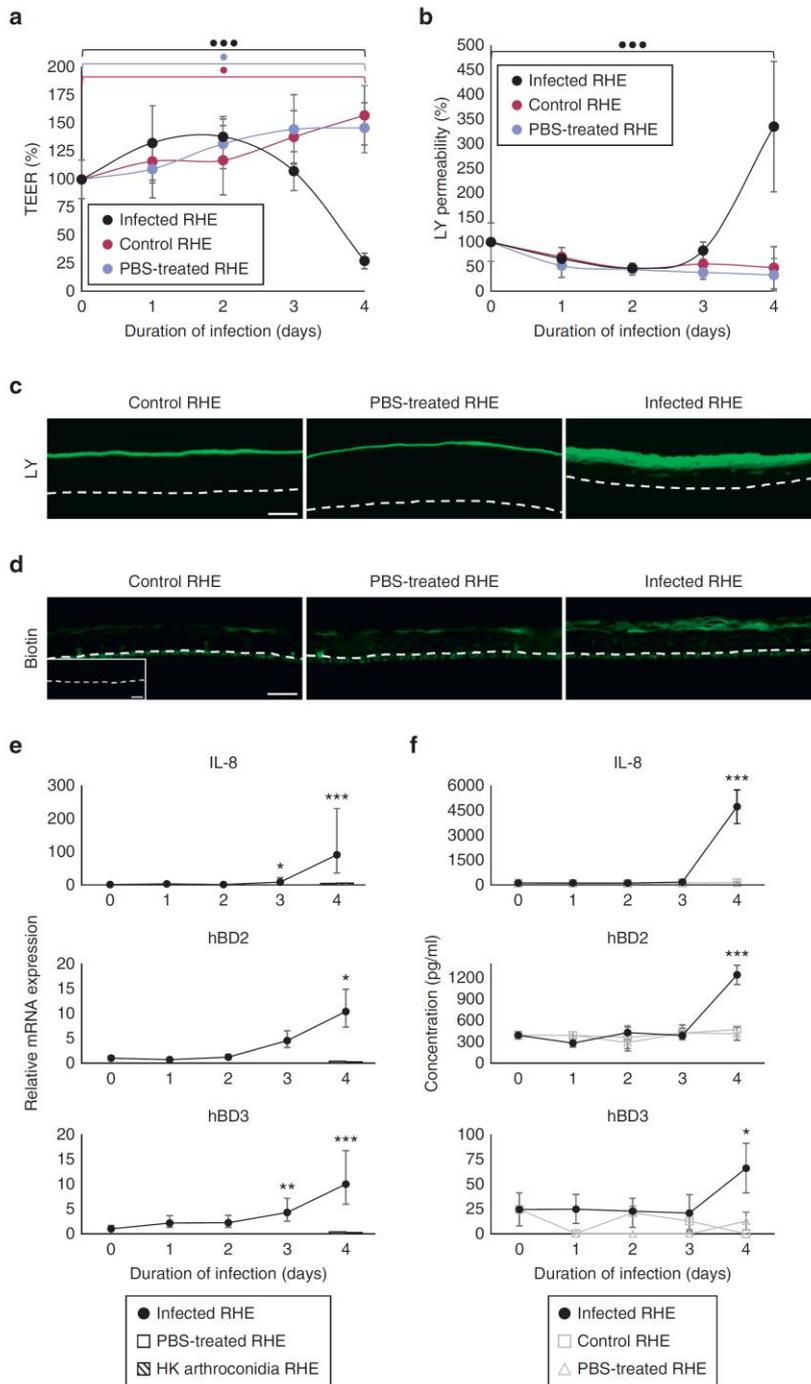


Figure 2. Infection of RHE by *Trichophyton rubrum* simultaneously induces epidermal barrier alterations and keratinocyte responses. (a) Transepithelial electrical resistance and (b) permeability to LY fluorescent dye of infected RHE compared with control and PBS-treated RHE (n = 6; mean ± standard deviation). (c) Fluorescence analysis of LY dye penetration in RHE and (d) localization of biotin by fluorescence-labeling after inside-out permeability assay on the fourth day after infection. Negative control incubated without biotin (inset); dotted lines show the filter. Scale bars = 50 μm. (e) Expression and (f) release of pro-inflammatory cytokine (IL-8) and AMP (hBD2, hBD3) by keratinocytes of infected RHE, compared with control and PBS-treated RHE and RHE exposed to HK arthroconidia, respectively assessed by RT-qPCR and ELISA in culture media (n = 3; mean ± confidence interval 95% or mean ± standard deviation for RT-qPCR or ELISA results, respectively). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, one-way ANOVA. ANOVA, analysis of variance; HK, heat-killed; LY, Lucifer yellow; PBS, phosphate buffered saline; RHE, reconstructed human epidermis; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR.

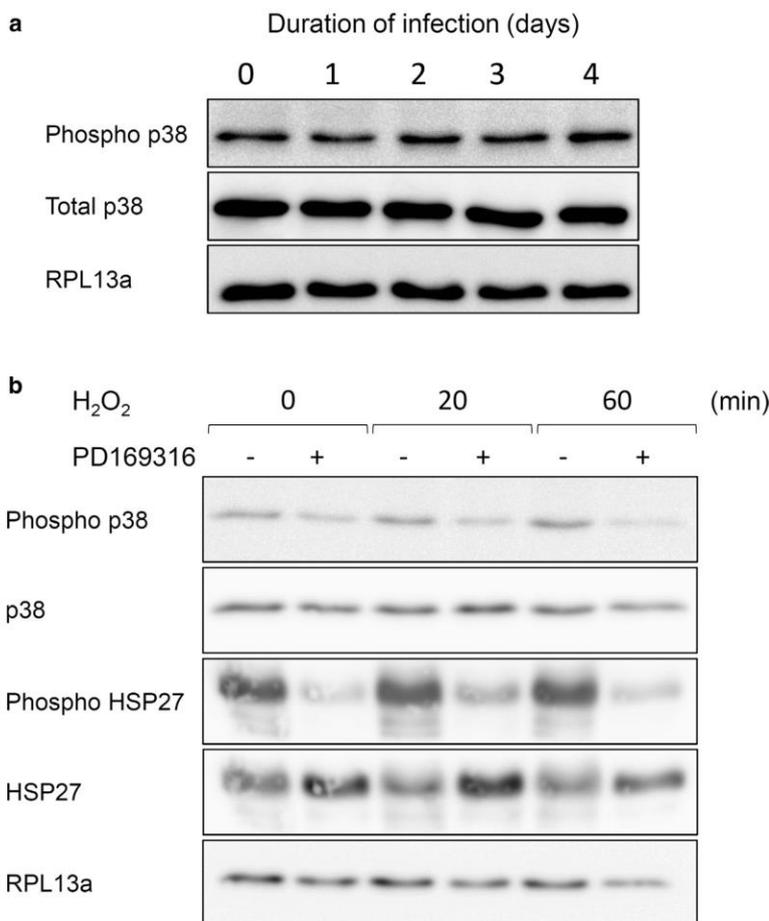
shown). Moreover, culture in presence of PD169316 or SB203580 did not suppress the growth of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, whereas strain knockout for *sty1*, the yeast homolog for p38 MAPK, exhibited drastically reduced cell growth under any culture condition (see [Supplementary Figure S7](#) online).

DISCUSSION

The in vitro model of *T. rubrum* dermatophytosis in RHE has been previously validated as representative of in vivo human cutaneous dermatophytosis lesions (Faway et al., 2017). Here, we characterized the consequences of infection on epidermal barrier integrity, and the primary responses of keratinocytes.

Figure 3. p38 MAPK is constitutively phosphorylated in RHE and its activity can be inhibited by PD169316.

(a) Levels of p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK investigated by western blotting, using antibodies specific for p38 MAPK or phosphorylated p38 MAPK, after protein extraction from RHE, during *Trichophyton rubrum* infection (0 to 4 days). (b) Levels of p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK, as well as levels of HSP27 and phosphorylated HSP27 assessed by western blotting, using specific antibodies, on protein extracts from RHE, either previously treated for 24 hours with PD169316 (15 μM), a p38 MAPK-specific inhibitor, or not treated, then exposed to H₂O₂ (1 mM) for 20 or 60 minutes. The detection of RPL13a protein was used as loading control. HSP27, heat shock protein 27; MAPK, mitogen-activated protein kinase; RHE, reconstructed human epidermis.



Hyphae of *T. rubrum* invade SC and disrupt the epidermal barrier

Electron microscopy images suggest that *T. rubrum* hyphae invade the SC via intercellular progression between corneocytes. Furthermore, hyphae of *Trichophyton mentagrophytes* have previously been shown to invade the SC between corneocytes in both infected SC sheets (Aljabre et al., 1992) and skin sections (Duek et al., 2004). These results suggest that dermatophytes are able to orientate the direction of hyphal growth in relation to the physical and topographical features of the substrate, a phenomenon known as thigmotropism and regulated by complex molecular signaling pathways (Almeida and Brand, 2017). Thigmotropism is required in vitro and in vivo for invasion of host surfaces by pathogenic fungi, such as *C. albicans* and dermatophytes (Jayatilake et al., 2005; Perera et al., 1997; Piérard et al., 2007). These observations also suggest that dermatophytes may degrade corneodesmosomes and parts of the lipid extracellular matrix while hyphae invade the SC. As dermatophytes secrete several proteases during in vivo infection (Méhul et al., 2016; Tran et al., 2016), hyphae may thus be responsible for altering the barrier integrity observed during infection of RHE.

In the absence of an immune system and microbiome, the RHE barrier relies on physical components of SC and TJs (Proksch et al., 2008); this explains the observation that it strengthens over time in untreated RHE as a likely result of SC thickening. Barrier function of RHE that has been temporarily covered with PBS, increases similarly, suggesting that transient moistening of the epidermal surface does not alter barrier integrity. By contrast, the barrier of infected RHE is suddenly disrupted on the fourth day after infection by *T. rubrum* arthroconidia, in line with an observed increase of transepithelial water loss in biopsies from dermatophytosis cutaneous lesions (Jensen et al., 2007). In addition, the function of TJs is lost on the fourth day after RHE infection, concomitantly with the altered localization of claudin-1. Perturbed TJs have been reported as well in vitro and in vivo during *Staphylococcus aureus* infection, in association with simultaneous redistribution of TJ proteins (Bäsler et al., 2017; Ohnemus et al., 2008). Taken together, these observations suggest that invading hyphae progressively increase permeability of the SC. On the fourth day following infection, hyphae reaching the top of granular layer induce the alterations of TJs that correspond to the sudden loss in epidermal barrier

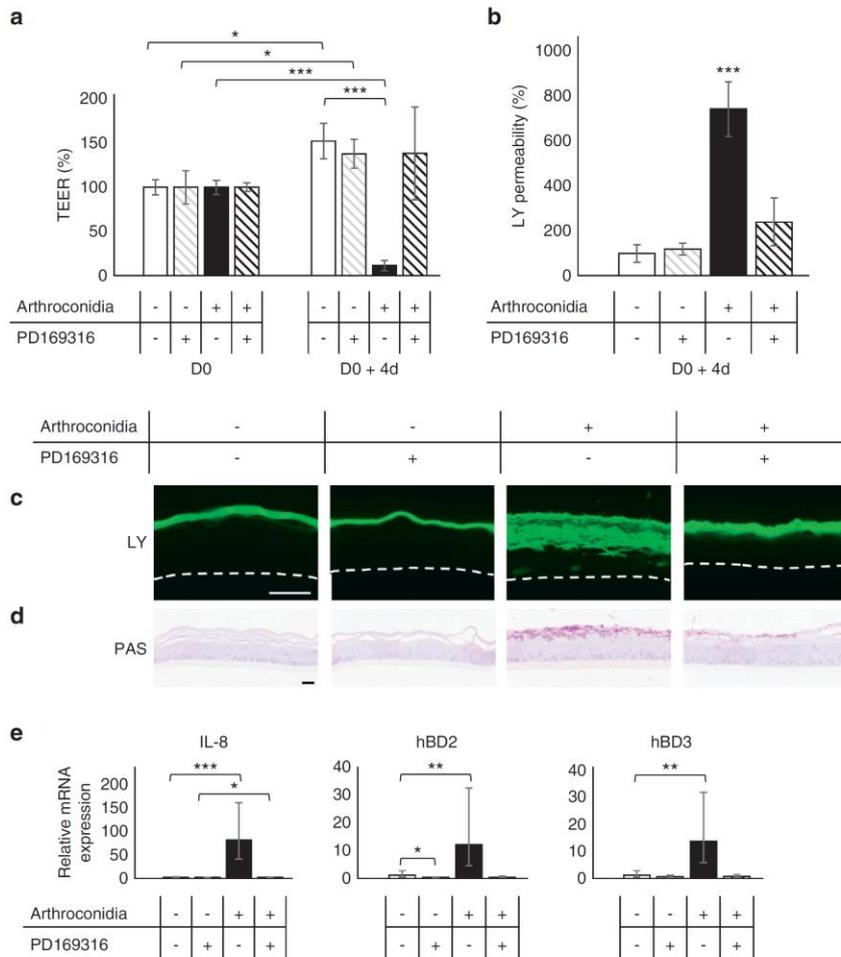


Figure 4. PD169316 hampers development of *Trichophyton rubrum* infection on RHE and prevents barrier alterations, as well as keratinocyte responses. RHE were cultured in presence or absence of PD169316 (15 μ M) and either infected with *T. rubrum* arthroconidia for 4 days (D0 + 4 days) before barrier analysis and investigation of keratinocyte responses, or not infected. (a) Transepithelial electrical resistance and (b) permeability to LY fluorescent dye in four studied conditions (n = 3; mean \pm standard deviation). (c) Analysis by fluorescent microscopy of LY dye penetration illustrated for the four conditions. Dotted lines localize the filter. Scale bar = 50 μ m. (d) Same conditions observed by PAS staining with α -amylase pretreatment. Scale bar = 20 μ m. (e) Relative mRNA expression of IL-8, hBD2, and hBD3 determined by RT-qPCR analysis of RNA extracts from RHE in same conditions (n = 3; mean \pm confidence interval 95%). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, one-way ANOVA. ANOVA, analysis of variance; LY, Lucifer yellow; PAS, periodic-acid Schiff; RHE, reconstructed human epidermis; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR.

integrity. In the absence of immune cells, this barrier disruption allows dermatophytes to colonize the full thickness of RHE. Further evidence is provided by histological demonstration that fungal elements invade living cell layers of RHE from the fifth day after infection (Faway et al., 2017). It is of note that mRNA expression of epidermal differentiation markers remains unaltered during *T. rubrum* infection of RHE, even though *T. rubrum* infection disturbs epidermal morphology. This observation does not exclude concomitant redistribution of differentiation markers, as previously observed in dermatophytosis lesions (Jensen et al., 2007).

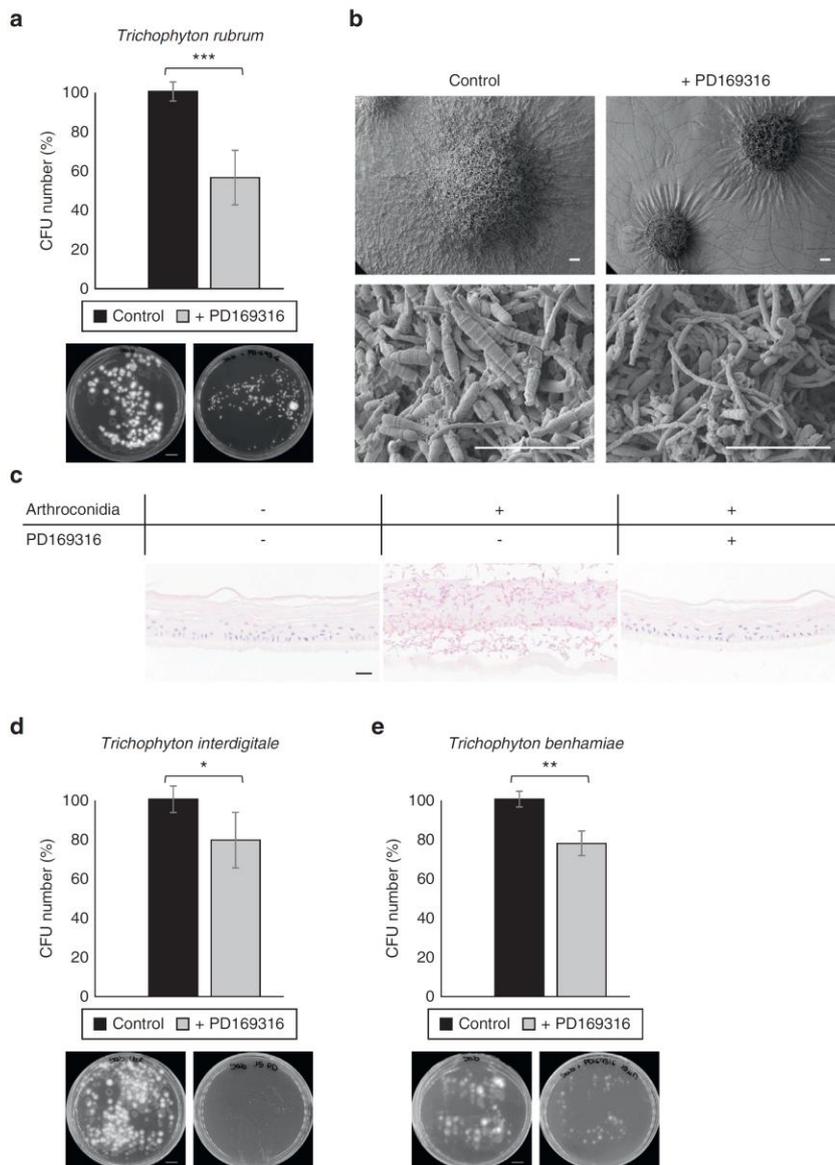
T. rubrum infection induces inflammatory responses in RHE

Keratinocytes of infected RHE overexpress and release several cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8) and AMP (hBD2, hBD3, S100A7) from the fourth day after infection. Release of G-CSF, an early response of epithelial cells to *Candida albicans* infection (Moyes et al., 2016), was detected at low concentration in our model, whereas IL-6 and RNase7 expression was scarcely detectable. In

contrast, neither transient moistening of the tissue, nor exposure to killed arthroconidia induced those responses. Some in vitro studies report release of these cytokines by infected keratinocytes, while others do not (Achterman et al., 2015; Nakamura et al., 2002; Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007). Expression of pro-inflammatory cytokines and subsequent activation of T helper type 1 and T helper type 17 immunity have been observed in a mouse model of dermatophytosis (Cambier et al., 2014; Heinen et al., 2018). Furthermore, overexpression and release of hBD2, hBD3, RNase7, and S100A7 in response to dermatophytes have been demonstrated in vitro (Firat et al., 2014) and in vivo (Brasch et al., 2014). The apparent discrepancies in cytokine profiles may represent distinct keratinocyte responses to different dermatophytes species. In line with this, specific cytokine profiles characterize the responses to anthropophilic versus zoophilic dermatophytes species (Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007). In addition to inflammatory cytokines, TSG-6, an anti-inflammatory protein, was produced in response to *T. rubrum* infection of RHE. Accordingly, infection by *T. rubrum* induces the

Figure 5. PD169316 impairs dermatophyte growth in culture on Sabouraud agar.

Dermatophytes arthroconidia were seeded on Sabouraud agar containing PD169316 (15 μM) or lacking it (control) and incubated for 7 days at 27 °C. (a) Culture dishes illustrating colonies and comparison of *Trichophyton rubrum* growth determined by percentage of CFU versus control (n = 3; mean ± standard deviation). Scale bar = 1 cm. (b) Scanning electron microscopy observation of *T. rubrum* colonies. Lower panels present hyphae in colony centers at higher magnification. Scale bars = 100 μm. (c) PAS staining revealing infection by *T. rubrum* arthroconidia of lyophilized RHE and inhibition by PD169316. Scale bar = 20 μm. (d, e) Illustration of growth percentage determined by percentage of CFU versus control (n = 3; mean ± standard deviation) and macroscopic aspect of colonies obtained with *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton benhamiae*. Scale bars = 1 cm. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Student t test. CFU, colony-forming unit; PAS, periodic-acid Schiff; RHE, reconstructed human epidermis.



release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by macrophages (Campos et al., 2006).

The simultaneous activation of keratinocyte responses and epidermal barrier disruption suggests that both events are related. Perturbation of the epidermal barrier allows contact between dermatophytes and living granular keratinocytes that are able to recognize fungal molecular patterns through TLR (Netea et al., 2008), inducing production of cytokines and AMP. However, a reverse mechanism cannot be excluded: during invasion of SC by dermatophytes, granular keratinocytes could recognize fungal secreted material (Brouta et al., 2003; Descamps et al., 2003) and react by

producing cytokines and AMP which can, in turn, influence the epidermal barrier (Kirschner et al., 2009).

PD169316 inhibits growth of dermatophytes

As p38 MAPK activation had been previously associated with dermatophyte infection (Achterman et al., 2015), its role during infection of RHE was monitored using PD169316, a p38 MAPK-specific inhibitor (Jans et al., 2004; Mathay et al., 2008). Unexpectedly, PD169316 was shown to inhibit growth of arthroconidia from *T. rubrum*, *T. interdigitale*, and *T. benhamiae*, both on RHE and on Sabouraud agar. Moreover, colonies grown in vitro in the

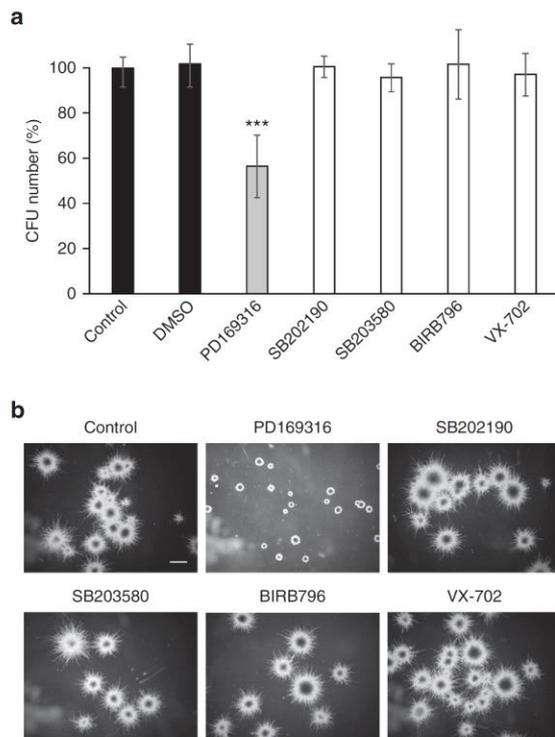


Figure 6. Among five well-known p38 MAPK inhibitors, PD169316 is the only one that alters dermatophytes growth. *Trichophyton rubrum* arthroconidia were seeded on Sabouraud agar containing 15 μ M of different p38 MAPK-specific inhibitors and incubated for 7 days at 27 °C. (a) Growth percentage of *T. rubrum* evaluated by CFU counting ($n = 3$; mean \pm standard deviation) and (b) by microscopic observations of colonies in the presence of the inhibitors. Scale bar = 1 mm. *** $P < 0.001$, Student t test. CFU, colony-forming unit; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

presence of PD169316 are smaller and display abnormal morphology.

A candidate fungal target of PD169316 is a *T. rubrum* p38 protein kinase ortholog with 50% amino acid identity to human p38. However, PD169316 does not alter growth of yeast *S. pombe*, whose p38 MAPK ortholog (Sty1) shares 84% identity with *T. rubrum* p38 protein kinase. This observation suggests that the fungal target of PD169316, whose inhibition leads to dermatophytes growth impairment, could not be the p38 protein kinase. In addition, other p38 MAPK inhibitors SB202190, SB203580, VX-702, and BIRB796, do not inhibit dermatophyte growth on Sabouraud agar, nor infection of RHE. Thus, among the p38 MAPK inhibitors, PD169316 exhibits unique effects, as observed in a study investigating antiviral activities against Enterovirus71 (Zhang et al., 2017).

Summary

This report illustrates that *T. rubrum* infection of RHE results in simultaneous epidermal barrier disruption and activation of keratinocyte responses. It shows that PD169316 inhibits dermatophyte growth and thereby qualifies as a candidate drug against dermatophytosis.

MATERIALS AND METHODS

Dermatophyte strains, culture, and production of arthroconidia

The strains IHEM 13894 of *T. rubrum*, IHEM 00584 of *T. interdigitale*, and IHEM 20163 of *T. benhamiae*, isolated from naturally infected humans, were obtained from the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/IHEM collection of biomedical fungi and yeasts, Brussels, Belgium). Arthroconidia were produced as previously described in Tabart et al. (2007). Briefly, dermatophytes grown at 27 °C on Sabouraud agar (containing 2% glucose and 1% peptone) were recovered and cultured on YEN agar (containing 2% yeast extract and 1% peptone) at 30 °C in an atmosphere containing 12% CO₂. The surface of the mycelium was scraped, added to sterile PBS, and this solution was stirred overnight at 4 °C and then filtered through three Miracloth layers (22–25 μ m pore size; Millipore, Overijse, Belgium) to recover unicellular fungal elements corresponding to arthroconidia. Heat-killed arthroconidia were obtained by 10-minute incubation in a boiling water bath, followed by PBS washes.

Infection of RHE by *T. rubrum* dermatophyte

RHE was prepared as described (De Vuyst et al., 2014) and cultured in EpiLife medium (Cascade Biologics, Mansfield, UK), supplemented with Human Keratinocyte Growth Supplement (Cascade Biologics, Mansfield, UK) and containing 1.5 mM Ca²⁺, 10 ng/ml keratinocyte growth factor (R&D system, Abingdon, UK), and 50 μ g/ml vitamin C.

The procedure used for infection was previously described (Faway et al., 2017). Concisely, RHE was infected on day 0 (D0) by topical application of a PBS-suspension of *T. rubrum* arthroconidia, in order to reach a density of 1,700 arthroconidia per cm². Four hours later, the suspension was removed from RHE, followed by washes with PBS. Infected RHE was then cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 4 additional days with the culture medium renewed daily.

PBS-treated RHE consisted of RHE that only PBS was applied on D0 and that had undergone washes. For infection of RHE with heat-killed arthroconidia, PBS was first topically applied on D0, followed by washes four hours later. On the fourth day following PBS-exposure, 1,000,000 heat-killed *T. rubrum* arthroconidia were applied topically and infected RHE was finally analyzed, after four hours of incubation.

Histological analysis

For histological analysis, RHE was processed as described by De Vuyst et al. (2014). Periodic-acid Schiff staining was performed with hemalum counterstaining and pretreatment with α -amylase as previously described (Faway et al., 2017).

Assessment of epidermal barrier integrity

Transepithelial electrical resistance of RHE was measured using a Millicell ERS-2 Voltohmmeter (Millipore, Overijse, Belgium) and expressed as percentages of values determined in the RHE control.

To assess the permeability of RHE, 150 μ l of fluorescent dye (Lucifer yellow vs. dilithium salt; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) were laid on the surface of RHE placed over 200 μ l of culture medium. RHE was incubated at 37 °C for 6 hours in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The amount of Lucifer yellow in the medium under the RHE was finally determined by measuring its fluorescence using a fluorescence reader. In addition, sections of

RHE were observed using a fluorescent microscope in order to localize Lucifer yellow in tissue.

To investigate efficiency of the inside-out barrier, we assessed biotin diffusion from culture media to the apical surface of RHE. After washes with PBS containing 1 mM CaCl₂, RHE was incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 30 minutes, over 500 µl of the same solution containing 2 mg/ml biotin (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin; ThermoScientific, Rockford, IL). RHE was washed with PBS containing CaCl₂ and 100 mM glycine, fixed for 24 hours in 4% formaldehyde solution and, finally, embedded in paraffin. Tissue sections were stained with streptavidin conjugated to Alexa Fluor 488 (dilution 1:500; Invitrogen, Aalst, Belgium) and the localization of biotin was observed using a fluorescence microscope.

Immunostaining, electron microscopy, RNA extraction, RT-qPCR ELISA, and western blot

For detailed description of immunofluorescence staining of claudin-1, scanning and transmission electron microscopy, total RNA extraction, reverse-transcription and quantitative PCR, ELISA, and protein extraction and western blot analysis, see the [Supplementary Materials and Methods](#).

p38 MAPK inhibitors

BIRB796 was purchased from Tocris (Abingdon, UK), PD169316 from Santa Cruz biotechnology (Heidelberg, Germany), SB202190 and SB203580 from InvivoGen (Toulouse, France), and VX-702 from Selleckchem (Munich, Germany). Concentration of each inhibitor was 15 µM.

In order to study the efficiency of PD169316, the p38 MAPK signaling pathway was stimulated by treating RHE for 20 or 60 minutes with 1 mM H₂O₂ added to the culture media, followed by one hour of recovery. PD169316 was present in culture media of RHE 24 hours before addition of H₂O₂ and during treatment and recovery.

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out using SigmaPlot software, version 11.0. One-way analysis of variance and Student *t* test were performed to analyze the data.

Data availability statement

Datasets related to this article available at <https://doi.org/10.17632/srfzmgmcg4.1>, an open-source online data repository hosted at Mendeley Data.

ORCID

Emilie Faway: <http://orcid.org/0000-0003-3406-1103>
 Ludivine Cambier: <http://orcid.org/0000-0001-8666-1317>
 Evelyne De Vuyst: <http://orcid.org/0000-0001-7152-1370>
 Céline Evrard: <http://orcid.org/0000-0002-7450-0759>
 Marc Thiry: <http://orcid.org/0000-0001-7736-8709>
 Catherine Lambert de Rouvroit: <https://orcid.org/0000-0002-0273-8995>
 Bernard Mignon: <http://orcid.org/0000-0002-5958-4325>
 Yves Poumay: <http://orcid.org/0000-0001-5200-3367>

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical help provided by B Balau, C Charlier, V De Glas, C De Mazy, K De Swert, J Gilloteaux, V Migeot, P Piscicelli, and D Van Vlaender. Correction of English by V Welch is gratefully acknowledged. Special thanks to B Bienfait and JS Blairvacq for providing skin samples, and to D Hermand for providing *S. pombe* strains. Funding for this research was obtained from the Région Wallonne (MYCAVERT, convention/ grant id 1318058).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: EF, LC, CLDR, BM, YP; Formal Analysis: EF; Funding Acquisition: LC, CLDR, BM, YP; Investigation: EF, LC, CE, MT; Methodology: EF, LC, EDV, CLDR, BM, YP; Project Administration: EF, LC, CLDR, BM, YP; Validation: EF, CLDR, BM, YP; Visualization: EF, CLDR, BM, YP; Writing - Review and Editing: EF, CLDR, BM, YP

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at [10.1016/j.jid.2019.03.1147](https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.03.1147).

REFERENCES

- Achterman RR, Moyes DL, Thavaraj S, Smith AR, Blair KM, White TC, et al. Dermatophytes activate skin keratinocytes via mitogen-activated protein kinase signaling and induce immune responses. *Infect Immun* 2015;83:1705–14.
- Aljabre SH, Richardson MD, Scott EM, Shankland GS. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum *in vitro*. *J Med Vet Mycol* 1992;30:145–52.
- Almeida MC, Brand AC. Thigmo responses: the fungal sense of touch. *Microbiol Spectr* 2017;5:FUNK-0040–2016.
- Baldo A, Mathy A, Tabart J, Camponova P, Vermout S, Massart L, et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br J Dermatol* 2010;162:990–7.
- Bäslér K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 2016;242:105–18.
- Bäslér K, Galliano MF, Bergmann S, Rohde H, Wladykowski E, Vidal-y-Sy S, et al. Biphasic influence of *Staphylococcus aureus* on human epidermal tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1405:53–70.
- Brandner JM. Importance of tight junctions in relation to skin barrier function. *Curr Probl Dermatol* 2016;49:27–37.
- Brasch J, Mörig A, Neumann B, Proksch E. Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in *tinea* and *pityriasis versicolor*. *Mycoses* 2014;57:147–52.
- Brouta F, Descamps F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Humoral and cellular immune response to a *Microsporum canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 2003;41:495–501.
- Burstein VL, Guasconi L, Beccacece I, Theumer MG, Mena C, Prinz I, et al. IL-17-mediated immunity controls skin infection and T helper 1 response during experimental *Microsporum canis* dermatophytosis. *J Invest Dermatol* 2018;138:1744–53.
- Calderon RA, Hay RJ. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology* 1984;53:465–72.
- Cambier L, Weatherspoon A, Defaweux V, Bagut ET, Heinen MP, Antoine N, et al. Assessment of the cutaneous immune response during *Arthroderma benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model. *Br J Dermatol* 2014;170:625–33.
- Cambier LC, Heinen MP, Bagut ET, Antoine NA, Mignon BR. Overexpression of TLR-2 and TLR-4 mRNA in feline polymorphonuclear neutrophils exposed to *Microsporum canis*. *Vet Dermatol* 2016;27:78–81e22.
- Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect* 2006;8:372–9.
- De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, De Glas V, de Rouvroit CL, Poumay Y. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol* 2014;1195:191–201.
- Descamps F, Brouta F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:29–34.
- Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infect* 2004;48:175–80.
- Faway É, Cambier L, Mignon B, Poumay Y, Lambert de Rouvroit C. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: a new tool to study

- infection mechanisms and to test antifungal agents. *Med Mycol* 2017;55:485–94.
- Firat YH, Simanski M, Rademacher F, Schröder L, Brasch J, Harder J. Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLOS ONE* 2014;9:e93941.
- García-Madrid L, Huizar-López M, Flores-Romo L, Islas-Rodríguez A. *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. *Cent Eur J Biol* 2011;6:902–10.
- Garzyn M, Mammone T, Pupe A, Gan D, Declercq L, Maes D. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 MAP kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* 2001;117:1290–5.
- Haftek M. Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. *Cell Tissue Res* 2015;360:483–90.
- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008;51:2–15.
- Hayette M, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep* 2015;9:164–79.
- Heinen MP, Cambier L, Antoine N, Gabriel A, Gillet L, Bureau F, et al. Th1 and Th17 immune responses act complementarily to optimally control superficial dermatophytosis. *J Invest Dermatol* 2018;139:626–37.
- Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a β -defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 2003;73:591–600.
- Jans R, Atanasova G, Jadot M, Poumay Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* 2004;123:564–73.
- Jaradat SW, Cubillos S, Krieg N, Lehmann K, Issa B, Piehler S, et al. Low DEFB4 copy number and high systemic hBD-2 and IL-22 levels are associated with dermatophytosis. *J Invest Dermatol* 2015;135:750–8.
- Jaradat SW, Hoder-Przyrembel C, Cubillos S, Krieg N, Lehmann K, Piehler S, et al. Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2013;92:1035–40.
- Jayatilake JA, Samaranyake YH, Samaranyake LP. An ultrastructural and a cytochemical study of candida invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 2005;34:240–6.
- Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schröder JM, Kleine M, Neumann C, et al. Barrier function, epidermal differentiation, and human β -defensin 2 expression in *Tinea corporis*. *J Invest Dermatol* 2007;127:1720–7.
- Kirschner N, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, et al. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol* 2009;175:1095–106.
- Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2013;133:1161–9.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 2012;92:689–737.
- Lee WJ, Kim SL, Jang YH, Lee SJ, Kim DW, Bang YJ, et al. Increasing prevalence of *Trichophyton rubrum* identified through an analysis of 115,846 cases over the last 37 years. *J Korean Med Sci* 2015;30:639–43.
- Li M, Chen Q, Tang R, Shen Y, Liu WD. The expression of β -defensin-2, 3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2011;61:72–5.
- Martinez-Rossi NM, Peres NT, Rossi A. Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia* 2017;182:215–27.
- Mathay C, Giltaire S, Minner F, Bera E, Hérin M, Poumay Y. Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2008;128:717–27.
- Méhuil B, Gu Z, Jomard A, Laffet G, Feuilhade M, Monod M. (Tri r 2), an onychomycosis marker revealed by proteomics analysis of *Trichophyton rubrum* secreted proteins in patient nail samples. *J Invest Dermatol* 2016;136:331–3.
- Mignon B, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Vermout S. Immunization and dermatophytes. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:134–40.
- Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 2016;532:64–8.
- Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:935–7.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:67–78.
- Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal S, et al. Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *J Invest Dermatol* 2008;128:906–16.
- Perera TH, Gregory DW, Marshall D, Gow NA. Contact-sensing by hyphae of dermatophytic and saprophytic fungi. *J Med Vet Mycol* 1997;35:289–93.
- Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999;112:751–6.
- Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Quatresooz P. Fungal thigmotropism in onychomycosis and in a clear hydrogel pad model. *Dermatology* 2007;215:107–13.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17:1063–72.
- Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 2008;166:335–52.
- Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol* 2006;55:1175–85.
- Tabart J, Baldo A, Vermout S, Nussgens B, Lapiere C, Losson B, et al. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. *J Med Microbiol* 2007;56:971–5.
- Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2007;299:381–7.
- Tran VDT, De Coi N, Feuermann M, Schmid-Siegert E, Băguț ET, Mignon B, et al. RNA sequencing-based genome reannotation of the dermatophyte *Arthroderma benhamiae* and characterization of its secretome and whole gene expression profile during infection. *mSystems* 2016;1:00036–16.
- van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Curr Probl Dermatol* 2016;49:8–26.
- Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166:267–75.
- Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:240–59.
- Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15:11–8.
- Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia* 2017;182:77–86.
- Zhang Z, Wang B, Wu S, Wen Y, Wang X, Song X, et al. PD169316, a specific p38 inhibitor, shows antiviral activity against Enterovirus71. *Virology* 2017;508:150–8.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Claudin-1 immunostaining

For immunostaining of claudin-1, tissue sections were incubated in 10 mM citrate buffer pH 6 at 100 °C for 20 minutes. After slow cooling at room temperature, sections were immersed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1 M glycine. Blocking was performed in PBS containing 0.2% BSA for 30 minutes, before overnight incubation at 4 °C with rabbit polyclonal anti-claudin-1 antibody (dilution 1:50; Invitrogen, Aalst, Belgium). Sections were then incubated for 45 minutes with goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488; dilution 1:1000; Abcam, Cambridge, UK). Finally, coverslips were mounted in Mowiol and tissue sections were observed using confocal microscopy. Negative control was obtained by incubation overnight at 4 °C in PBS-BSA, instead of the solution containing the primary antibody.

Scanning and transmission electron microscopy

To observe *Trichophyton rubrum* colonies over Sabouraud agar by scanning electron microscopy, an agar surface of approximately 1 cm² was seeded. Infected reconstructed human epidermis (RHE) was analyzed after 24 hours of culture. All samples were fixed for 4 hours with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 at 4 °C. Then, they were rinsed three times with 0.2 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 and dehydrated with increasing ethanol concentration (30–100%). After critical-point drying for infected RHE, or Hexamethyldisilazane drying for colonies over Sabouraud agar, and gold-coating, samples were analyzed using JSM-7500F scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 5 kV.

For observation by transmission electron microscopy, control and infected RHE were fixed at 4 °C for 1 hour with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Sørensen's buffer, rinsed three times with this buffer, and postfixed for 1 hour with 2% OsO₄ in the same buffer. After three washes in distilled water, samples were dehydrated in ascending concentrations of ethanol (70–100%) and embedded in Epoxy resin. Finally, ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed using JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL) at 80 kV.

RNA extraction, reverse-transcription, and quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from infected and control (i.e., PBS-treated RHE and RHE exposed to heat-killed arthroconidia) RHE using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Concentration and purity of extracted RNA were determined using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Rockford, IL). Subsequently, RNA was reverse-transcribed into cDNA using the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Aalst, Belgium). The cDNA was diluted 1:20 in distilled water and stored at –20 °C.

All primers used for QPCR showed an efficacy between 85% and 110% and are described in [Supplementary Table S1](#) (online). The QPCR mixture was composed of Takyon ROX

SYBR Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgium), 300 nM of each primer and 5 µl of cDNA 1:20 in a total volume of 20 µl. The amplification protocol started with a 10-minute denaturation at 95 °C, followed by 45 cycles of denaturation for 10 seconds at 95 °C, annealing for 10 seconds at 60 °C, and elongation for 10 seconds at 72 °C, and was performed using Light Cycler 96 (Roche, Basel, Switzerland). *RPLPO* was used as reference gene.

ELISA

To assess the release of cytokines or antimicrobial peptides by keratinocytes, ELISA was performed on culture media using the commercial ELISA kits listed in [Supplementary Table S2](#) (online).

Protein extraction and western blotting

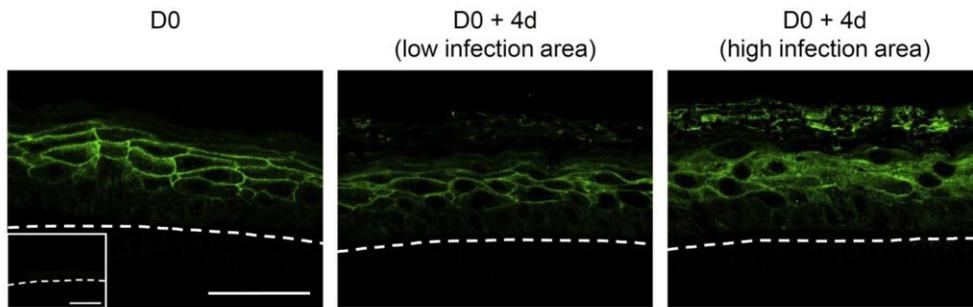
Proteins were extracted from RHE via 5-minute incubation in twice-concentrated Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 8.7% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.2% dithiothreitol) in a boiling water bath. Then, proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (ThermoScientific, Rockford, IL). Blocking of the membrane in PBS containing 1% Tween 20 and 5% powdered milk was followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibody. After washes, the membrane was incubated for one hour at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody before chemiluminescent detection performed using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The detection of RPL13a protein was used as a loading control. Primary antibodies used for western blotting are described in [Supplementary Table S3](#) (online).

DEFB4 gene copy number

Genomic DNA was extracted from keratinocytes using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was then subjected to a quantitative PCR amplification, using the TaqMan Copy Number Assays (Applied Biosystems, Lennik, Belgium) and copy number of the *DEFB4* gene was determined in relation to a reference DNA with known copy number of the *DEFB4* gene (DNA C0913, Culture Collections from Public Health England, UK).

Schizosaccharomyces pombe growth assay

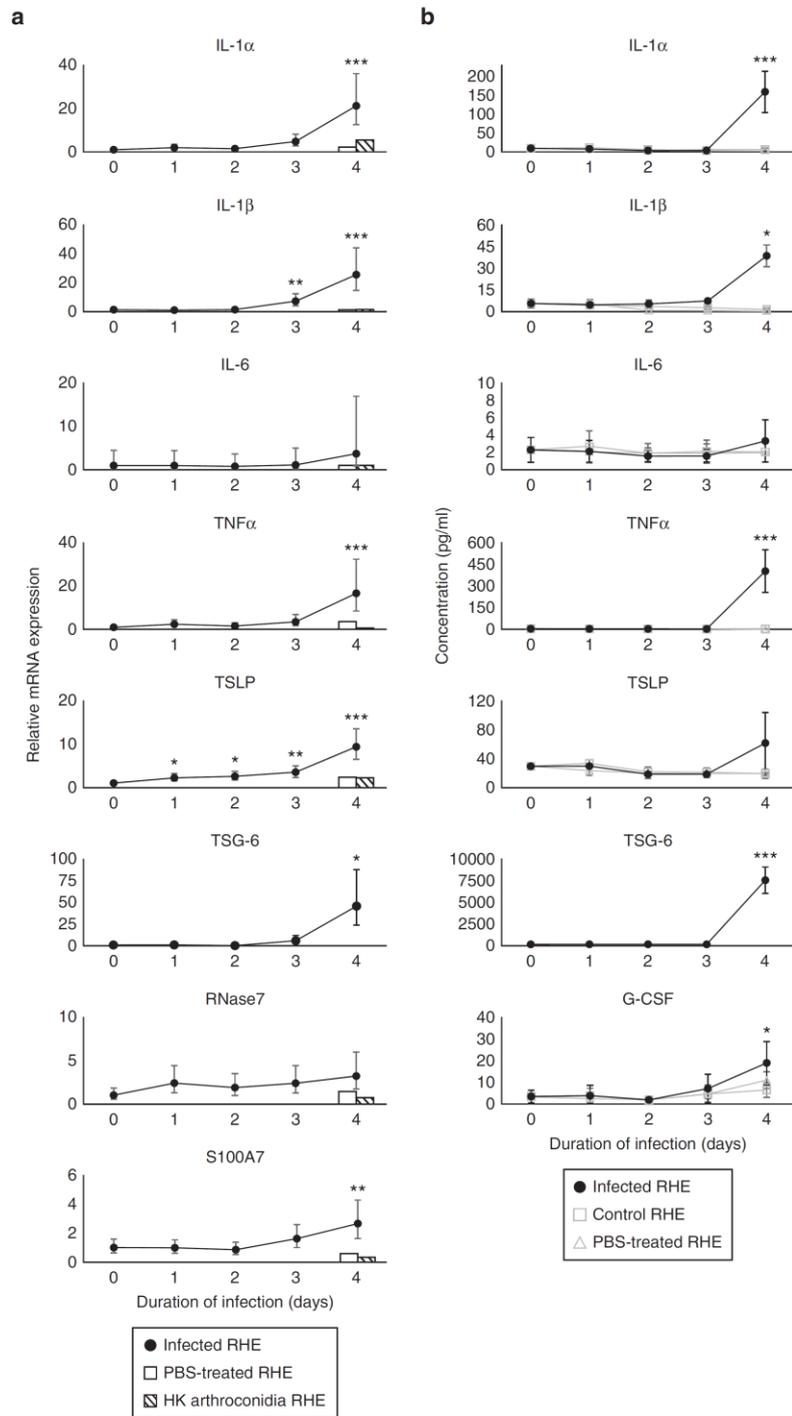
Wild-type (#94 h-) and *sty1* knockout (#903 h- *sty1::kanR*) strains of *S. pombe* were grown in liquid YES medium at 37 °C overnight. The optical density at 595 nm was measured and cultures were diluted to optical density 0.05 (corresponding to 5.5 × 10⁵ cells/ml) and divided into control and treated conditions (0.1% DMSO, 15 µM PD169316, 15 µM SB203580). The different cultures were then grown at 37 °C in YES medium for 24 hours; DMSO, PD169316, or SB203580 being added in culture suspension after two hours. Growth was monitored over time by measuring the optical density at 595 nm 0, 2, 4, 6, 10, and 24 hours after the culture began.

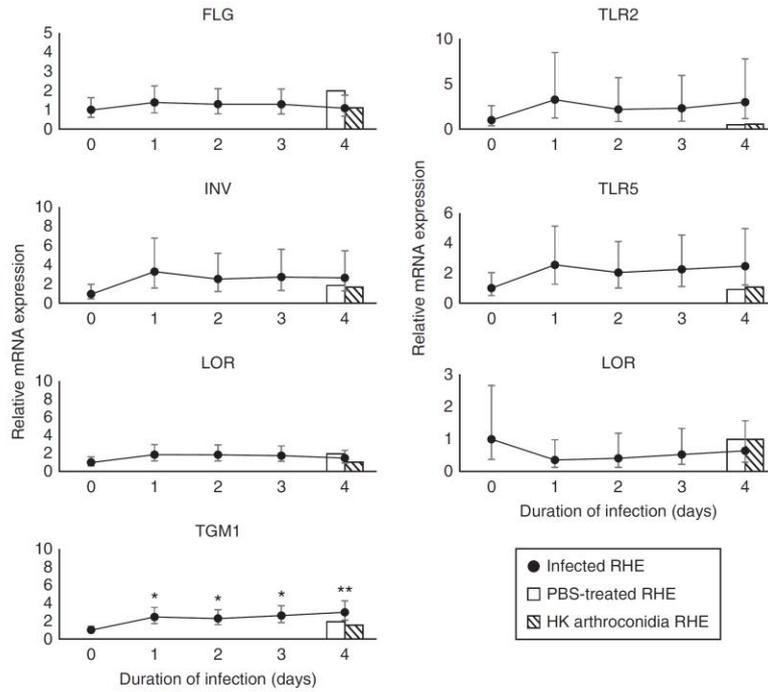


Supplementary Figure S1. Cldn-1 relocates in keratinocytes during infection of RHE by *Trichophyton rubrum* arthroconidia. Immunofluorescence localization of Cldn-1 before (D0) and after 4 days of infection (D0 + 4 days), either in low or in high infection area. Some cross-reaction between the antibody to Cldn-1 and *T. rubrum* arthroconidia can be noticed. Control staining without primary antibody (inset); dotted lines indicate localization of the filter. Scale bars = 50 μ m. Cldn-1, claudin-1; RHE, reconstructed human epidermis.

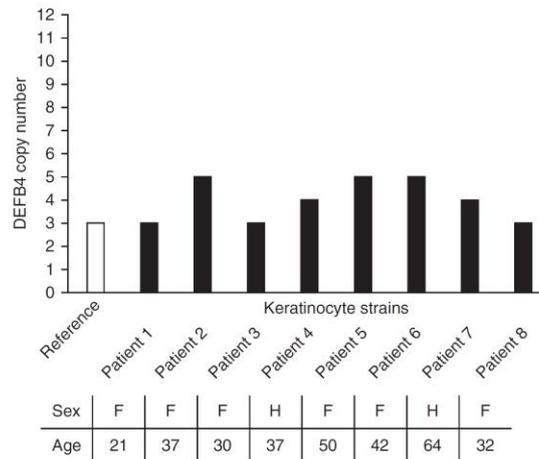
Supplementary Figure S2.
Inflammatory cytokines, TSG-6 protein, and (AMP) are overexpressed and released by keratinocytes during *Trichophyton rubrum* infection.

(a) Expression and (b) release of inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , TSLP, G-CSF), TSG-6 protein, and AMP (RNase7, S100A7) by keratinocytes inside infected RHE compared with those parameters determined in control RHE, and in RHE exposed to PBS only or to HK arthroconidia. Expression was evaluated by RT-qPCR after RNA extraction from control and infected RHE (n = 3; mean \pm confidence interval 95%) and cell release was measured by ELISA assay on culture media (n = 3; mean \pm standard deviation). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with D0, one-way ANOVA. AMP, antimicrobial peptides; ANOVA, analysis of variance; HK, heat-killed; PBS, phosphate buffered saline; RHE, reconstructed human epidermis; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR.

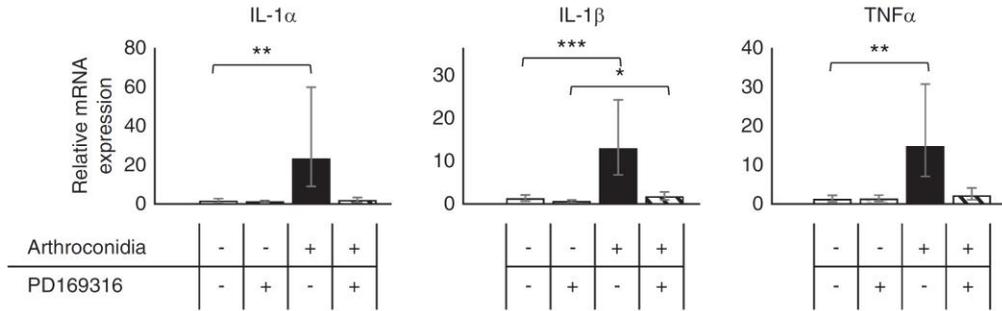




Supplementary Figure S3. TGM1 is overexpressed by keratinocytes during *Trichophyton rubrum* infection. Relative mRNA expression of differentiation markers, FLG, IVL, LOR, and TGM1, or TLR2, TLR5, and TLR6 in infected RHE in comparison with RHE exposed to PBS only or to heat-killed arthroconidia (n = 3; mean ± confidence interval 95%). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with D0, one-way ANOVA. ANOVA, analysis of variance; FLG, filaggrin; IVL, involucrin; LOR, loricrin; PBS, phosphate buffered saline; RHE, reconstructed human epidermis; TGM1, transglutaminase-1; TLR, toll-like receptor.

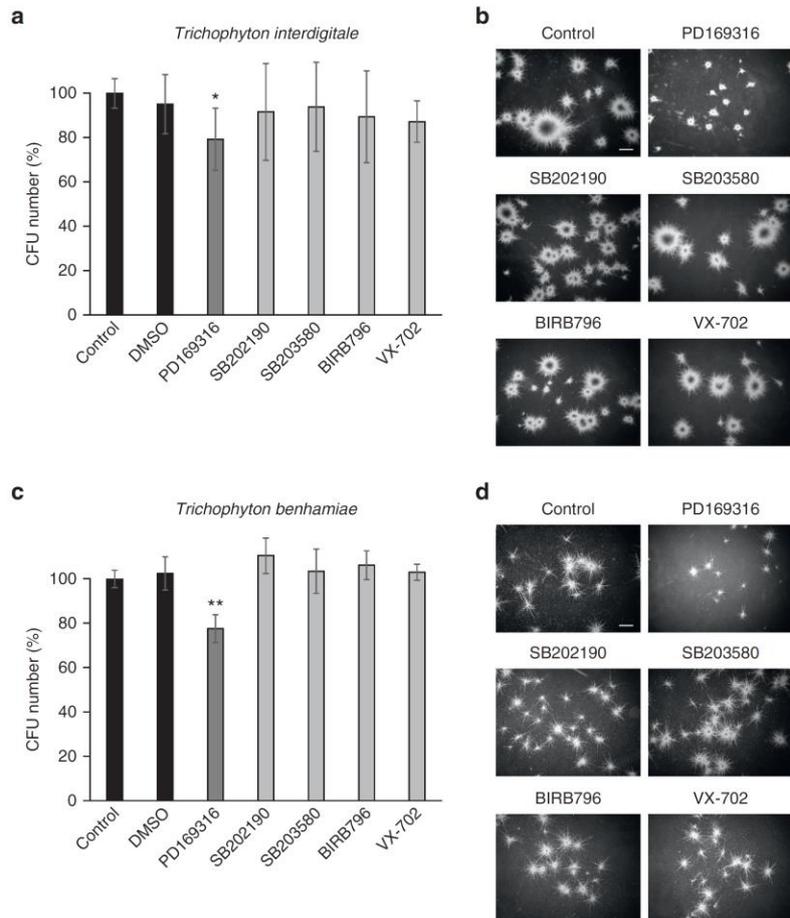


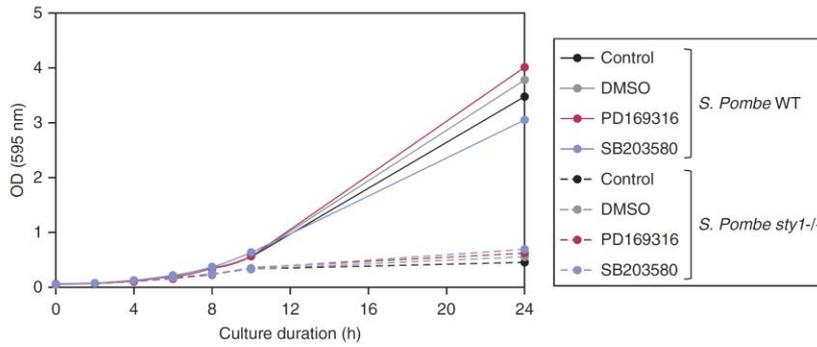
Supplementary Figure S4. Copy number of *DEFB4* gene, encoding antimicrobial peptide hBD2, in strains of primary keratinocytes used to produce RHE. *DEFB4* gene CN assessed by quantitative PCR after genomic DNA extraction from primary keratinocytes cultured from eight patients. The most frequent *DEFB4* CN in the population is 4; CN <4 is considered low while those >4 are considered high CN. Investigations reveal between three and five copies of this gene in available strains. Primary keratinocytes cultured from patients 3 and 8, characterized by low *DEFB4* CN, were selected to produce RHE in our study. CN, copy number; RHE, reconstructed human epidermis.



Supplementary Figure S5. PD169316 hampers the expression of inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , and TNF α by keratinocytes during *Trichophyton rubrum* infection. RHE was cultured in presence or not of PD169316 (15 μ M) in medium and analyzed on the fourth day following infection (D0 + 4 days). Relative mRNA expression of inflammatory cytokines was measured by RT-qPCR after RNA extraction (n = 3; mean \pm confidence interval 95%). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, one-way ANOVA. ANOVA, analysis of variance; RHE, reconstructed human epidermis; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR; TNF α , tumor necrosis factor- α .

Supplementary Figure S6. Among five p38 MAPK inhibitors, PD169316 is the only one that impedes growth in other *Trichophyton* species. (a, b) *Trichophyton interdigitale* or (c, d) *Trichophyton benhamiae* arthroconidia were seeded on Sabouraud agar containing 15 μ M of different p38 MAPK-specific inhibitors (PD169316, SB202190, SB203580, BIRB796, VX-702) or without inhibitors (Control) and incubated for 7 days at 27 $^{\circ}$ C. (a–c) Growth percentage calculated by counting CFUs (n = 3; mean \pm standard deviation) and (b–d) by microscopic observation of colonies compared with control conditions. Scale bars = 1 mm. *** P < 0.001, Student t test. CFU, colony-forming unit; MAPK, mitogen-activated protein kinase.





Supplementary Figure S7. PD169316 does not affect growth of *Schizosaccharomyces pombe*. WT or *sty1*^{-/-} strains of *S. pombe* were cultured in liquid YES medium at 37 °C during 24 hours in presence or not of PD169316 (15 μM) or SB203580 (15 μM), or of DMSO (0.1%). Growth was monitored over time by measuring the OD at 595 nm 0, 2, 4, 6, 10, and 24 hours after culture beginning. DMSO, PD169316, or SB203580 were added in culture suspension after two hours. OD, optical density; *sty1*^{-/-}, *sty1* knockout; WT, wild-type.

Supplementary Table S1. Sequence of Primer Pairs Used for QRT-PCR

Gene Symbol	Forward Primer	Reverse Primer
<i>FLG</i>	GGGCACTGAAAGGCAAAAAG	CACCATAATCATAATCTGCACTACCA
<i>hBD-2</i>	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	GAGACCACAGGTGCCAATT
<i>hBD-3</i>	TCCAGGTCATGGAGGAATCAT	CGAGCACTGCCCATCTGT
<i>IL-1α</i>	AACCAGTGCTGCTGAAGGAGAT	TGGTCTCACTACCTGTGATGGTTF
<i>IL-1β</i>	TCCCAGCCCTTTTGTGA	TTAGAACCAATGTGGCCGTG
<i>IL-6</i>	CCTGAACCTTCCAAAAGATGGC	TTACCAGGCAAGTCTCCTCA
<i>IL-8</i>	GCAGAGGGTTGTGAGAAGTTT	TTGGATACCACAGAGAATGAATTTTT
<i>IVL</i>	TGAAACAGCCAACCTCCAC	TTCTCTTGCTTTGATGGG
<i>LOR</i>	TCATGATGCTACCCGAGGTTTG	CAGACCTAGATGCAGCCGGAGA
<i>RNase 7</i>	CGTGTCCCTGACCATGTGTA	GACTTGTCTGTCGCTTCTCT
<i>RPLP0</i>	ATCAACGGGTACAAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
<i>S100A7</i>	ACGTGATGACAAGATTGAGAAGC	GCGAGGTAATTTGTGCCCTTT
<i>TGM1</i>	GTCGTCTCCGGCTCGAA	TCACTGTTTCATTGCTCCAAT
<i>TLR2</i>	ATCCTCCAATCAGGCTTCTCT	GGACAGGTCAAGGCTTTTATCA
<i>TLR5</i>	TCCCTGAACCTCAGGATCTTT	GGTTGTCAAGTCCGAAAATGC
<i>TLR6</i>	TTCTCCGACGGAAATGAATTTGC	CAGCCGTAGGTCTTTTGGAAC
<i>TNFα</i>	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
<i>TSLP</i>	CGCGTCGCTCGCCAAAGAAA	TGAAGCGACGCCACAATCCTTG

Supplementary Table S2. Commercial ELISA Kits

Cytokine/AMP	ELISA Kit
G-CSF	Human G-CSF DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
hBD-2	Human BD-2 Mini ABTS ELISA Development Kit (PeprTech, London, UK)
hBD-3	Human BD-3 Mini ABTS ELISA Development Kit (PeprTech, London, UK)
IL-1α	Human IL-1 alpha/IL1F1 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
IL-1β	Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
IL-8	Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
IL-6	Human IL-6 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
TNFα	Human TNF-alpha DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
TSLP	Human TSLP DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)

Supplementary Table S3. Primary Antibodies Used for Western Blotting

Protein	Species	Company	Dilution
HSP27	Mouse	Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands	1/1000
Phospho-HSP27	Rabbit	Millipore, Overijse, Belgium	1/5000
p38 MAPK	Rabbit	Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands	1/1000
Phospho-p38 MAPK	Rabbit	Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands	1/1000
RPL13a	Rabbit	Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands	1/1000



Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models

Evelyne De Vuyst¹, Michel Salmon², Céline Evrard¹, Catherine Lambert de Rouvroit¹ and Yves Poumay^{1*}

¹Cell and Tissue Laboratory, URPhyM-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium, ²StratiCell, Les Isnes, Belgium

OPEN ACCESS

Edited by:

Mette Sondergaard Deleuran,
Aarhus University Hospital,
Denmark

Reviewed by:

Elisabeth Ammitzbøll,
Hudklinikken Ballerup,
Denmark
Andrea Chiricozzi,
University of Rome Tor Vergata,
Italy

*Correspondence:

Yves Poumay
yves.poumay@unamur.be

Specialty section:

This article was submitted
to Dermatology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 11 April 2017

Accepted: 11 July 2017

Published: 24 July 2017

Citation:

De Vuyst E, Salmon M, Evrard C,
Lambert de Rouvroit C and
Poumay Y (2017) Atopic Dermatitis
Studies through In Vitro Models.
Front. Med. 4:119.
doi: 10.3389/fmed.2017.00119

Atopic dermatitis (AD) is a complex inflammatory skin condition that is not fully understood. Epidermal barrier defects and Th2 immune response dysregulations are thought to play crucial roles in the pathogenesis of the disease. A vicious circle takes place between these alterations, and it can further be complicated by additional genetic and environmental factors. Studies investigating in more depth the etiology of the disease are thus needed in order to develop functional treatments. In recent years, there have been significant advances regarding *in vitro* models reproducing important features of AD. However, since a lot of models have been developed, finding the appropriate experimental setting can be difficult. Therefore, herein, we review the different types of *in vitro* models mimicking features of AD. The simplest models are two-dimensional culture systems composed of immune cells or keratinocytes, whereas three-dimensional skin or epidermal equivalents reconstitute more complex stratified tissues exhibiting barrier properties. In those models, hallmarks of AD are obtained, either by challenging tissues with interleukin cocktails overexpressed in AD epidermis or by silencing expression of pivotal genes encoding epidermal barrier proteins. Tissue equivalents cocultured with lymphocytes or containing AD patient cells are also described. Furthermore, each model is placed in its study context with a brief summary of the main results obtained. In conclusion, the described *in vitro* models are useful tools to better understand AD pathogenesis, but also to screen new compounds in the field of AD, which probably will open the way to new preventive or therapeutic strategies.

Keywords: atopic dermatitis, *in vitro*, model, reconstructed epidermis, skin equivalents, epidermal keratinocytes

INTRODUCTION

Atopic dermatitis (AD), also referred to as atopic eczema, is one of the most common chronic inflammatory skin diseases and the most common form of eczema in childhood. AD is characterized by dry erythematous lesions and intense pruritus. At the histological level, acute AD lesions mainly involve the epidermis and typically exhibit spongiosis in the suprabasal epidermal layers when compared to the normal tissue. Spongiosis is due to alteration in cohesion between keratinocytes, resulting in enlarged intercellular spaces suggestive of intercellular edema. Inflammatory infiltrate (predominantly lymphocytes) can also be noticed at the epidermal level. Lesional dermis is characterized by a marked perivascular T cell infiltrate, predominantly composed of activated

Abbreviations: AD, atopic dermatitis; IL, interleukin; TSLP(R), thymic stromal lymphopoietin (receptor); LOR, loricrin; IVL, involucrin; RHE, reconstructed human epidermis; HSE, human skin equivalent; ECM, extracellular matrix.

memory/effector T cells. Eosinophils and mast cells (presenting variable degranulation stages) can be observed while basophils and neutrophils remain scarce. In chronic stages of AD, lichenified lesions appear, typically exhibiting epidermal hyperplasia and parakeratotic hyperkeratosis which correspond together to thickening of spinous and cornified layers. A high number of immunoglobulin E (IgE)-bearing Langerhans cells are present inside the epidermis. Slight infiltration by lymphocytes and macrophages, together with elevated number of mast cells, generally fully granulated, characterize the inflammatory dermal infiltrate. More numerous eosinophils can also be observed inside the dermis of chronic AD skin lesions (1, 2).

Regarding its pathogenesis, AD is a relapsing disease that is complex, multifactorial, and still not completely understood. AD can very likely be triggered by both epidermal barrier alterations and Th2 immune response dysregulation, each of them being potentially responsible for the induction of the other alteration, thereby creating a vicious circle responsible for the lesions (3–5). Understanding the pathogenesis of AD is further complicated by several genetic factors, as well as by diverse environmental factors like intensive use of soaps and detergents, house dust mites, pollutants, allergens, and psychological stress (6–8). Regarding genetic predisposition, filaggrin (FLG) gene has been extensively studied for variations linked to the context of AD (9–14). Indeed, FLG is thought to play a crucial role in the pathophysiology of AD because the protein encoded is involved at different levels in the formation and maintenance of a correct epidermal barrier (15, 16). Indeed, any decrease in FLG expression, as well as in its function, may alter aggregation of keratin filaments and thus formation of functional corneocytes. *Via* its metabolites, FLG alterations may affect the levels of natural moisturizing factors (NMF) and consequently modify skin hydration and possibly its pH values. Dehydration of the skin induces xerosis, leading then to pruritus and to further alterations of the epidermal barrier, whereas any elevation in the skin surface pH enhances activity of proteases responsible for the desquamation process and decreases activity of enzymes implicated in barrier lipid synthesis (17). All these altered processes can weaken the epidermal barrier and enhance penetration of allergens/pathogens, inducing further skin inflammation. It is important to note that FLG loss-of-function mutations are not the only reasons responsible for alterations in the role of FLG in epidermal barrier formation and maintenance. Indeed, AD patients present alteration of their epidermal barrier irrespectively of their FLG genotype (18). Further, a relationship between FLG and AD has been proven independent from FLG mutations within a French cohort (19) for instance, whereas strong reductions in FLG expression levels are observed in AD skin (lesional and non-lesional) (20, 21). Pellerin and co-workers reported that *in vitro* treatments of keratinocytes with inflammatory cytokines highly expressed in AD epidermis, namely IL-4, IL-13, and IL-25, were found to reduce FLG expression. Similar findings have been reported by further groups (20, 22, 23) and other cytokines like IL-17, IL-22, or IL-31 also were found potentially able to decrease FLG expression in keratinocytes (24–26). Thus, decrease in FLG contribution to the epidermal barrier, either through reduced expression or by loss-of-function gene mutations, are strongly related to inflammatory conditions. Any downregulation of FLG

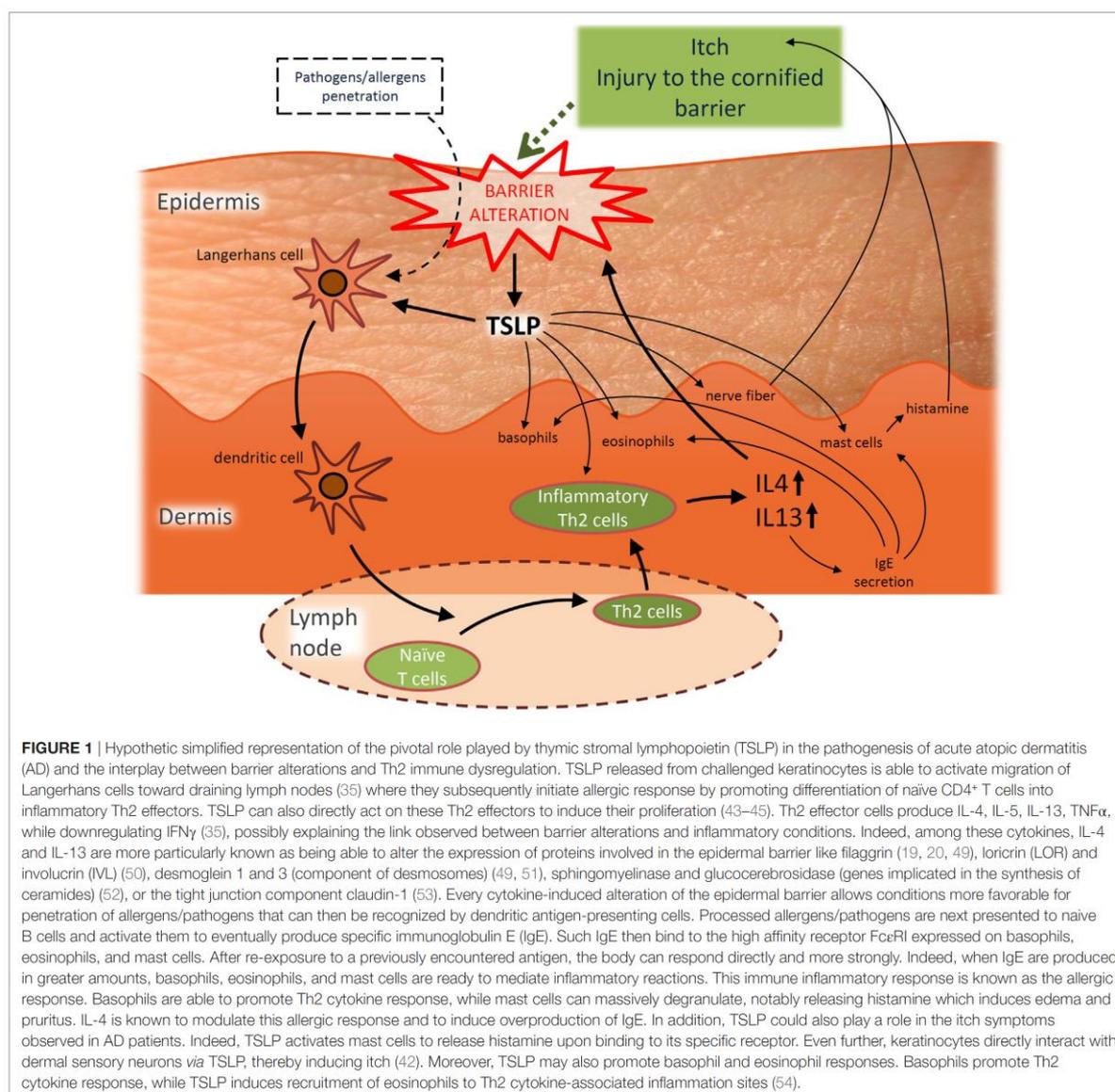
in the epidermis worsens barrier permeability and consequently results into triggered inflammation, particularly in lesional areas.

Thus, this limited, but quite well-studied, part of AD pathogenesis provides very useful information to better understand initiation and maintenance of the afore-mentioned vicious circle and likely the particularly relapsing nature of the disease.

In addition, AD is considered the initial step of the so-called “atopic march,” which corresponds to the consecutive development of asthma and/or allergic rhinitis during the life-course of 30–50% of AD patients, particularly those who are the most severely affected (27–29). The “atopic march” can partly be explained through the role played by thymic stromal lymphopoietin (TSLP), a cytokine induced by trauma, microbial infection, toll-like receptor activation, or by combinations of inflammatory cytokines (30–34). TSLP is found at elevated concentrations in AD epidermis (35) and its induction in skin has been reported to be accompanied by elevated levels in blood circulation. TSLP is believed to be a systemic driver for bronchial hyperresponsiveness since blockade of TSLP signaling (36) or inducible gene deletion of TSLP in mice keratinocytes (37, 38) prevents occurrence of the atopic march, suggesting a potential direct link between AD and allergic asthma and/or allergic rhinitis (39–41). Of further interest, TSLP released from challenged keratinocytes (31–35) would play an important role in the disease by contributing to the itch symptoms that characterize the disease (42) but also to the Th2-promoting conditions (43–47), thus favoring inflammation and thereby also barrier alterations (48), playing thereby a potentially initiating role in the vicious circle of AD pathogenesis. The particular role played by TSLP is described in **Figure 1**.

Atopic dermatitis is mostly known as an imbalance of the Th2 immune response as in the acute phase of the disease significant increases in gene expression levels of major Th2 cytokines are reported. The disease itself is rather characterized by a biphasic inflammation and a switch to a Th1 environment is commonly reported during chronic phases of AD (1, 55–57). However, situation is probably more complicated as small increases in Th1 and Th17 are also found in acute lesions while a progressive activation of Th2 and Th22 cells would also characterize the chronic phase of the disease (58).

In regard to the diversity of factors involved in AD pathogenesis, it is currently difficult to elaborate treatments that can directly target all aspects involved in the etiology of the disease. Existing treatments are aimed at restoring epidermal barrier defects and/or reducing skin inflammation, in combination with avoidance of environmental factors that are supposed or demonstrated to negatively influence the severity of the disease (59). Studies that more deeply investigate mechanisms leading to this pathology are, therefore, still required. In order to further investigate the development of AD lesions, as well as for preclinical development of potentially protecting or resolving treatments and drugs, animal models that adequately reproduce symptoms of AD have been first generated [for a review see Ref. (60)]. However, mice do not spontaneously develop AD and translation of the disease condition from experimental mice to humans and *vice versa* remains questionable because, even though mouse and human skin exhibit numerous similarities, crucial differences do also exist. For instance, mouse keratinocytes produce fewer epidermal



layers (6–7 layers for mouse versus 16–18 layers for human) and renewal of the murine tissue happens within 8–10 days only, whereas the one in humans lasts for 28 days or so. Obviously, mouse skin contains higher numbers and wider diversity of hair follicles (less present in tail and ears), and epidermal papillae (also known as *rete ridges*) penetrate less deeply. Mouse skin also lacks sweat glands (eccrine sweat glands are exclusively present in the pads) and melanocytes in the interfollicular epidermis. Regarding potential explanation of mechanisms driving inflammatory skin pathologies, it is also important to take into account the differences in the immune cell population. Indeed, $\gamma\delta$ T cells as well as dendritic epidermal T cells (DETC) are present in mouse but not

in human epidermis. These DETC can secrete large amounts of pro-inflammatory mediators involved in epidermal communication with keratinocytes and Langerhans cells (61, 62).

In conclusion, *in vitro* models based on human tissues to study etiological parameters of inflammatory cutaneous diseases like AD have been awaited for a long time, but such models are now regularly reported in several various context. In addition for this requirement of human-based *in vitro* models for etiological studies, it worth mentioning that, since authorities of the European Union have prohibited the testing of cosmetic finished products or of their ingredients on laboratory animals and they even banned the marketing of cosmetic products tested

on animals outside the EU (Regulation (EC) No 1223/2009), legal restrictions have further argued for the development and assessment of *in vitro* models that involve cutaneous tissues. Nowadays, *in vitro* models have to become reliable alternative methods for studies about human epidermal pathologies, as well as for screening eventual toxic properties on skin of still unevaluated or new chemicals.

Using *in vitro* model, it is possible to mimic different characteristics of the AD pathology. Indeed, histological features of the AD epidermis can be induced, alteration of the epidermal barrier can be monitored, some characteristics of inflammation can be reproduced and expression of genes can be easily analyzed both at the mRNA and protein levels. Several different *in vitro* models regarding AD have been published within the last 10 years in the literature. Given the complex interplay between immune dysregulations and epidermal barrier alterations in AD, most *in vitro* models have to focus on these two aspects. However, limitations emerge with each model when scientists are looking for the best reproduction of the pathology in order to analyze very specific aspects or to screen new drugs/cosmetics for potential propensities to improve critical aspects of the diseased skin. This review first aims at summarizing features of AD that can be satisfactorily mimicked *in vitro* and then provides an update about several published *in vitro* models able to bring some useful information about AD pathology. It is, however, important to note that this review does not pretend itself to be exhaustive about published *in vitro* models of AD. It rather focuses on models developed to study epidermal characteristics of the disease. For each mentioned model, important results reported after the use of these models are described but information remains limited to key observations.

IN VITRO MODELS OF AD

Two-Dimensional Culture Systems

Cultures of a single cell type, either immune cells or keratinocytes, may be considered as the simplest *in vitro* models available for analysis of cellular phenomena involved etiological processes of epidermal inflammatory diseases. Of course, such models do not, however, take into account complex structures and interactions within tissues, but present the enormous advantage to allow precise evaluation of a specific cell response toward any given challenge.

Immune Cells

In order to understand parameters regulating roles and abundance of lymphocytes, mast cells, eosinophils, and other immune cell types in AD-patients skin, it can be of interest to study each cell type, one after the other, to characterize their reaction to different stimuli and environmental conditions. Immune cells implicated in the pathogenesis of AD can be isolated from peripheral blood of AD patients or normal subjects. For instance, purified lymphocytes can be studied *in vitro*, allowing thereby to analyze gene expression of surface receptors or investigating cell responses toward specialized cytokines or any other potentially regulating ligand. For example, it was observed using this type

of investigation that the frequency of lymphocytes expressing the TSLP receptor was correlated with severity of AD disease (63).

Mast cells can also be investigated *in vitro* after isolation and culture in serum-free methylcellulose media containing stem cell factor, IL-6, and IL-3. Initially, this type of study has been conducted in order to compare proliferation of mast cells isolated from donors with normal IgE serum levels, to those isolated from AD patients with high serum IgE levels. Both mast cell populations exhibited no highlighted difference in proliferation and similarly released histamine. Furthermore, significantly enhanced histamine release was observed for both types of mast cell donors treated with IL-4, suggesting that regulation of mast cell function rather happens through environmental stimulation by interleukins, than by genetic predisposition in the case of AD (64). Conversely, while the number of colonies made of mast cells was unchanged, eosinophils and basophils from AD donors did exhibit enhanced growth potentials (64).

Basophils or eosinophils, both recognized as actual effectors for allergic inflammation, have also been analyzed through *in vitro* techniques by other investigators. For instance, fibroblasts were investigated as monolayers in the presence of culture medium containing basophils or eosinophils. Such studies interestingly highlighted the requirement for direct intercellular contacts during interactions between basophils and fibroblasts, while soluble mediators were found able to mediate cross talk between eosinophils and fibroblasts. These types of interaction in presence of toll-like receptor 2 ligands (e.g., *Staphylococcus aureus*) could thus be considered responsible for secretion of pro-inflammatory cytokines, possibly participating thereby in inflammatory responses that are typically exacerbated during *Staphylococcus aureus* infections (65).

Keratinocyte Monolayer Cultures

Using culture of cell monolayers, some epidermal differentiation of keratinocytes can be achieved by either culture confluence (66) or increasing the calcium medium concentration (67), or by both. Such cultures are easily performed and remain very useful for studying simple basic molecular mechanisms. Incubation of either HaCaT cells (49) with IL-4 and IL-13 (10 ng/ml each cytokine) or primary human keratinocytes (20) with IL-4 and IL-13 (50 ng/ml each), two Th2 cytokines overexpressed in AD skin, have been performed to identify their effects on such cells. Indeed, during incubation with these cytokines, epidermal cells exhibit a notably reduced gene expression for FLG. Further, Omori-Miyake and colleagues demonstrated a downregulation of expression of keratin 1 and 10, desmoglein 1 and desmocollin-1 *via* STAT6-dependent mechanisms transduced *via* IL4RA. In addition, this type of analysis allows the demonstration for instance that silencing FLG expression using shRNA interference can simultaneously induce alterations in the amounts of synthesized cornified envelop-related proteins [expression of keratin 5, 10, and 14, IVL, and transglutaminase-1 is decreased, while the one of loricrin (LOR) is upregulated]. Interestingly, FLG silencing does also result in increased release of Th2 cytokines IL-4, IL-5, and IL-13, while production of IFN γ is decreased (68).

Mainly used to answer mostly basic questions regarding the biology of particular cell types, cultures of monolayers are broadly

investigated because they are easy to perform, allow simple analytical probing, and are thus efficient at providing results with potential significance. Such cultures of human keratinocytes have indeed brought methods to test new ideas, as well as data suggestive for explanation of still obscure phenomena. For instance, while trying to understand in monolayer cultures of keratinocytes how cell signaling produced by cholesterol depletion was affecting their phenotypes, transcriptomic homologies were found between such keratinocytes and keratinocytes analyzed inside AD lesions (69). In other words, a study dealing with plasma membrane lipid microdomains opened up questions about their potential relevance and/or relevance of consequences linked to their signaling properties in order to understand and investigate AD.

Still, epidermal keratinocytes isolated from AD patients can also be cultured and compared to cells of healthy donors. In such cultures of keratinocytes, the profile for chemokine production inside cells from non-lesional areas of AD patients can be compared to normal keratinocytes (70, 71). It was reported this way that keratinocytes from AD patients spontaneously express elevated levels of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (71). Keratinocytes from AD patients can further be used to evaluate how cytokines affect their phenotype. For example, IL-4, IFN- γ , and TNF- α were reported to trigger the production of other chemokines, like IL-8, C-C motif chemokine ligand 5, RANTES, or C-X-C motif chemokine ligand 10 in keratinocytes from non-lesional AD skin (70).

Although keratinocytes cultured as immersed monolayers are simple and useful research materials, they nonetheless do not stratify and neither produce an efficient barrier. Therefore, the development of epidermal *in vitro* models that produce a functional barrier has become crucial to screen treatments affecting this barrier in preclinical studies.

THREE-DIMENSIONAL SKIN MODELS

In order to achieve the production of an efficient epidermal barrier, keratinocytes have to be exposed at the air-liquid interface while being cultured in conditions that favor their stratification. Two models are nowadays commonly available for studies of epidermal properties, reconstructed human epidermis (RHE) and full-thickness human skin equivalents (HSE), both closely mimicking the *in vivo* characteristics of the human epidermis in terms of differentiation, barrier function, and histology (72–77). RHE are composed of keratinocytes only, grown at the air-liquid interface on inert polycarbonate filters. Conversely, HSE are based on dermal-like matrix initially organized before seeding growing keratinocytes on top for epidermal stratification and keratinization by exposure to air. The dermal-like matrix can either be based on de-epidermized dermis or on collagen matrices containing fibroblasts. Three different approaches can be used for this last purpose (78):

- (1) The gel approach consists in seeding fibroblasts in extracellular matrix (ECM) components such as collagen, the major element of the dermis.
- (2) Dermal substitutes can also be obtained by culturing fibroblasts on scaffolds made of synthetic or biological materials

(79). Collagen mimics many of the structural properties of the ECM and can be used as biological scaffold in which fibroblasts are then cultured. However, manufacturing a collagen scaffold having a precisely controlled 3D pore structure, which can be important for cell proliferation and migration, is not an easy task. Mechanical properties of scaffolds can be improved by using a cryogenic dispenser system (80) together with the use of cross-linking chemical agents like glutaraldehyde (81) or biological agents like chitosan that are then mixed with collagen (79).

- (3) Another possibility is to prepare dermal substitutes thanks to the capacity of fibroblasts to secrete their own ECM *in vitro*. After about 28 days of culture, fibroblasts are embedded into their own ECM and cell sheets, that can be manipulated, are obtained (79).

Both, RHE and HSE models, present advantages and disadvantages. Obviously, HSE mimics the epidermis as well as the dermal compartment. Further, as diffusion of lipophilic substances (e.g., lipid-based creams) is more efficient *in vivo* than *in vitro* in skin equivalents, adding a dermal-like compartment allows partial improvement *in vitro* (82). However, their production takes longer and is more complex. On the other hand, main advantages of RHE arise from the fact that they allow evaluation of keratinocyte-specific cell type response. In particular, amounts of molecules released or secreted by keratinocytes in culture medium can be measured using ELISA-like techniques.

Interestingly, *in vitro* models can be altered in ways that mimic AD conditions at the epidermal level, either by incubation with cocktails of interleukins overexpressed in the pathology or by silencing gene expression of components involved in development and structure of the barrier. Finally, keratinocytes, as well as other cells types isolated from AD patients, can also be used in models.

3-D Challenged Models

Several different cytokines sets have been chosen to create barrier alterations inside cutaneous *in vitro* models. Depending on the cytokines, cell regulations are activated in keratinocytes and demonstrate that this kind of treatments can be able to induce phenotypic features that recall epidermal lesions seen in AD lesions, like widening of intercellular spaces (spongiosis), alteration of expression and localization of differentiation markers, and/or modified lipid organization.

For instance, HSE generated on de-epidermized dermis were stimulated with IL-4 and IL-13 from day 10 until day 13 of reconstruction of the epidermis, using a concentration of 30 ng/ml for each interleukin (83). IL-4 and IL-13 are two Th2-type cytokines that exhibit elevated expression in AD lesional skin (20, 23). The treatment induced spongiosis, apoptosis, and increased expression of genes that become specifically expressed in AD epidermis, like carbonic anhydrase II (CA2) and neuron-specific Nel-like protein 2 (NELL2) (10, 84). Conversely, the treatment was unable to trigger the expression of psoriasis-associated genes, like human beta defensin 2 (hBD2) and elafin. Several other studies as well have investigated the epidermal consequences produced by incubation with these two Th2 interleukins, eventually

in combination with other inflammatory molecules. For example, IL-25 was added to IL-4 and IL-13 because this cytokine can act on both immune cells (85) and keratinocytes, where it can reduce expression of FLG (19), explaining thereby the systematic link observed between inflammation and barrier disruption in AD lesions (22, 86). Consequently, IL-4 and IL-13 (50 ng/ml each) were also combined with IL-25 (20 ng/ml) in a study performed on RHE model during 48 h (87). Interestingly, the epidermal consequences produced by these cytokines were enhanced when cholesterol was depleted from the plasma membrane of keratinocytes ahead of the interleukin treatment, suggesting that plasma membrane lipid microdomains disruption would render keratinocytes more sensitive to the Th2 interleukins. In such model, spongiosis and hypogranulosis were observed together with alterations in the expression of specific AD-markers [FLG, LOR, CA2, NELL2, TSLP and hyaluronic acid synthase 3 (HAS3)], as well as in barrier functions, as highlighted by transepithelial electrical resistance measurements and lucifer yellow permeation tests (87). In other studies, Th2 cytokines (IL-4 or IL-13 at 100 ng/ml each) combined with pro-inflammatory cytokines like TNF- α (20 ng/ml) or IL-1 α (100 ng/ml) for 48 h have been shown to act synergistically in order to induce production of TSLP in human skin explants (88). In a RHE model, IL-4, IL-13 (30 ng/ml each), and TNF- α (3.5 ng/ml) were further combined to IL-31 (15 ng/ml), a pruritus-related cytokine, and this cocktail induced AD-like features such as decreased expression of epidermal differentiation proteins like FLG and LOR, spongiosis, increased secretion of TSLP, and alterations of barrier properties that concern lipids (89). Indeed, lipid organization was affected as the treatment induced a decrease in the level of long chain free fatty acids and ester linked ω -hydroxy ceramides. Still in another study, IL-22 was combined to TNF- α , IL-4, and IL-13 and applied together as an “AD-mix” on RHE at day 10 of epidermis reconstruction for 48 h at a concentration of 3 ng/ml (90) in order to compare this set of interleukins with another “psoriasis-mix” set of interleukins containing IL-17, a psoriasis-related cytokine, instead of Th2 cytokines IL-4 and IL-13. Using the “AD-mix,” one can observe epidermal features of AD including decreased expression of FLG, small proline rich proteins (SPRR2A) and increased expression of IL-13RA2 (one of the IL-13 receptor subunit), together with a weak increase of S100 calcium-binding protein A7 expression. Whereas using the “psoriasis-mix,” lighter decrease in the expression of FLG is observed, together with a stronger increase of S100 calcium-binding protein A7 expression, and a weaker increase of SPRR2A and IL-13RA2 are reported.

Still another way to induce *in vitro* AD-like features in RHE was found while combining Poly I:C (10 μ g/ml), a toll-like receptor 3 ligand mimicking viral double-stranded RNA, with TNF- α (10 ng/ml), IL-4, and IL-13 (50 ng/ml each) at day 14 of epidermis reconstruction and for 48 h (91). In this case, spongiosis, alterations of differentiation markers, increase in TSLP expression and IL-8 secretion was observed in the RHE, while its transcriptomic profile was reminiscent of the one observed in AD keratinocytes.

In vivo, AD epidermis is bathed by a complex mixture of cytokines that can produce overlapping, redundant, additive, or even opposite effects. Indeed, IL-4, IL-13, IL-22, and IL-25 are all able to downregulate expression of differentiation markers such

as FLG (19, 22, 24, 86). Conversely, TNF- α exhibits only weak effects on the expression of keratinocyte differentiation markers. Nonetheless, TNF- α appears necessary, in combination with Th2 cytokines, in order to induce epidermal expression of TSLP. TSLP is released in response to a combination of different molecules like Th2 cytokines (IL-4 and -13) and pro-inflammatory cytokine (TNF α) or poly I:C combined to these cytokines. However, when present, IL-17 suppresses this upregulation (92). Regarding other opposite effects, both TNF- α and IL-22 induce expression of antimicrobial peptides such as hBD2, while Th2 cytokines IL-4 and IL-13 conversely decrease the levels of beta defensin 2 (93). Still more complicated, concentrations and timings of treatment with chosen cytokines seems to likely favor different types of tissue response. For now, the precise concentrations of these interleukins in skin of AD patients and in healthy skin are unknown yet. Thus, one must admit that currently available research data on *in vitro* models have been evaluated in regard of dose-dependent effects produced by those cytokines on the expression levels of proteins like FLG or TSLP inside the tissue.

Also interesting to mention, because pruritus is an important symptom of AD, other factors have been studied *in vitro* in order to better understand basic mechanisms regulating itch. An innervated skin model was set up for this purpose since increased innervation is another feature reported about AD skin (94, 95). Porcine dorsal root ganglia neurons were seeded in a collagen gel in top of which collagen gel comprising fibroblasts was added. Keratinocytes were then seeded on top of this scaffold in order to reconstruct an epidermis for 12 days at the air-liquid interface. That model has allowed to identify that neurons release a molecule called calcitonin gene-related peptide able to induce epidermal thickening (96). Besides increased innervation, elevated numbers of mast cells releasing histamine, among other molecules, are also part of AD skin. HSE cultured for 14 days were, therefore, incubated with histamine (10 μ M) for the whole duration of reconstruction or only during the three first days. Decreased expression of differentiation markers such as keratin 1 and 10, FLG, LOR, tight junction proteins, and desmosomal proteins was found, likely responsible for alterations in the epidermal barrier function (97).

To summarize, IL-4 and IL-13 seem to be the most crucial, probably unavoidable, cytokines which can induce an AD-like phenotype in epidermis, *in vitro*. However, variable interleukin cocktails can be added, together with other inflammatory molecules or neuropeptides, depending on research interests and on which target genes treatments or analysis are focused.

3-D Knockdown Models

In both lesional and non-lesional skin of AD patients, FLG expression is decreased, due to loss-of-function mutations, or irrespective of any particular FLG genotype (19, 21). Organotypic skin models containing knockdown of FLG in keratinocytes have been set up. Two studies have analyzed FLG knockdown in HSE by means of siRNAs (98, 99). Kuchler et al. (87) showed that FLG silencing performed in keratinocytes used to produce HSE grown at the air-liquid interface for 14 days, disturbed the development of the stratum corneum and also induced spongiosis. An increased susceptibility to irritating exposure, as well as

altered transepidermal absorption of testosterone, but not of caffeine, was also reported. Using siRNA as well but in HSE analyzed after 7 days of epidermis reconstitution, Mildner et al. (99) have described increased permeability of the epidermal barrier to the lucifer yellow dye, hypogranulosis, enhanced activation of caspase-3 after UVB irradiation, but no alteration of lipid composition or of keratinocyte differentiation in the knockdown tissue. While using an shRNA procedure to also suppress FLG expression in a RHE model grown for 11 days, Pendaries and collaborators (100) reported hypogranulosis and increased barrier permeability of the lucifer yellow dye, together with a reduced number of keratinocyte layers, reduced cornified layer thickness, and decreased levels of the NMF, potentially responsible for the increased UV sensitivity already reported by Kuchler and colleagues (98). However, unlike Mildner and co-workers (99), alterations were reported in the mRNA and protein expression of components deeply involved in the epidermal differentiation process (100). Indeed, filaggrin-2 (FLG2), LOR, caspase 14 and bleomycin hydrolase were altogether reported as reduced conversely to the increased expression of corneodesmosin (100). Knockdown of FLG using shRNA was also performed in HSE generated using N/TERT keratinocytes (101). In this model, no alteration is reported neither regarding epidermal morphology (keratin 10, LOR, and proliferation marker ki67 were analyzed), neither lipid composition nor epidermal permeability (butyl-PABA permeation studies were performed). The discrepancies reported by the different groups could probably be attributed to the fact that different targets/issues are analyzed, therefore, further analyses would be interesting regarding this domain. A summary of the different studies regarding FLG knockdown in 3D models is available in Niehues et al. (102).

Interestingly, FLG silencing by mean of siRNAs in skin equivalents, cultivated for 14 days at the air-liquid interface, has been shown to render HSE more sensitive to the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 (15 ng/ml of each when combined), increasing their effects on the model (93). These consequences include histological changes such as epidermal thickening and alterations in values of the superficial cutaneous pH measured. Furthermore, several effects induced by the deficiency in FLG expression, such as the upregulated expression of IVL or of occludin, were hampered by the addition of IL-4 and IL-13 (93).

Filaggrin-2 knockdown in RHE cultured for 11 days was also created by the use of shRNA production (103). Silencing FLG2 in keratinocytes of RHE led them to produce a thinner epidermis exhibiting parakeratosis, a compact cornified layer, and several alterations in the keratinocyte differentiation program including reduced processing of FLG, hornerin, corneodesmosin and reduced levels of caspase 14 and bleomycin hydrolase. A less acidic pH and an increased sensitivity to UVB was also attributed to FLG2 knockdown in RHE (103).

An alternative to the preparation of knockdown epidermal 3-D models has been developed by the use of keratinocytes that carry mutation(s) in genes of interest. Such methods avoid knockdown-derived off-target effects, but depend on availability of patient biopsies. For example, FLG-null keratinocytes can be obtained from ichthyosis vulgaris patients and be used to create pathological HSE that can be compared to healthy HSE (102). In

this case, no alteration in the expression of keratin 10, IVL and transglutaminase-1 differentiation markers was reported, whereas some decrease in occludin and claudin-4 expression could be observed at protein level, affecting tight junctions. Despite such a decrease, no alteration in the epidermal barrier function could be reported using lucifer yellow and biotin permeation assays. Such FLG-null HSE were further analyzed after incubation with IL-4 and IL-13 (50 ng/ml for each cytokine), a treatment which again produces alterations in the expression of several differentiation markers (102).

Finally, explants from healthy and non-lesional human AD skin, harboring or not FLG mutations, have been cultured on dermal equivalents (104). Expression profile for most proteins remains identical in culture to their counterpart established *in vivo*, regardless of the presence of FLG mutations. This kind of model has allowed assessing that FLG mutations neither alter expression of the kallikrein 5 protease involved in cutaneous desquamation or the expression of the lympho-epithelial Kazal type related protease inhibitor (LEKTI).

Skin Equivalents Using AD Cells

In order to understand potential cross talk between fibroblasts and keratinocytes in the context of AD, organotypic skin cultures consisting of fibroblasts derived from perilesional atopic skin and healthy keratinocytes, as well as healthy fibroblasts and atopic keratinocytes have generated for comparison with controls (105). That study demonstrated that atopic fibroblasts contribute to the particular pathological microenvironment of keratinocytes by releasing paracrine mediators which are responsible for hyperproliferation and reduced expression of differentiation markers in keratinocytes. Moreover, healthy fibroblasts have been shown able to rescue alterations in stratification and differentiation of keratinocytes as they are usually observed in AD epidermis. Interestingly, cocultures made of the two atopic cell types could not form any stratified epidermis in the model, the effects being partially dependent on expression of leukemia inhibitory factor by fibroblasts.

Skin Equivalents Containing Lymphocytes

Many cytokines are being produced by lymphocytes. Thus, in order to better mimic the *in vivo* situation, as well as in order to create a model that is adequate to test drugs or other actives which could target together the epidermal and immune compartments, cocultures of keratinocytes and lymphocytes have been developed. Two different organotypic skin equivalents have been developed using HaCaT cells cocultured with lymphocytes (106). For both procedures, HSE were prepared using dermal matrix containing fibroblasts. In the first case, the epidermal tissue was removed from its dermal matrix and then cocultured in the presence of activated T cells. In the other procedure described by Engelhart and his colleagues (94), the whole HSE was transferred onto a collagen matrix containing the lymphocytes, coated with cell-free collagen mixture that acts as an adhesive for the HSE. Using this integrated organotypic skin model, spongiosis, keratinocyte apoptosis, reduced expression of E-cadherin, expression of intercellular adhesion molecule-1, upregulation of neurotrophin-4, as well as elevated levels of pro-inflammatory

cytokines and chemokines were reported (94). In addition, this integrated epidermal model was used to show positive effects of anti-inflammatory drugs on the epidermal barrier through measurements of transepithelial electrical resistance.

Cross talk between T cells and keratinocytes has also been studied in a skin equivalent generated on de-epidermized dermis (107). In such model, CD4⁺ T cells were introduced between the transwell membrane and the dermal side of a fully developed skin equivalent. Th1 and Th17 polarization of the CD4⁺ T cells could be obtained and was able to induce psoriasis-like epidermal inflammation. However, induction of Th2 polarization of the CD4⁺ T cells was not successful, indicating that this model still requires refinements to adequately mimic features of AD.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Several and quite various options for *in vitro* human models have been chosen to allow studies of AD pathogenesis (Figure 2). Every option uses different rationales aimed at creating alterations in otherwise normal tissues. They were also chosen for their potentiality in evaluating preventive and/or therapeutic treatments. To date, published studies highlight the requirement for therapeutic strategies which can target restoration of a functional epidermal barrier or which can inhibit T cells from overproducing cytokines. They also suggest that therapeutic approaches which could more specifically block the action of a particular cytokine, or of its receptor, are based on highly relevant data.

Interestingly, in aforementioned coculture models (106, 107), authors have shown that drugs acting on inflammation, like dexamethasone, tacrolimus, or cyclosporine A, are able to suppress inflammatory cell infiltrates by inhibiting the cytokine production triggered by T cells present in the model. Such drugs were also tested on HSE previously treated with IL-4 and IL-13; however, in this case, no improvement in epidermal spongiosis and no reduction in the expression of CA2 and NELL2 could be observed, very likely because of the absence of immune cells in the model (83). Thus, other treatments more specifically targeting epidermal features should now be tested to appreciate the interest of immune-free models.

It is, however, important to keep in mind that these *in vitro* models represent a simplification of the *in vivo* situation as they remain models only and that it will probably never be possible to reproduce all human features of the pathology in such models. Furthermore, it is also worth to mention that different features observed in AD skin, at the histological level as well as at the molecular level, could refer to general inflammation or epidermal hyperplasia. It is, therefore, required to combine a panel of various readouts but in general, finding the “best” readouts in a biological or pathological model is never an easy task. Therefore, regarding AD, in order to help scientists to set up correct and efficient readouts, several studies have used keratinocytes derived from AD patients and compared them with cells from healthy, or even psoriatic, keratinocytes in order to identify specific transcriptomic or proteomic patterns (108–113). Another important issue to take into account about readouts is the type of model that is used. Indeed, cross talks between the different cell types of the model, like keratinocytes and fibroblasts, may influence

significantly the results. For example, fibroblasts in the dermal matrix can improve keratinocyte differentiation while sustaining epidermal viability (114). In addition, fibroblasts can also produce TSLP (35). Thus, when fibroblasts are included in the dermal matrix of HSE, a special attention must be paid to take this factor into account when assessing hypothesis and drawing conclusions. Furthermore, environmental stress conditions are known to play a role in the development of AD [for extensive review see Ref. (8)]. Intensive use of soap (4), proteases from house dust mites, exposure to pollutants and chemicals (4, 115), and psychological stress (116, 117) notably have been reported as risk factors able to play some role in the development of AD. It could be envisaged to add topically soap, detergents or house dust mites to *in vitro* models in order to mimic some environmental factors that could play a role in the development of AD. However, factors like psychological stress are less obvious to integrate into an *in vitro* model, also because underlying mechanisms are still incompletely understood.

Despite *in vitro* studies are performed on simplified models, they might nevertheless bring better understanding of a pathology, while trying to answer rather basic questions. As an example, a typical morphological feature of AD inside the epidermis is the appearance of intercellular spongiosis. Spongiosis is a well-known characteristic of this disease but is not yet fully understood. It is characterized by loss of cohesion between keratinocytes together with some influx apparently associated with an accumulation of hyaluronan (HA) (118, 119). HA is indeed reported as being increased in intercellular spaces of lesional AD epidermis *in vivo*, in simultaneity with an increased expression of the HA synthase HAS3 (119, 120). Interestingly, enhancement of HA synthesis and deposition in RHE is also simultaneous with treatment of the epidermis with Th2 cytokines, especially with IL-4 treatment performed after cholesterol depletion from keratinocyte plasma membrane (87, 121). Whether any relationship exists between epidermal regulations of HA concentration (120, 122) and spongiosis observed during AD would be interesting to investigate. Is the elevated HA concentration a cause, or a consequence of spongiosis? This question could be answered using *in vitro* models where HA could be withdrawn by mean of incubation with a hyaluronidase that degrades HA into small fragments, or by inhibiting epidermal HA synthesis, either pharmacologically or by means of siRNA or shRNA targeting the expression of HAS enzymes.

It would be important to further investigate implication of Th17 and Th22 cells in the context of AD as the classical paradigm of AD as a “Th2” disease has recently been challenged. Indeed, Th17 is mostly associated with psoriasis as it is more induced in psoriasis than in AD (123). However, Th17 cells have been demonstrated in AD and associated with severity of the disease (124, 125). IL-17 expression was found at higher levels in acute AD skin lesions than in chronic lesions or healthy skin, even if in a lesser extent compared with psoriasis lesions (123). Interestingly, IL-17 could also negatively regulate expression of FLG as well as of tight junction proteins ZO-1 and ZO-2, desmosomes, e-cadherin, and various integrins (25). IL-17 is a key inducer of expression of antimicrobial genes (123), potentially explaining why psoriasis patients are less frequently subjected

In vitro models of AD	2D models	Immune cells	Patient's cells	Lymphocytes	Tatsuno et al., (63)	
			Keratinocytes	Primary cells	Mast cells	Namura et al., (64)
				Co-culture	Fibroblasts & eosinophils/basophils	Namura et al., (64); Jiao et al., (65)
		Primary cells		IL-4 & IL-13	Omori-Miyake et al., (49)	
FLG shRNA	Dang et al., (68)					
3D models	Human Skin Equivalent (HSE)	Immortalised cells	Lipid microdomain disruption	Mathay et al., (69)		
			Patient's cells	IL-4 & IL-13	Howell et al., (20)	
		Challenged model	AD vs healthy	Giustizieri et al., (70); Pastore et al., (71)		
	AD non-lesional keratinocytes		Pastore et al., (71)			
Reconstructed Human epidermis (RHE)	Genetically modified models	Challenged model	IL-4 & IL-13	Kamsteeg et al., (83)		
		Genetically modified models	FLG knockdown	Kuchler et al., (98); Mildner et al., (99)		
			FLG knockdown	van Drangelen et al., (101)		
	Patient's cells	FLG knockdown ± IL-4 & IL-13 incubation	Hanzke et al., (93)			
		Ichthyosis vulgaris (FLG null) ± IL-4 & IL-13 incubation	Niehues et al., (102)			
	Co-cultures	Lymphocytes	HaCaT cells	Engelhart et al., (106)		
			Fibroblasts/keratinocytes	Berth et al., (105)		
		Atopic cells	Fibroblasts & keratinocytes in innervated model	Roggenkamp et al., (96)		
	Challenged model	Challenged model	IL-4, IL-13, TNFα & IL-31	Danso et al., (89)		
			IL-4, IL-13, TNFα & IL-22	Bernard et al., (90)		
IL-4, IL-13, TNFα & poly I:C			Rouaud-Tinguely et al., (91)			
Genetically modified models		IL-4, IL-13 & IL-25	De Vuyst et al., (87)			
		FLG knockdown	Pendaries et al., (100)			
		FLG2 knockdown	Pendaries et al., (103)			
		FLG2 knockdown	Pendaries et al., (103)			
Skin explants	Challenged model	IL-4 & IL-13	Bogiatzi et al., (88)			
		Patient's cells	AD cells ± FLG mutations	van Drangelen et al. (104)		

FIGURE 2 | Summary of published models developed for *in vitro* studies of atopic dermatitis (AD) features. Different types of *in vitro* models can be used in regards to the research focus, from the most simple ones consisting of only one cellular type (named here 2D models) to more complex models reconstituting the different layers of the epidermis (called here 3D models). 2D models are used in order to characterize behavior of one given cellular type whereas 3D models are more commonly used with the aim of trying to reproduce some features of the pathology. Within these two types of models, immortalized cells can be used, but in order to be closer to the *in vivo* situation, primary cells are often used. Cells derived directly from patients are probably the most relevant but also the more complicated to obtain and the most limited. While performing 3D models, two different types of models are commonly used: human skin equivalents (HSE) or reconstructed human epidermis (RHE). HSE reproduce the epidermis on top of a dermis equivalent, whereas RHE only reproduce the different layers of the epidermis. HSE are more complicated to produce but display the advantage to present a dermal compartment whereas RHE allow evaluation of keratinocyte-specific type of responses and analysis of released or secreted molecules in the culture medium. HSE or RHE can both be challenged by interleukin cocktails and genetically modified. And cocultures with immune cells could be performed in both cases.

to skin infections than AD patients. Regarding Th22 cells, these are also reported as increased in AD skin and correlated with disease severity (126). IL-22 would, in RHE, affect expression of FLG, induce epidermal hyperplasia, and upregulate expression of pro-inflammatory molecules belonging to the S100 family of calcium-binding proteins (127). Further interesting, IL-17 and IL-22 could act synergistically to regulate notably gene expression of AMPs (128) and *S. aureus*, that frequently affects AD patients, could induce production of Th17 cells (129). In summary, the understanding of the pathogenic mechanisms is still in progress and further research concerning this area is needed. Further, more data regarding comprehension of the transit from the acute to the chronic stage of the disease and *vice versa* would also be useful.

To conclude, several skin models can mimic *in vitro* the pathological situation of AD, especially at particular points of view. However, no model is currently able to entirely resume *in vitro* the overall characteristics of AD. Therefore, investigations on this disease have to take into account the balance between advantages and disadvantages of the multiple available models before choosing the most appropriate one(s) and before collecting data in relation with specifically targeted scientific issues.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EV, MS, CE, CR, and YP shared comments to construct the manuscript that was drafted by EV. All authors have read and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received support from the Région Wallonne (BAREPI, convention 1217660). Helpful discussions with Michel Simon (Toulouse, France), Tatiana Pedrosa do Nascimento (Sao Paulo, Brazil), and Abdallah Mound,

Séverine Giltaire and Jérémy Malaisse (University of Namur) are gracefully acknowledged.

FUNDING

Financial support was provided by FRFC 2.4.522.10F grant to YP.

REFERENCES

- Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* (2010) 22(2):125–37. doi:10.5021/ad.2010.22.2.125
- Mihm MC Jr, Soter NA, Dvorak HF, Austen KF. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* (1976) 67(3):305–12. doi:10.1111/1523-1747.ep12514346
- Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* (2011) 242(1):233–46. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01027.x
- Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* (2009) 129(8):1892–908. doi:10.1038/jid.2009.133
- Kabashima K. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J Dermatol Sci* (2013) 70(1):3–11. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.02.001
- Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene–environment interactions. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 118(1):3–21. doi:10.1016/j.jaci.2006.04.042
- Lee YL, Li CW, Sung FC, Yu HS, Sheu HM, Guo YL. Environmental factors, parental atopy and atopic eczema in primary-school children: a cross-sectional study in Taiwan. *Br J Dermatol* (2007) 157(6):1217–24. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08215.x
- Kantor R, Silverberg JI. Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol* (2017) 13(1):15–26. doi:10.1080/1744666X.2016.1212660
- Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerschner T, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 118(4):866–71. doi:10.1016/j.jaci.2006.07.026
- Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol* (2003) 112(6):1195–202. doi:10.1016/j.jaci.2003.08.049
- Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* (2006) 38(4):441–6. doi:10.1038/ng1767
- Akiyama M. FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics. *Br J Dermatol* (2010) 162(3):472–7. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09582.x
- Hubiche T, Ged C, Benard A, Leaute-Labreze C, McElreavey K, de Verneuil H, et al. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm Venereol* (2007) 87(6):499–505. doi:10.2340/00015555-0329
- Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, et al. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet* (2007) 39(5):650–4. doi:10.1038/ng2020
- Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* (2008) 180(3):451–8. doi:10.1083/jcb.200709098
- Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* (2013) 1833(12):3471–80. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.010
- Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol* (2013) 93(3):261–7. doi:10.2340/00015555-1531
- Jakasa I, Koster ES, Calkoen F, McLean WH, Campbell LE, Bos JD, et al. Skin barrier function in healthy subjects and patients with atopic dermatitis in relation to filaggrin loss-of-function mutations. *J Invest Dermatol* (2011) 131(2):540–2. doi:10.1038/jid.2010.307
- Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Mechin MC, et al. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 131(4):1094–102. doi:10.1016/j.jaci.2012.12.1566
- Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 124(3 Suppl 2):R7–12. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.012
- Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134(4):792–9. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.014
- Hvid M, Vestergaard C, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Deleuran M. IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? *J Invest Dermatol* (2011) 131(1):150–7. doi:10.1038/jid.2010.277
- Tazawa T, Sugiura H, Sugiura Y, Uehara M. Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* (2004) 295(11):459–64. doi:10.1007/s00403-004-0455-6
- Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Taylor S, Ogg GS. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. *Br J Dermatol* (2011) 165(3):492–8. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10400.x
- Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, et al. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol* (2012) 21(2):104–10. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01412.x
- Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K, Wenzel J, Frank J, Luscher-Firzloff J, et al. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129(2):426–33. doi:10.1016/j.jaci.2011.10.042
- Spergel JM. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children. *Immunol Allergy Clin North Am* (2010) 30(3):269–80. doi:10.1016/j.ia.2010.06.003
- Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* (2011) 3(2):67–73. doi:10.4168/air.2011.3.2.67
- van der Hulst AE, Klip H, Brand PL. Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* (2007) 120(3):565–9. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.042
- He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci* (2010) 1183:13–24. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05128.x
- Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potentially activates mast cells. *J Exp Med* (2007) 204(2):253–8. doi:10.1084/jem.20062211
- Angelova-Fischer I, Fernandez IM, Donnadiu MH, Bullone-Paus S, Zillikens D, Fischer TW, et al. Injury to the stratum corneum induces in vivo expression of human thymic stromal lymphopoietin in the epidermis. *J Invest Dermatol* (2010) 130(10):2505–7. doi:10.1038/jid.2010.143
- Le TA, Takai T, Vu AT, Kinoshita H, Chen X, Ikeda S, et al. Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via toll-like receptor 5. *Int Arch Allergy Immunol* (2011) 155(1):31–7. doi:10.1159/000318679
- Vu AT, Baba T, Chen X, Le TA, Kinoshita H, Xie Y, et al. *Staphylococcus aureus* membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the toll-like receptor 2-toll-like receptor 6 pathway. *J Allergy Clin Immunol* (2010) 126(5):985–93. doi:10.1016/j.jaci.2010.09.002

35. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* (2002) 3(7):673–80. doi:10.1038/ni805
36. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol* (2009) 7(5):e1000067. doi:10.1371/journal.pbio.1000067
37. Zhu Z, Oh MH, Yu J, Liu YJ, Zheng T. The role of TSLP in IL-13-induced atopic march. *Sci Rep* (2011) 1:23. doi:10.1038/srep00023
38. Leyva-Castillo JM, Hener P, Jiang H, Li M. TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. *J Invest Dermatol* (2013) 133(1):154–63. doi:10.1038/jid.2012.239
39. Mou Z, Xia J, Tan Y, Wang X, Zhang Y, Zhou B, et al. Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol* (2009) 129(3):297–301. doi:10.1080/00016480802225884
40. Zhang Z, Hener P, Frossard N, Kato S, Metzger D, Li M, et al. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(5):1536–41. doi:10.1073/pnas.0812668106
41. Ziegler SE. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130(4):845–52. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.010
42. Wilson SR, The L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell* (2013) 155(2):285–95. doi:10.1016/j.cell.2013.08.057
43. Kitajima M, Lee HC, Nakayama T, Ziegler SE. TSLP enhances the function of helper type 2 cells. *Eur J Immunol* (2011) 41(7):1862–71. doi:10.1002/eji.201041195
44. Omori M, Ziegler S. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* (2007) 178(3):1396–404. doi:10.4049/jimmunol.178.3.1396
45. Rochman I, Watanabe N, Arima K, Liu YJ, Leonard WJ. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells. *J Immunol* (2007) 178(11):6720–4. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6720
46. Jariwala SP, Abrams E, Benson A, Fodeman J, Zheng T. The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* (2011) 41(11):1515–20. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03797.x
47. Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* (2006) 203(2):269–73. doi:10.1084/jem.20051745
48. Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* (2015) 45(3):566–74. doi:10.1111/cea.12495
49. Omori-Miyake M, Yamashita M, Tsunemi Y, Kawashima M, Yagi J. In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans. *J Invest Dermatol* (2014) 134(5):1342–50. doi:10.1038/jid.2013.503
50. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* (2008) 126(3):332–7. doi:10.1016/j.clim.2007.11.006
51. Kobayashi J, Inai T, Morita K, Moroi Y, Urabe K, Shibata Y, et al. Reciprocal regulation of permeability through a cultured keratinocyte sheet by IFN-gamma and IL-4. *Cytokine* (2004) 28(4–5):186–9. doi:10.1016/j.cyt.2004.08.003
52. Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K. Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* (2005) 124(4):786–92. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23651.x
53. Gruber R, Bornchen C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T, Wladykowski E, et al. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol* (2015) 185(10):2777–89. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.021
54. Ziegler SE, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol* (2010) 11(4):289–93. doi:10.1038/ni.1852
55. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* (2004) 113(5):651–7. doi:10.1172/JCI21060
56. Izuwara K, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Suzuki S. The roles of Th2-type cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Atopic Dermatitis Dis Etiol Clin Manag* (2012):39–50. doi:10.5772/28779
57. Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J Clin Cell Immunol* (2011) 2(3):110. doi:10.4172/2155-9899.1000110
58. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130(6):1344–54. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.012
59. Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2012) 26(8):1045–60. doi:10.1111/j.1468-3083.2012.04635.x
60. Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* (2009) 129(1):31–40. doi:10.1038/jid.2008.106
61. Wagner EF, Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E. Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* (2010) 6(12):704–14. doi:10.1038/nrrheum.2010.157
62. Pasparkis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* (2014) 14(5):289–301. doi:10.1038/nri3646
63. Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Waki M, Tokura Y. TSLP directly interacts with skin-homing Th2 cells highly expressing its receptor to enhance IL-4 production in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* (2015) 135(12):3017–24. doi:10.1038/jid.2015.318
64. Nomura I, Katsunuma T, Matsumoto K, Iida M, Tomita H, Tomikawa M, et al. Human mast cell progenitors in peripheral blood from atopic subjects with high IgE levels. *Clin Exp Allergy* (2001) 31(9):1424–31. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01181.x
65. Jiao D, Wong CK, Qiu HN, Dong J, Cai Z, Chu M, et al. NOD2 and TLR2 ligands trigger the activation of basophils and eosinophils by interacting with dermal fibroblasts in atopic dermatitis-like skin inflammation. *Cell Mol Immunol* (2016) 13(4):535–50. doi:10.1038/cmi.2015.77
66. Poumay Y, Pittelkow MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* (1995) 104(2):271–6. doi:10.1111/1523-1747.ep12612810
67. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* (1983) 81(1 Suppl):33s–40s. doi:10.1111/1523-1747.ep12540422
68. Dang NN, Pang SG, Song HY, An LG, Ma XL. Filaggrin silencing by shRNA directly impairs the skin barrier function of normal human epidermal keratinocytes and then induces an immune response. *Braz J Med Biol Res* (2015) 48(1):39–45. doi:10.1590/1414-431X20144047
69. Mathay C, Pierre M, Pittelkow MR, Depiereux E, Nikkels AF, Colige A, et al. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol* (2011) 131(1):46–58. doi:10.1038/jid.2010.272
70. Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pita O, Chinni LM, Giannetti A, et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* (2001) 107(5):871–7. doi:10.1067/mai.2001.114707
71. Pastore S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest* (1997) 99(12):3009–17. doi:10.1172/JCI119496
72. De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, De Glas V, de Rouvroit CL, Poumay Y. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol* (2014) 1195:191–201. doi:10.1007/7651_2013_40
73. Frankart A, Malaise J, De Vuyst E, Minner F, de Rouvroit CL, Poumay Y. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol* (2012) 21(11):871–5. doi:10.1111/exd.12020
74. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Herin M, Coquette A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in vitro studies. *Arch Dermatol Res* (2004) 296(5):203–11. doi:10.1007/s00403-004-0507-y
75. El Ghalbzouri A, Siamari R, Willemze R, Ponc M. Leiden reconstructed human epidermal model as a tool for the evaluation of the skin corrosion and irritation potential according to the ECVAM guidelines. *Toxicol In Vitro* (2008) 22(5):1311–20. doi:10.1016/j.tiv.2008.03.012

76. Nolte CJ, Oleson MA, Bilbo PR, Parenteau NL. Development of a stratum corneum and barrier function in an organotypic skin culture. *Arch Dermatol Res* (1993) 285(8):466–74. doi:10.1007/BF00376819
77. Eckl KM, Alef T, Torres S, Hennies HC. Full-thickness human skin models for congenital ichthyosis and related keratinization disorders. *J Invest Dermatol* (2011) 131(9):1938–42. doi:10.1038/jid.2011.126
78. Auger FA, Berthod F, Moulin V, Pouliot R, Germain L. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol Appl Biochem* (2004) 39(Pt 3):263–75. doi:10.1042/BA20030229
79. Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur J Dermatol* (2009) 19(2):107–13. doi:10.1684/ejd.2008.0573
80. Ahn S, Yoon H, Kim G, Kim Y, Lee S, Chun W. Designed three-dimensional collagen scaffolds for skin tissue regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* (2010) 16(5):813–20. doi:10.1089/ten.tec.2009.0511
81. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* (2003) 24(26):4833–41. doi:10.1016/S0142-9612(03)00374-0
82. Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* (2001) 215(1–2):51–6. doi:10.1016/S0378-5173(00)00665-7
83. Kamsteeg M, Bergers M, de Boer R, Zeeuwen PL, Hato SV, Schalkwijk J, et al. Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. *Am J Pathol* (2011) 178(5):2091–9. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.037
84. Kamsteeg M, Jansen PA, van Vlijmen-Willems IM, van Erp PE, Rodijk-Olthuis D, van der Valk PG, et al. Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. *Br J Dermatol* (2010) 162(3):568–78. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09547.x
85. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* (2007) 204(8):1837–47. doi:10.1084/jem.20070406
86. Deleuran M, Hvid M, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Vestergaard C. IL-25 induces both inflammation and skin barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy* (2012) 96:45–9. doi:10.1159/000331871
87. De Vuyst E, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Malaisse J, Mound A, Bourtembourg M, et al. M β CD concurs with IL-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol* (2016). doi:10.1111/exd.13113
88. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, Marloie-Provost MA, Volpe E, Sastre X, et al. Cutting edge: proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* (2007) 178(6):3373–7. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3373
89. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, et al. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J Invest Dermatol* (2014) 134(7):1941–50. doi:10.1038/jid.2014.83
90. Bernard FX, Morel F, Camus M, Pedretti N, Barrault C, Garnier J, et al. Keratinocytes under fire of proinflammatory cytokines: bona fide innate immune cells involved in the physiopathology of chronic atopic dermatitis and psoriasis. *J Allergy (Cairo)* (2012) 2012:718725. doi:10.1155/2012/718725
91. Rouaud-Tinguely P, Boudier D, Marchand L, Barruche V, Bordes S, Coppin H, et al. From the morphological to the transcriptomic characterization of a compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis. *Br J Dermatol* (2015) 173(4):1006–14. doi:10.1111/bjd.14012
92. Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, et al. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 123(1):179–86. doi:10.1016/j.jaci.2008.10.008
93. Honzke S, Wallmeyer L, Ostrowski A, Radbruch M, Mundhenk L, Schafer-Korting M, et al. Influence of Th2 cytokines on the cornified envelope, tight junction proteins, and β -defensins in filaggrin-deficient skin equivalents. *J Invest Dermatol* (2016) 136(3):631–9. doi:10.1016/j.jid.2015.11.007
94. Tobin D, Nabarro G, Baart de la Faille H, van Vloten WA, van der Putte SC, Schuurman HJ. Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (1992) 90(4 Pt 1):613–22. doi:10.1016/0091-6749(92)90134-N
95. Urashima R, Mihara M. Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch* (1998) 432(4):363–70. doi:10.1007/s004280050179
96. Roggenkamp D, Kopnick S, Stab F, Wenck H, Schmelz M, Neufang G. Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model. *J Invest Dermatol* (2013) 133(6):1620–8. doi:10.1038/jid.2012.464
97. Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, Gruber F, Eckhart L, Werfel T, et al. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy* (2013) 68(1):37–47. doi:10.1111/all.12051
98. Kuchler S, Henkes D, Eckl KM, Ackermann K, Plendl J, Korting HC, et al. Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Altern Lab Anim* (2011) 39(5):471–80.
99. Mildner M, Jin J, Eckhart L, Kezic S, Gruber F, Barresi C, et al. Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J Invest Dermatol* (2010) 130(9):2286–94. doi:10.1038/jid.2010.115
100. Pendaries V, Malaisse J, Pellerin L, Le Lamer M, Nachat R, Kezic S, et al. Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* (2014) 134(12):2938–46. doi:10.1038/jid.2014.259
101. van Drongelen V, Alloul-Ramdhani M, Danso MO, Mieremet A, Mulder A, van Smeden J, et al. Knock-down of filaggrin does not affect lipid organization and composition in stratum corneum of reconstructed human skin equivalents. *Exp Dermatol* (2013) 22(12):807–12. doi:10.1111/exd.12271
102. Niehues H, Schalkwijk J, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, van Rossum MM, Wladykowski E, et al. Epidermal equivalents of filaggrin null keratinocytes do not show impaired skin barrier function. *J Allergy Clin Immunol* (2017) 139(6):1979–81. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.016
103. Pendaries V, Le Lamer M, Cau L, Hansmann B, Malaisse J, Kezic S, et al. In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification. *Cell Death Dis* (2015) 6:e1656. doi:10.1038/cddis.2015.29
104. van Drongelen V, Danso MO, Out JJ, Mulder A, Lavrijsen AP, Bouwstra JA, et al. Explant cultures of atopic dermatitis biopsies maintain their epidermal characteristics in vitro. *Cell Tissue Res* (2015) 361(3):789–97. doi:10.1007/s00441-015-2162-3
105. Berroth A, Kuhl J, Kurschat N, Schwarz A, Stab F, Schwarz T, et al. Role of fibroblasts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 131(6):1547–54. doi:10.1016/j.jaci.2013.02.029
106. Engelhart K, El Hindi T, Biesalski HK, Pfitzner I. In vitro reproduction of clinical hallmarks of eczematous dermatitis in organotypic skin models. *Arch Dermatol Res* (2005) 297(1):1–9. doi:10.1007/s00403-005-0575-7
107. van den Bogaard EH, Tjabringa GS, Joosten I, Vonk-Bergers M, van Rijssen E, Tijssen HJ, et al. Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* (2013) 134(3):719–27. doi:10.1038/jid.2013.417
108. Park YD, Jang HS, Kim SY, Ko SK, Lyou YJ, Lee DY, et al. Two-dimensional electrophoretic profiling of atopic dermatitis in primary cultured keratinocytes from patients. *Proteomics* (2006) 6(4):1362–70. doi:10.1002/pmic.200500277
109. Plager DA, Leontovich AA, Henke SA, Davis MD, McEvoy MT, Sciallis GF II, et al. Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp Dermatol* (2007) 16(1):28–36. doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00504.x
110. Saaf AM, Tengvall-Linder M, Chang HY, Adler AS, Wahlgren CF, Scheynius A, et al. Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes. *PLoS One* (2008) 3(12):e4017. doi:10.1371/journal.pone.0004017
111. Lu ZR, Park D, Lee KA, Ryu JW, Bhak J, Shi L, et al. Profiling the dysregulated genes of keratinocytes in atopic dermatitis patients: cDNA microarray and

- interactomic analyses. *J Dermatol Sci* (2009) 54(2):126–9. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.12.006
112. Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, et al. Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol* (2005) 152(1):146–9. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06352.x
 113. Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Chiricozzi A, Nogales KE, Shemer A, Fuentes-Duculan J, et al. Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 124(6):1235–44.e58. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.031
 114. Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, Fusenig NE, Boukamp P, Stark HJ. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol* (2007) 86(11–12):731–46. doi:10.1016/j.ejcb.2006.12.005
 115. Wang J, Hsieh WS, Wu KY, Guo YL, Hwang YH, Jee SH, et al. Effect of gestational smoke exposure on atopic dermatitis in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol* (2008) 19(7):580–6. doi:10.1111/j.1399-3038.2008.00759.x
 116. Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, Ding W, Granstein RD. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* (2001) 117(2):309–17. doi:10.1046/j.1523-1747.2001.01373.x
 117. Hall JM, Crusier D, Podawiltz A, Mummert DI, Jones H, Mummert ME. Psychological stress and the cutaneous immune response: roles of the HPA axis and the sympathetic nervous system in atopic dermatitis and psoriasis. *Dermatol Res Pract* (2012) 2012:403908. doi:10.1155/2012/403908
 118. Barnes L, Carraux P, Saurat JH, Kaya G. Increased expression of CD44 and hyaluronate synthase 3 is associated with accumulation of hyaluronate in spongiotic epidermis. *J Invest Dermatol* (2012) 132(3 Pt 1):736–8. doi:10.1038/jid.2011.384
 119. Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, et al. Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol* (2009) 129(6):1412–20. doi:10.1038/jid.2008.394
 120. Malaise J, Bourguignon V, De Vuyst E, Lambert de Rouvroit C, Nikkels AF, Flamion B, et al. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol* (2014) 134(8):2174–82. doi:10.1038/jid.2014.147
 121. do Nascimento Pedrosa T, De Vuyst E, Mound A, Lambert de Rouvroit C, Maria-Engler SS, Poumay Y. Methyl-beta-cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model. *Arch Dermatol Res* (2017) 309(1):63–9. doi:10.1007/s00403-016-1699-7
 122. Malaise J, Pendaries V, Hontoir F, De Glas V, Van Vlaender D, Simon M, et al. Hyaluronan does not regulate human epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *J Biol Chem* (2016) 291(12):6347–58. doi:10.1074/jbc.M115.661348
 123. Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Zaba LC, Cardinale I, Nogales KE, et al. Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *J Immunol* (2008) 181(10):7420–7. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7420
 124. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* (2008) 128(11):2625–30. doi:10.1038/jid.2008.111
 125. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? *J Invest Dermatol* (2008) 128(11):2569–71. doi:10.1038/jid.2008.283
 126. Nogales KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 123(6):1244–52.e2. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.041
 127. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* (2005) 174(6):3695–702. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3695
 128. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* (2006) 203(10):2271–9. doi:10.1084/jem.20061308
 129. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* (2012) 484(7395):514–8. doi:10.1038/nature10957

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 De Vuyst, Salmon, Evrard, Lambert de Rouvroit and Poumay. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

204

IL-2R γ /IL-4R α receptor induced in keratinocytes by interleukins 4 and 13 in atopic dermatitis can alter the epidermal barrier

A Progneaux¹, C Evrard¹, R Drouet¹, V García-González², C Lambert de Rouvroit¹ and Y Poumay¹ ¹URPHYM-Narilis, University of Namur, Namur, Belgium and ²Almirall S.A., Barcelona, Spain

Interleukins (IL)-4 and IL-13, released in atopic dermatitis (AD), activate the IL-4R α /IL-13R α 1 receptor, modifying the epidermal phenotype and barrier. In addition, IL-4 is able to activate the IL-2R γ /IL-4R α receptor normally expressed only by hematopoietic cells. However, a microarray analysis reported expression of IL-2R γ by keratinocytes in reconstructed human epidermis (RHE) exposed to IL-4, IL-13 and IL-25. This study investigated occurrence/function of IL-2R γ /IL-4R α receptor in keratinocytes and its potential involvement in AD pathophysiology. IL-2R γ mRNA is indeed detected in lesional AD biopsies using *in situ* hybridization. *In vitro*, exposure of RHE to IL-4 and IL-13 induces expression of IL2R γ at the mRNA level, both in RHE made of primary keratinocytes or reconstructed using immortalised N/TERT keratinocytes. Located on chromosome X, *IL13RA1* and *IL2RG* genes have been individually inactivated using CRISPR/Cas9 in N/TERT cells to generate deficient RHE. Characterization of *IL13RA1*⁻⁰ RHE indicates that IL-4R α /IL-13R α 1 receptor activation is required to induce IL-2R γ expression. On the other hand, *IL2RG*⁻⁰ RHE were analysed to investigate IL-2R γ potential function in keratinocytes. Reduced transepithelial electrical resistance is typical of RHE exposed to IL-4 and IL-13, revealing altered epidermal barrier. This susceptibility appears absent from *IL2RG*⁻⁰ RHE, suggesting involvement of IL-2R γ /IL-4R α to alter the epidermal barrier.



137

Filaggrin knock-out in keratinocytes indicates a functional role in skin barrier formation

JP Smits¹, N van den Brink¹, L Meesters^{1,2}, IM van Vlijmen-Willems¹, C Evrard³, Y Poumay³, M van Geel^{4,5,6}, W Hendriks⁷, PL Zeeuwen¹ and EH van den Bogaard¹ ¹Dermatology, Radboudumc, Nijmegen, Netherlands, ²Molecular Developmental Biology, RIMLS, Nijmegen, Netherlands, ³Research Unit for Molecular Physiology, NARALIS, Namur, Belgium, ⁴Dermatology, Maastricht UMC, Maastricht, Netherlands, ⁵GROW School for Oncology and Developmental Biology, Maastricht UMC, Maastricht, Netherlands, ⁶Clinical Genetics, Maastricht UMC, Maastricht, Netherlands and ⁷Cell Biology, RIMLS, Nijmegen, Netherlands

Skin barrier function is the result of orchestrated terminal differentiation of keratinocytes, forming the lipid-surrounded hydrophobic cornified envelope of the stratum corneum. CRISPR-Cas9 has the potential to meticulously dissect the functional and structural components of the stratum corneum by precisely editing any gene of interest. We here illustrate the complementary possibilities of introducing CRISPR-Cas9 machinery in immortalized N/TERT keratinocytes to generate Filaggrin knockout (Δ FLG) isogenic cell lines and organotypic human Δ FLG epidermal equivalents (Δ FLG-HEE). FLG deficiency was accompanied by (partial) loss of other structural and functional proteins, such as involucrin, hornerin, and transglutaminases. Consequently, transepithelial electrical resistance (TEER) indicated a decreased barrier function in Δ FLG-HEEs. Homology directed repair of the Δ FLG clonal lines reinstated FLG protein expression and the concomitant expression of the aforementioned epidermal differentiation proteins in FLG-restored HEEs. The phenotypical consequences of FLG deficiency in cell lines with an identical genetic background and in absence of predicted CRISPR-Cas9 off-target effects indicate a functional role for FLG – not only in epidermal barrier function – but also in epidermal barrier development which provides new insights into the disease pathogenesis of atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris.



REFERENCES

Abbadi A, Lauer M, Swaidani S, Wang A, Hascall V. Hyaluronan Rafts on Airway Epithelial Cells. *J Biol Chem* 2016;291(3):1448-55.

Akinduro O, Sully K, Patel A, Robinson DJ, Chikh A, McPhail G, et al. Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol* 2016;136(7):1460-70.

Alloul-Ramdhani M, Tensen CP, El Ghalbzouri A. Performance of the N/TERT epidermal model for skin sensitizer identification via Nrf2-Keap1-ARE pathway activation. *Toxicol In Vitro* 2014;28(5):982-9.

Asparuhova MB, Kiryak D, Eliezer M, Mihov D, Sculean A. Activity of two hyaluronan preparations on primary human oral fibroblasts. *J Periodontal Res* 2019;54(1):33-45.

Balato A, Cacciapuoti S, Di Caprio R, Marasca C, Masara A, Raimondo A, et al. Human Microbiome: Composition and Role in Inflammatory Skin Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2019;67(1):1-18.

Baranova NS, Foulcer SJ, Briggs DC, Tilakaratna V, Enghild JJ, Milner CM, et al. Inter-alpha-inhibitor impairs TSG-6-induced hyaluronan cross-linking. *J Biol Chem* 2013;288(41):29642-53.

Baranova NS, Nileback E, Haller FM, Briggs DC, Svedhem S, Day AJ, et al. The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers. *J Biol Chem* 2011;286(29):25675-86.

Bardos T, Kamath R, Mikecz K, Glant T. Anti-Inflammatory and Chondroprotective Effect of TSG-6 (Tumor Necrosis Factor- α -Stimulated Gene-6) in Murine Models of Experimental Arthritis. *American Journal of Pathology* 2001;159(5):1711-21.

Barnes L, Carraux P, Saurat JH, Kaya G. Increased expression of CD44 and hyaluronate synthase 3 is associated with accumulation of hyaluronate in spongiotic epidermis. *J Invest Dermatol* 2012;132(3 Pt 1):736-8.

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 2012;30(3):257-62.

Basler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 2016;242:105-18.

Bitencourt TA, Rezende CP, Quaresimin NR, Moreno P, Hatanaka O, Rossi A, et al. Extracellular Vesicles From the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. *Frontiers in Immunology* 2018;9.

Bitschar K, Staudenmaier L, Klink L, Focken J, Sauer B, Fehrenbacher B, et al. *Staphylococcus aureus* Skin Colonization Is Enhanced by the Interaction of Neutrophil Extracellular Traps with Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2020;140(5):1054-65 e4.

Blundell CD, Mahoney DJ, Almond A, DeAngelis PL, Kahmann JD, Teriete P, et al. The link module from ovulation- and inflammation-associated protein TSG-6 changes conformation on hyaluronan binding. *J Biol Chem* 2003;278(49):49261-70.

Bochner R, Samuelov L, Sarig O, Li Q, Adase CA, Isakov O, et al. Calpain 12 Function Revealed through the Study of an Atypical Case of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. *J Invest Dermatol* 2017;137(2):385-93.

Bocian C, Urbanowitz AK, Owens RT, Iozzo RV, Gotte M, Seidler DG. Decorin potentiates interferon-gamma activity in a model of allergic inflammation. *J Biol Chem* 2013;288(18):12699-711.

Boelsma E, Verhoeven MC, Ponc M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *J Invest Dermatol* 1999;112(4):489-98.

Bogdani M, Johnson PY, Potter-Perigo S, Nagy N, Day AJ, Bollyky PL, et al. Hyaluronan and hyaluronan-binding proteins accumulate in both human type 1 diabetic islets and lymphoid tissues and associate with inflammatory cells in insulinitis. *Diabetes* 2014;63(8):2727-43.

Boonen M, Puissant E, Gilis F, Flamion B, Jadot M. Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;446(4):1155-60.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106(3):761-71.

Boulais N, Misery L. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(1):147-65.

Bourguignon LY. Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions. *Am J Pathol* 2014;184(7):1912-9.

Bourguignon LY, Gilad E, Peyrollier K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem* 2007;282(27):19426-41.

Bourguignon LY, Ramez M, Gilad E, Singleton PA, Man MQ, Crumrine DA, et al. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2006;126(6):1356-65.

Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F. Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-gamma promotes phospholipase Cgamma1 activation, Ca(2+) signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J Biol Chem* 2004;279(28):29654-69.

Bourguignon V, Flamion B. Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover. *FASEB J* 2016;30(6):2108-14.

Brasch J, Morig A, Neumann B, Proksch E. Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in tinea and pityriasis versicolor. *Mycoses* 2014;57(3):147-52.

Breuer K, Kapp A, Werfel T. Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy* 2001;56:1034-41.

Briggaman RA, Wheeler CE. The Epidermal-Dermal Junction. *Journal of Investigative Dermatology* 1975;65(1):71-84.

Brogden NK, Mehalick L, Fischer CL, Wertz PW, Brogden KA. The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation. *Skin Pharmacol Physiol* 2012;25(4):167-81.

Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J Comp Physiol B* 2008;178(4):439-45.

Burton N, De Glas V, Kirschvink N, Poumay Y. Elaboration of reconstructed sheep epidermis. Abstract ESDR 2019.

Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(3):143-55.

Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *Journal of Clinical Investigation* 2000;106(3):349-60.

Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(4):328-40.

Cao TV, La M, Getting SJ, Day AJ, Perretti M. Inhibitory effects of TSG-6 Link module on leukocyte-endothelial cell interactions in vitro and in vivo. *Microcirculation* 2004;11(7):615-24.

Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* 2020;160(2):116-25.

Chen J, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Perspective article* 1999;7(2).

Chen Y, Liu X, Zhang Y, Wang H, Ying H, Liu M, et al. A Self-restricted CRISPR System to Reduce Off-target Effects. *Mol Ther* 2016;24(9):1508-10.

Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* 2011;118(2):330-8.

Chowdhury B, Hemming R, Hombach-Klonisch S, Flamion B, Triggs-Raine B. Murine hyaluronidase 2 deficiency results in extracellular hyaluronan accumulation and severe cardiopulmonary dysfunction. *J Biol Chem* 2013;288(1):520-8.

Clausen ML, Agner T. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. *Curr Probl Dermatol* 2016;49:38-46.

Colombaro V, Jadot I, Decleves AE, Voisin V, Giordano L, Habsch I, et al. Hyaluronidase 1 and hyaluronidase 2 are required for renal hyaluronan turnover. *Acta Histochem* 2015a;117(1):83-91.

Colombaro V, Jadot I, Decleves AE, Voisin V, Giordano L, Habsch I, et al. Lack of hyaluronidases exacerbates renal post-ischemic injury, inflammation, and fibrosis. *Kidney Int* 2015b;88(1):61-71.

Costanzo A, Fausti F, Spallone G, Moretti F, Narcisi A, Botti E. Programmed cell death in the skin. *Int J Dev Biol* 2015;59(1-3):73-8.

Coulson-Thomas VJ, Lauer ME, Soleman S, Zhao C, Hascall VC, Day AJ, et al. Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene-6 (TSG-6) Is Constitutively Expressed in Adult Central Nervous System (CNS) and Associated with Astrocyte-mediated Glial Scar Formation following Spinal Cord Injury. *J Biol Chem* 2016;291(38):19939-52.

Csoka A, Frost G, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* 2001;20:499-508.

Dabelsteen S, Pallesen EMH, Marinova IN, Nielsen MI, Adamopoulou M, Romer TB, et al. Essential Functions of Glycans in Human Epithelia Dissected by a CRISPR-Cas9-Engineered Human Organotypic Skin Model. *Dev Cell* 2020;54(5):669-84 e7.

Dahlhoff M, Gaborit N, Bultmann S, Leonhardt H, Yarden Y, Schneider MR. CRISPR-assisted receptor deletion reveals distinct roles for ERBB2 and ERBB3 in skin keratinocytes. *FEBS J* 2017;284(19):3339-49.

Dan J, Liu Y, Liu N, Chiourea M, Okuka M, Wu T, et al. Rif1 maintains telomere length homeostasis of ESCs by mediating heterochromatin silencing. *Dev Cell* 2014;29(1):7-19.

Danchuk S, Ylostalo JH, Hossain F, Sorge R, Ramsey A, Bonvillain RW, et al. Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor-alpha-induced protein 6. *Stem Cell Res Ther* 2011;2(3):27.

David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K, et al. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16(2):274-87.

Davis M, Ford D, Bertoglio J, Maizel A, Pierre J. Induction of the IL-13 receptor α 2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene* 2001;20:6660-8.

Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 2005;26(12):637-43.

Day AJ, Milner CM. TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol* 2019;78-79:60-83.

De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, De Glas V, de Rouvroit CL, Poumay Y. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol* 2014;1195:191-201.

De Vuyst E, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Malaisse J, Mound A, Bourtembourg M, et al. Methyl-beta-cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol* 2018;27(4):435-7.

De Vuyst É, Mound A, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Modelling atopic dermatitis during the morphogenetic process involved in reconstruction of a human epidermis. *Current Research in Translational Medicine* 2016;64(4):179-83.

Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton J, Smith J, Freemont A, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer* 1997;71:251-6.

Del Marmol D, Holtze S, Kichler N, Sahm A, Bihin B, Bourguignon V, et al. Abundance and size of hyaluronan in naked mole-rat tissues and plasma. *Scientif Reports* 2021;11.

Delaney MA, Nagy L, Kinsel MJ, Treuting PM. Spontaneous histologic lesions of the adult naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): a retrospective survey of lesions in a zoo population. *Vet Pathol* 2013;50(4):607-21.

Di Lorenzo A, Bolli E, Tarone L, Cavallo F, Conti L. Toll-Like Receptor 2 at the Crossroad between Cancer Cells, the Immune System, and the Microbiota. *Int J Mol Sci* 2020;21(24).

Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, et al. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* 2000;20(4):1436-47.

Dil N, Banerjee AG. A role for aberrantly expressed nuclear localized decorin in migration and invasion of dysplastic and malignant oral epithelial cells. *Head & Neck Oncology* 2011;3:44.

do Nascimento Pedrosa T, De Vuyst E, Mound A, Lambert de Rouvroit C, Maria-Engler SS, Poumay Y. Methyl-beta-cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model. *Arch Dermatol Res* 2017;309(1):63-9.

Dogne S, Flamion B, Caron N. Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications: Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38(7):1427-39.

Dogné S, Rath G, Jouret F, Caron N, Dessy C, Flamion B. Hyaluronidase 1 deficiency preserves endothelial function and glycocalyx integrity in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 2016;65(9):2742-53.

Dokoshi T, Zhang LJ, Li F, Nakatsuji T, Butcher A, Yoshida H, et al. Hyaluronan Degradation by Cemip Regulates Host Defense against Staphylococcus aureus Skin Infection. *Cell Rep* 2020;30(1):61-8 e4.

Dyer DP, Salanga CL, Johns SC, Valdambrini E, Fuster MM, Milner CM, et al. The Anti-inflammatory Protein TSG-6 Regulates Chemokine Function by Inhibiting Chemokine/Glycosaminoglycan Interactions. *J Biol Chem* 2016;291(24):12627-40.

Dyer DP, Thomson JM, Hermant A, Jowitt TA, Handel TM, Proudfoot AE, et al. TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8. *J Immunol* 2014;192(5):2177-85.

Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(12):3471-80.

Elias MS, Wright SC, Nicholson WV, Morrison KD, Prescott AR, Ten Have S, et al. Functional and proteomic analysis of a full thickness filaggrin-deficient skin organoid model. *Wellcome Open Res* 2019;4:134.

Endo Y, Yoshida H, Ota Y, Akazawa Y, Sayo T, Hanai U, et al. Accelerated human epidermal turnover driven by increased hyaluronan production. *J Dermatol Sci* 2021;101(2):123-33.

Enjalbert F, Dewan P, Caley MP, Jones EM, Morse MA, Kelsell DP, et al. 3D model of harlequin ichthyosis reveals inflammatory therapeutic targets. *J Clin Invest* 2020.

Evrard C, Faway E, De Vuyst E, Svensen O, De Glas V, Bergerat D, et al. Deletion of TNFAIP6 gene in human keratinocytes demonstrates a role for TSG-6 to retain hyaluronan inside epidermis. *JID Innovations* 2021.

Evrard C, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Epidermal Hyaluronan in Barrier Alteration-Related Disease. *Cells* 2021;10:3096.

Farboud B, Jarvis E, Roth TL, Shin J, Corn JE, Marson A, et al. Enhanced Genome Editing with Cas9 Ribonucleoprotein in Diverse Cells and Organisms. *J Vis Exp* 2018(135).

Farwick M, Gauglitz G, Pavicic T, Kohler T, Wegmann M, Schwach-Abdellaoui K, et al. Fifty-kDa hyaluronic acid upregulates some epidermal genes without changing TNF-alpha expression in reconstituted epidermis. *Skin Pharmacol Physiol* 2011;24(4):210-7.

Faway E, Cambier L, De Vuyst E, Evrard C, Thiry M, Lambert de Rouvroit C, et al. Responses of Reconstructed Human Epidermis to *Trichophyton rubrum* Infection and Impairment of Infection by the Inhibitor PD169316. *J Invest Dermatol* 2019;139(10):2080-9 e6.

Faway E, Cambier L, Mignon B, Poumay Y, Lambert de Rouvroit C. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. *Med Mycol* 2017;55(5):485-94.

Faway E, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. *Exp Dermatol* 2018;27(8):915-22.

Fenini G, Grossi S, Contassot E, Biedermann T, Reichmann E, French LE, et al. Genome Editing of Human Primary Keratinocytes by CRISPR/Cas9 Reveals an Essential Role of the NLRP1 Inflammasome in UVB Sensing. *J Invest Dermatol* 2018a;138(12):2644-52.

Fenini G, Grossi S, Gehrke S, Beer HD, Satoh TK, Contassot E, et al. The p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Critically Regulates Human Keratinocyte Inflammasome Activation. *J Invest Dermatol* 2018b;138(6):1380-90.

Fluhr JW, Elias PM, Man MQ, Hupe M, Selden C, Sundberg JP, et al. Is the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification? *J Invest Dermatol* 2010;130(8):2141-4.

Fluhr JW, Kao J, Jain M, Ahn SK, Feingold KR, Elias PM. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J Invest Dermatol* 2001;117(1):44-51.

Forteza R, Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Fries E, Rugg MS, Milner CM, et al. TSG-6 potentiates the antitissue kallikrein activity of inter-alpha-inhibitor through bikunin release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36(1):20-31.

Fortunel NO, Bouissou-Cadio E, Coutier J, Martin MT. Iterative Three-Dimensional Epidermis Bioengineering and Xenografting to Assess Long-Term Regenerative Potential in Human Keratinocyte Precursor Cells. *Methods Mol Biol* 2020;2109:155-67.

Frankart A, Coquette A, Schroeder KR, Poumay Y. Studies of cell signaling in a reconstructed human epidermis exposed to sensitizers: IL-8 synthesis and release depend on EGFR activation. *Arch Dermatol Res* 2012a;304(4):289-303.

Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, Minner F, de Rouvroit CL, Poumay Y. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol* 2012b;21(11):871-5.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997;242(1):27-33.

Freinkel R, Woodley D. *The biology of the skin*: Parthenon Publishing Group, 2001.

Frenkel JS. The role of hyaluronan in wound healing. *Int Wound J* 2014;11(2):159-63.

Fries E, Kaczmarczyk A. Inter- α -inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochimica Polonica* 2003;50:735-42.

Fulop C, Szanto S, Mukhopadhyay D, Bardos T, Kamath RV, Rugg MS, et al. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development* 2003;130(10):2253-61.

Gall Y. Acide hyaluronique : structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. *Annales de dermatologie* 2010;137:S30-S9.

Gandham VD, Maddala RL, Rao V, Jin JY, Epstein DL, Hall RP, et al. Effects of Y27632 on keratinocyte procurement and wound healing. *Clin Exp Dermatol* 2013;38(7):782-6.

Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(4).

Gesteira TF, Sun M, Coulson-Thomas YM, Yamaguchi Y, Yeh LK, Hascall V, et al. Hyaluronan Rich Microenvironment in the Limbal Stem Cell Niche Regulates Limbal Stem Cell Differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(11):4407-21.

Getsios S, Simpson CL, Kojima S, Harmon R, Sheu LJ, Dusek RL, et al. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J Cell Biol* 2009;185(7):1243-58.

Getting SJ, Mahoney DJ, Cao T, Rugg MS, Fries E, Milner CM, et al. The link module from human TSG-6 inhibits neutrophil migration in a hyaluronan- and inter- α -inhibitor-independent manner. *J Biol Chem* 2002;277(52):51068-76.

Ghatak S, Maytin EV, Mack JA, Hascall VC, Atanelishvili I, Moreno Rodriguez R, et al. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *Int J Cell Biol* 2015;2015:834893.

Giltaire S, Lambert S, Poumay Y. HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. *J Cell Physiol* 2011;226(6):1651-9.

Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* 2007;80(21):1921-43.

Gogler-Piglowska A, Klarzynska K, Sojka DR, Habryka A, Glowala-Kosinska M, Herok M, et al. Novel role for the testis-enriched HSPA2 protein in regulating epidermal keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol* 2018;233(3):2629-44.

Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(4):244-53.

Gruber JV, Holtz R, Riemer J. Hyaluronic acid (HA) stimulates the in vitro expression of CD44 proteins but not HAS1 proteins in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and is HA molecular weight dependent. *J Cosmet Dermatol* 2021.

Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin TK, Brandner JM, Hachem JP, et al. Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol* 2011;178(5):2252-63.

Gu H, Huang L, Wong YP, Burd A. HA modulation of epidermal morphogenesis in an organotypic keratinocyte-fibroblast co-culture model. *Exp Dermatol* 2010;19(8):e336-9.

Guitart JR, Jr., Johnson JL, Chien WW. Research Techniques Made Simple: The Application of CRISPR-Cas9 and Genome Editing in Investigative Dermatology. *J Invest Dermatol* 2016;136(9):e87-e93.

Gunathilake R. The Human Epidermal Antimicrobial Barrier: Current Knowledge, Clinical Relevance and Therapeutic Implications. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2015;10:84-97.

Gutowska-Owsiak D, Ogg GS. Cytokine regulation of the epidermal barrier. *Clin Exp Allergy* 2013;43(6):586-98.

Hachem JP, Behne M, Aronchik I, Demerjian M, Feingold KR, Elias PM, et al. Extracellular pH Controls NHE1 expression in epidermis and keratinocytes: implications for barrier repair. *J Invest Dermatol* 2005;125(4):790-7.

Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol* 2003;121(2):345-53.

Halprin K. Epidermal "turnover time" - A re-examination. *British Journal of Dermatology* 1972;86(14).

Harada H, Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem* 2007;282(8):5597-607.

Harder J, Schroder JM, Glaser R. The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. *Exp Dermatol* 2013;22(1):1-5.

Havlickova B, Czaika V, Friedrich M. Epidermiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008;51:2-15.

Hayez A, Roegiers E, Malaisse J, Balau B, Sterpin C, Achouri Y, et al. TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis, Keratinization and Barrier Formation. *PLoS One* 2016;11(1):e0147069.

He H, Li W, Tseng DY, Zhang S, Chen SY, Day AJ, et al. Biochemical characterization and function of complexes formed by hyaluronan and the heavy chains of inter-alpha-inhibitor (HC*HA) purified from extracts of human amniotic membrane. *J Biol Chem* 2009;284(30):20136-46.

Henry J, E T, Hsu C, Pellerin L, Balica S, Mazereeuw-Hautier J, et al. Update on the epidermal differentiation complex. *Frontiers in Bioscience* 2012;17:1517-32.

Higman VA, Blundell CD, Mahoney DJ, Redfield C, Noble ME, Day AJ. Plasticity of the TSG-6 HA-binding loop and mobility in the TSG-6-HA complex revealed by NMR and X-ray crystallography. *J Mol Biol* 2007;371(3):669-84.

Higman VA, Briggs DC, Mahoney DJ, Blundell CD, Sattelle BM, Dyer DP, et al. A refined model for the TSG-6 link module in complex with hyaluronan: use of defined oligosaccharides to probe structure and function. *J Biol Chem* 2014;289(9):5619-34.

Hiratsuka T, Fujita Y, Naoki H, Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M. Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *Elife* 2015;4:e05178.

Hopkinson SB, Hamill KJ, Wu Y, Eisenberg JL, Hiroyasu S, Jones JC. Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3(3):247-63.

Hubaux R, Bastin C, Salmon M. On the relevance of an in vitro reconstructed human epidermis model for drug screening in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2018;27(12):1403-7.

Hull RL, Johnson PY, Braun KR, Day AJ, Wight TN. Hyaluronan and hyaluronan binding proteins are normal components of mouse pancreatic islets and are differentially expressed by islet endocrine cell types. *J Histochem Cytochem* 2012;60(10):749-60.

Huth S, Heise R, Vetter-Kauczok CS, Skazik C, Marquardt Y, Czaja K, et al. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 5 (ITIHS) is overexpressed in inflammatory skin diseases and affects epidermal morphology in constitutive knockout mice and murine 3D skin models. *Exp Dermatol* 2015;24(9):663-8.

Huth S, Huth L, Marquardt Y, Fietkau K, Dahl E, Esser PR, et al. Inter-alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 5 (ITIHS) Is a Natural Stabilizer of Hyaluronan That Modulates Biological Processes in the Skin. *Skin Pharmacol Physiol* 2020;33(4):198-206.

Imundo L, Leduc CA, Guha S, Brown M, Perino G, Gushulak L, et al. A complete deficiency of Hyaluronoglucosaminidase 1 (HYAL1) presenting as familial juvenile idiopathic arthritis. *J Inherit Metab Dis* 2011;34(5):1013-22.

Inoue Y, Hasegawa S, Miyachi K, Yamada T, Nakata S, Ipponjima S, et al. Development of 3D imaging technique of reconstructed human epidermis with immortalized human epidermal cell line. *Exp Dermatol* 2018;27(5):563-70.

Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 2015;42:11-55.

Iriyama S, Nishikawa S, Hosoi J, Amano S. Basement Membrane Helps Maintain Epidermal Hyaluronan Content. *Am J Pathol* 2021.

Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999;274(35):25085-92.

Jadin L, Huang L, Wei G, Zhao Q, Gelb AB, Frost GI, et al. Characterization of a novel recombinant hyaluronan binding protein for tissue hyaluronan detection. *J Histochem Cytochem* 2014;62(9):672-83.

Jadin L, Wu X, Ding H, Frost GI, Onclinx C, Triggs-Raine B, et al. Skeletal and hematological anomalies in HYAL2-deficient mice: a second type of mucopolysaccharidosis IX? *FASEB J* 2008;22(12):4316-26.

Jansen PA, van den Bogaard EH, Kersten FF, Oostendorp C, van Vlijmen-Willems IM, Oji V, et al. Cystatin M/E knockdown by lentiviral delivery of shRNA impairs epidermal morphogenesis of human skin equivalents. *Exp Dermatol* 2012;21(11):889-91.

Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 2005;11(11):1173-9.

Jiang L, Zhang Y, Liu T, Wang X, Wang H, Song H, et al. Exosomes derived from TSG-6 modified mesenchymal stromal cells attenuate scar formation during wound healing. *Biochimie* 2020;177:40-9.

Johnson P, Maiti A, Brown K, Li R. A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in Leukocytes-Endothelial cell adhesion during an inflammatory response? *Biochemical Pharmacology* 2000;59:455-65.

Jokela T, Karna R, Rauhala L, Bart G, Pasonen-Seppanen S, Oikari S, et al. Human Keratinocytes Respond to Extracellular UTP by Induction of Hyaluronan Synthase 2 Expression and Increased Hyaluronan Synthesis. *J Biol Chem* 2017;292(12):4861-72.

Jokela T, Oikari S, Takabe P, Rilla K, Karna R, Tammi M, et al. Interleukin-1beta-induced Reduction of CD44 Ser-325 Phosphorylation in Human Epidermal Keratinocytes Promotes CD44 Homomeric Complexes, Binding to Ezrin, and Extended, Monocyte-adhesive Hyaluronan Coats. *J Biol Chem* 2015;290(19):12379-93.

Jokela TA, Lindgren A, Rilla K, Maytin E, Hascall VC, Tammi RH, et al. Induction of hyaluronan cables and monocyte adherence in epidermal keratinocytes. *Connect Tissue Res* 2008;49(3):115-9.

Jung MH, Jung SM, Shin HS. Co-stimulation of HaCaT keratinization with mechanical stress and air-exposure using a novel 3D culture device. *Sci Rep* 2016;6:33889.

Junghans V, Jung T, Neumann C. Human keratinocytes constitutively express IL-4 receptor molecules and respond to IL-4 with an increase in B7/BB1 expression. *Exp Dermatol* 1996;5:316-24.

Kage M, Tokudome Y. Hyaluronan tetrasaccharides stimulate ceramide production through upregulated mRNA expression of ceramide synthesis-associated enzymes. *Arch Dermatol Res* 2016;308(2):95-101.

Kage M, Tokudome Y, Matsunaga Y, Hariya T, Hashimoto F. Effect of hyaluronan tetrasaccharides on epidermal differentiation in normal human epidermal keratinocytes. *Int J Cosmet Sci* 2014;36(1):109-15.

Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Hanada K, Kon A, Yamaguchi M, et al. Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch Biochem Biophys* 2008;471(1):85-93.

Karousou E, Kamiryo M, Skandalis SS, Ruusala A, Asteriou T, Passi A, et al. The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J Biol Chem* 2010;285(31):23647-54.

Karvinen S, Pasonen-Seppanen S, Hyttinen JM, Pienimaki JP, Torronen K, Jokela TA, et al. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem* 2003;278(49):49495-504.

Kasai K, Kuroda Y, Takabuchi Y, Nitta A, Kobayashi T, Nozaka H, et al. Phosphorylation of Thr(328) in hyaluronan synthase 2 is essential for hyaluronan synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;533(4):732-8.

Katayama H. Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. *Exp Dermatol* 2018;27(10):1084-91.

Kavasi RM, Berdiaki A, Spyridaki I, Corsini E, Tsatsakis A, Tzanakakis G, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem Toxicol* 2017;101:128-38.

Kavasi RM, Berdiaki A, Spyridaki I, Papoutsidakis A, Corsini E, Tsatsakis A, et al. Contact allergen (PPD and DNCB)-induced keratinocyte sensitization is partly mediated through a low molecular weight hyaluronan (LMWHA)/TLR4/NF-kappaB signaling axis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019;377:114632.

Kaya G, Rodrigez I, Jorcano J, Vassalli P, Stamenkovic I. Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts . hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes & Development* 1997;11:996-1007.

Kim MH, Liu W, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Cheung AL, et al. Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J Invest Dermatol* 2008;128(7):1812-20.

Kleiser S, Nystrom A. Interplay between Cell-Surface Receptors and Extracellular Matrix in Skin. *Biomolecules* 2020;10(8).

Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules* 2020;10(11).

Kuchler S, Henkes D, Eckl KM, Ackermann K, Plendl J, Korting HC, et al. Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Altern Lab Anim* 2011;39(5):471-80.

Kuznestova S, Mahoney D, Martin-Manso G, Ali T, Nentwich H, Sipes J, et al. TSG-6 binds via its CUB_C domain to the cell-binding domain of fibronectin and increases fibronectin matrix assembly. *NIH Public Access* 2008;27(3):201-10.

Kuznetsova S, Day A, Mahoney D, Rugg M, Mosher D, Roberts D. The N-terminal module of thrombospondin-1 interacts with the link domain of TSG-6 and enhances its covalent association with the heavy chains of inter-a-trypsin inhibitor. *NIH Public Access* 2005;280(35):30899-908.

Kypriotou M, Huber M, Hohl D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol* 2012;21(9):643-9.

Lambert MW, Maddukuri S, Karanfilian KM, Elias ML, Lambert WC. The physiology of melanin deposition in health and disease. *Clin Dermatol* 2019;37(5):402-17.

Laurent TC, Fraser E. Hyaluronan. *The FASEB Journal* 1992;6.

Lavker RM, Matoltsy AG. Formation of horny cells: The fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. *J Cell Biol* 1970;44(3):501-12.

Le Provost GS, Debret R, Cenizo V, Aimond G, Pez F, Kaniewski B, et al. Lysyl oxidase silencing impairs keratinocyte differentiation in a reconstructed-epidermis model. *Exp Dermatol* 2010;19(12):1080-7.

Leali D, Inforzato A, Ronca R, Bianchi R, Belleri M, Coltrini D, et al. Long pentraxin 3/tumor necrosis factor-stimulated gene-6 interaction: a biological rheostat for fibroblast growth factor 2-mediated angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(3):696-703.

Lee JE, Kim YA, Yu S, Park SY, Kim KH, Kang NJ. 3,6-Anhydro-L-galactose increases hyaluronic acid production via the EGFR and AMPKalpha signaling pathway in HaCaT keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2019;96(2):90-8.

Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. 2000:581-6.

Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):54-63.

Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1990;10(5):1982-8.

Lesley J, Gal I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem* 2004;279(24):25745-54.

Lesueur LL, Mir LM, André FM. Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. *Official Journal of the America Society of Gene and Cell Therapy* 2016;5:e291.

Li XY, Weng XJ, Li XJ, Tian XY. TSG-6 Inhibits the Growth of Keloid Fibroblasts Via Mediating the TGF-beta1/Smad Signaling Pathway. *J Invest Surg* 2021;34(9):947-56.

Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* 2015;208:44-53.

Linker A, Meyer K, Weissmann B. Enzymatic Formation of Monosaccharides from Hyaluronate. *Journal of Biological Chemistry* 1955;213(1):237-48.

Liu CW, Su BC, Chen JY. Tilapia Piscidin 4 (TP4) Reprograms M1 Macrophages to M2 Phenotypes in Cell Models of Gardnerella vaginalis-Induced Vaginosis. *Front Immunol* 2021;12:773013.

Liu L, Song H, Duan H, Chai J, Yang J, Li X, et al. TSG-6 secreted by human umbilical cord-MSCs attenuates severe burn-induced excessive inflammation via inhibiting activations of P38 and JNK signaling. *Sci Rep* 2016;6:30121.

Lord MS, Melrose J, Day AJ, Whitelock JM. The Inter-alpha-Trypsin Inhibitor Family: Versatile Molecules in Biology and Pathology. *J Histochem Cytochem* 2020;68(12):907-27.

Mack JA, Feldman RJ, Itano N, Kimata K, Lauer M, Hascall VC, et al. Enhanced inflammation and accelerated wound closure following tetraphorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3. *J Invest Dermatol* 2012;132(1):198-207.

Magana-Guerrero FS, Dominguez-Lopez A, Martinez-Aboytes P, Buentello-Volante B, Garfias Y. Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells inhibit Neutrophil Extracellular Traps through TSG-6. *Sci Rep* 2017;7(1):12426.

Mahoney DJ, Mikecz K, Ali T, Mabileau G, Benayahu D, Plaas A, et al. TSG-6 regulates bone remodeling through inhibition of osteoblastogenesis and osteoclast activation. *J Biol Chem* 2008;283(38):25952-62.

Mahoney DJ, Swales C, Athanasou NA, Bombardieri M, Pitzalis C, Kliskey K, et al. TSG-6 inhibits osteoclast activity via an autocrine mechanism and is functionally synergistic with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2011;63(4):1034-43.

Maina V, Cotena A, Doni A, Nebuloni M, Pasqualini F, Milner CM, et al. Coregulation in human leukocytes of the long pentraxin PTX3 and TSG-6. *J Leukoc Biol* 2009;86(1):123-32.

Mainzer C, Remoue N, Molinari J, Rousselle P, Barricchello C, Lago JC, et al. In vitro epidermis model mimicking IGF-1-specific age-related decline. *Exp Dermatol* 2018;27(5):537-43.

Malaisse J, Bourguignon V, De Vuyst E, Lambert de Rouvroit C, Nikkels AF, Flamion B, et al. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol* 2014;134(8):2174-82.

Malaisse J, Evrard C, Feret D, Colombaro V, Dogne S, Haftek M, et al. Hyaluronidase-1 Is Mainly Functional in the Upper Granular Layer, Close to the Epidermal Barrier. *J Invest Dermatol* 2015;135(12):3189-92.

Malaisse J, Pendaries V, Hontoir F, De Glas V, Van Vlaender D, Simon M, et al. Hyaluronan Does Not Regulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Differentiation. *J Biol Chem* 2016;291(12):6347-58.

Malgouries S, Thibaut S, Bernard BA. Proteoglycan expression patterns in human hair follicle. *Br J Dermatol* 2008;158(2):234-42.

Markwald R, Fitzharris T, Bank H, Bernanke D. Structural analyses on the Matrical Organization of Glycosaminoglycans in Developing Endocardial Cushions. *Developmental Biology* 1978;62:292-316.

Martin J, Midgley A, Meran S, Woods E, Bowen T, Phillips AO, et al. Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene 6 (TSG-6)-mediated Interactions with the Inter-alpha-inhibitor Heavy Chain 5 Facilitate Tumor Growth Factor beta1 (TGFbeta1)-dependent Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *J Biol Chem* 2016;291(26):13789-801.

Mathay C, Giltaire S, Minner F, Bera E, Herin M, Poumay Y. Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2008;128(3):717-27.

Mathay C, Pierre M, Pittelkow MR, Depiereux E, Nikkels AF, Colige A, et al. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol* 2011;131(1):46-58.

Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* 2015;27(6):269-80.

Matsui T, Chiyo T, Kobara H, Fujihara S, Fujita K, Namima D, et al. Telmisartan Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inducing S-Phase Arrest In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci* 2019;20(13).

Maytin EV. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology* 2016;26(6):553-9.

Maytin EV, Chung HH, Seetharaman VM. Hyaluronan Participates in the Epidermal Response to Disruption of the Permeability Barrier in Vivo. *The American Journal of Pathology* 2004;165(4):1331-41.

Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biology and Chemistry* 1934;107:629-34.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug Permeation Through Human Skin: Theory and in Vitro Experimental Measurement. *AIChE Journal* 1975;21(5):985.

Mildner M, Jin J, Eckhart L, Kezic S, Gruber F, Barresi C, et al. Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J Invest Dermatol* 2010;130(9):2286-94.

Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 10):1863-73.

Milner CM, Tongsoongnoen W, Rugg MS, Day AJ. The molecular basis of inter-alpha-inhibitor heavy chain transfer on to hyaluronan. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 4):672-6.

Minner F, Herphelin F, Poumay Y. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol* 2010;585:71-82.

Mittal M, Tirupathi C, Nepal S, Zhao YY, Grzych D, Soni D, et al. TNFalpha-stimulated gene-6 (TSG6) activates macrophage phenotype transition to prevent inflammatory lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(50):E8151-E8.

Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* 2008;166(5-6):285-94.

Monslow J, Sato N, Mack JA, Maytin EV. Wounding-induced synthesis of hyaluronic acid in organotypic epidermal cultures requires the release of heparin-binding egf and activation of the EGFR. *J Invest Dermatol* 2009;129(8):2046-58.

Montagna W, Chase H, Melaragno H. Histology and cytochemistry of human skin. I. Metachromasia in the mons pubis. *The Journal of Biophysical and Biochemical cytology* 1951;12(3):591-7.

Montagna W, Parakkal P. *The structure and function of skin*: Academic Press, 1974.

Moran MC, Pandya RP, Leffler KA, Yoshida T, Beck LA, Brewer MG. Characterization of human keratinocyte cell lines for barrier studies. *JID Innovations* 2021.

Moreci RS, Lechler T. Epidermal structure and differentiation. *Curr Biol* 2020;30(4):R144-R9.

Moretto P, Karousou E, Viola M, Caon I, D'Angelo ML, De Luca G, et al. Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes. *J Diabetes Res* 2015;2015:167283.

Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol* 2009;336(1):76-83.

Mound A, Lozanova V, Warnon C, Hermant M, Robic J, Guere C, et al. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862(9):958-71.

Muraguchi T, Nanba D, Nishimura EK, Tashiro T. IGF-1R deficiency in human keratinocytes disrupts epidermal homeostasis and stem cell maintenance. *J Dermatol Sci* 2019;94(2):298-305.

Muto J, Sayama K, Gallo RL, Kimata K. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. *J Dermatol Sci* 2019;94(1):190-5.

Mutoji KN, Sun M, Nash A, Puri S, Hascall V, Coulson-Thomas VJ. Anti-inflammatory protein TNFalpha-stimulated gene-6 (TSG-6) reduces inflammatory response after brain injury in mice. *BMC Immunol* 2021;22(1):52.

Natsuga K. Epidermal barriers. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4(4):a018218.

Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014;12(3):188-209; quiz 10, 188-211; quiz 2.

Ni K, Gill A, Cao D, Koike K, Schweitzer KS, Garantziotis S, et al. Intravascular heavy chain-modification of hyaluronan during endotoxic shock. *Biochem Biophys Rep* 2019;17:114-21.

Ni K, Gill A, Tseng V, Mikosz AM, Koike K, Beatman EL, et al. Rapid clearance of heavy chain-modified hyaluronan during resolving acute lung injury. *Respir Res* 2018;19(1):107.

Nikolova E, Mitev V, Minner F, Deroanne CF, Poumay Y. The inhibition of the expression of the small Rho GTPase Rac1 induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing human adult keratinocytes. *J Cell Biochem* 2008;103(3):857-64.

Nusgens B. Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule? *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* 2010;137 Suppl:S3-S8.

Nyman E, Henricson J, Ghafouri B, Anderson CD, Kratz G. Hyaluronic Acid Accelerates Re-epithelialization and Alters Protein Expression in a Human Wound Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2019;7(5):e2221.

Nystrom A, Bruckner-Tuderman L. Matrix molecules and skin biology. *Semin Cell Dev Biol* 2019;89:136-46.

O'Keefe E. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. Labome 2013.

Ochsner SA, Day AJ, Rugg MS, Breyer RM, Gomer RH, Richards JS. Disrupted function of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology* 2003;144(10):4376-84.

Ogawa Y, Kinoshita M, Shimada S, Kawamura T. Zinc in Keratinocytes and Langerhans Cells: Relevance to the Epidermal Homeostasis. *J Immunol Res* 2018;2018:5404093.

Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, et al. Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol* 2009;129(6):1412-20.

Onclinx C, Dogne S, Jadin L, Andris F, Grandfils C, Jouret F, et al. Deficiency in mouse hyaluronidase 2: a new mechanism of chronic thrombotic microangiopathy. *Haematologica* 2015;100(8):1023-30.

Park AY, Bourtembourg M, Chretien A, Hubaux R, Lancelot C, Salmon M, et al. Modulation of Gene Expression in a Sterile Atopic Dermatitis Model and Inhibition of Staphylococcus aureus Adhesion by Fucoidan. *Dermatopathology (Basel)* 2021;8(2):69-83.

Park Y, Jowitt TA, Day AJ, Prestegard JH. Nuclear Magnetic Resonance Insight into the Multiple Glycosaminoglycan Binding Modes of the Link Module from Human TSG-6. *Biochemistry* 2016;55(2):262-76.

Pasonen-Seppanen S, Hyttinen JM, Rilla K, Jokela T, Noble PW, Tammi M, et al. Role of CD44 in the organization of keratinocyte pericellular hyaluronan. *Histochem Cell Biol* 2012;137(1):107-20.

Pasonen-Seppanen S, Karvinen S, Torronen K, Hyttinen JM, Jokela T, Lammi MJ, et al. EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 2003;120(6):1038-44.

Passi A, Sadeghi P, Kawamura H, Anand S, Sato N, White LE, et al. Hyaluronan suppresses epidermal differentiation in organotypic cultures of rat keratinocytes. *Exp Cell Res* 2004;296(2):123-34.

Pendaries V, Malaisse J, Pellerin L, Le Lamer M, Nachat R, Kezic S, et al. Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2014;134(12):2938-46.

Petrey AC, Obery DR, Kessler SP, Zawerton A, Flamion B, de la Motte CA. Platelet hyaluronidase-2 regulates the early stages of inflammatory disease in colitis. *Blood* 2019;134(9):765-75.

Pienimaki JP, Rilla K, Fulop C, Sironen RK, Karvinen S, Pasonen S, et al. Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J Biol Chem* 2001;276(23):20428-35.

Plager DA, Kahl JC, Asmann YW, Nilson AE, Pallanch JF, Friedman O, et al. Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis. *PLoS One* 2010;5(7):e11450.

Prescott SL, Larcombe DL, Logan AC, West C, Burks W, Caraballo L, et al. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *World Allergy Organ J* 2017;10(1):29.

Progneaux A, Evrard C, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. IL-2R γ /IL-4R α receptor induced in keratinocytes by interleukins 4 and 13 can alter epidermal barrier. Abstract ESDR 2021.

Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol* 2018;45(9):1044-52.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17(12):1063-72.

Puissant E, Gilis F, Dogne S, Flamion B, Jadot M, Boonen M. Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages. *Traffic* 2014;15(5):500-15.

Pure E, Assoian RK. Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cell Signal* 2009;21(5):651-5.

Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, Stegemann A, Schatz S, Treiber N, et al. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol* 2014;134(2):526-37.

Quaranta M, Knapp B, Garzorz N, Mattii M, Pullabhatla V, Pennino D, et al. Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Sci Transl Med* 2014;6(244):244ra90.

Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Les mille et un visages des cellules souches multipotentes de la peau. *Rev Med Liège* 2012;67:3:143-6.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(9):746-59.

Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2016;101(4):213-5.

Reynolds G, Vegh P, Fletcher J, Poyner EFM, Stephenson E, Goh I, et al. Developmental cell programs are co-opted in inflammatory skin disease. *Science* 2021;371(6527).

Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, et al. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 2002;22(14):5157-72.

Rilla K, Oikari S, Jokela TA, Hyttinen JM, Karna R, Tammi RH, et al. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3. *J Biol Chem* 2013;288(8):5973-83.

Rilla K, Pasonen-Seppänen S, Rieppo J, Tammi M, Tammi R. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J Invest Dermatol* 2004;123(4):708-14.

Romano B, Elangovan S, Erreni M, Sala E, Petti L, Kunderfranco P, et al. TNF-Stimulated Gene-6 Is a Key Regulator in Switching Stemness and Biological Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2019;37(7):973-87.

Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (Review). *Int J Cancer* 1995;60:632-6.

Rosdy M, Pisani A, Ortonne JP. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Dermatol* 1993;129(3):227-34.

Rugg MS, Willis AC, Mukhopadhyay D, Hascall VC, Fries E, Fulop C, et al. Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. *J Biol Chem* 2005;280(27):25674-86.

Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2000;114(6):1184-7.

Samuelov L, Li Q, Bochner R, Najor NA, Albrecht L, Malchin N, et al. SVEP1 plays a crucial role in epidermal differentiation. *Exp Dermatol* 2017;26(5):423-30.

Sandjeu Y, Haftek M. Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 4:23-30.

Sandjeu Y, Haftek M. Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *Journal of physiology and pharmacology* 2009;60:23-30.

Sano S, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci* 2008;50(1):1-14.

Schulz A, Jiang L, de Vor L, Ehrstrom M, Wermeling F, Eidsmo L, et al. Neutrophil Recruitment to Noninvasive MRSA at the Stratum Corneum of Human Skin Mediates Transient Colonization. *Cell Rep* 2019;29(5):1074-81 e5.

Seo MD, Kang TJ, Lee CH, Lee AY, Noh M. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomol Ther (Seoul)* 2012;20(2):171-6.

Shakya S, Mack JA, Alipour M, Maytin EV. Cutaneous Wounds in Mice Lacking TSG-6 Exhibit Delayed Closure and an Abnormal Inflammatory Response. *J Invest Dermatol* 2020;140(12):2505-14.

Shatirishvili M, Burk AS, Franz CM, Pace G, Kastilan T, Breuhahn K, et al. Epidermal-specific deletion of CD44 reveals a function in keratinocytes in response to mechanical stress. *Cell Death Dis* 2016;7(11):e2461.

Shimizu H, Shimoda M, Mochizuki S, Miyamae Y, Abe H, Chijiwa M, et al. Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage. *Am J Pathol* 2018;188(9):2109-19.

Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(9):565-80.

Simpson CL, Tokito MK, Uppala R, Sarkar MK, Gudjonsson JE, Holzbaur ELF. NIX initiates mitochondrial fragmentation via DRP1 to drive epidermal differentiation. *Cell Rep* 2021;34(5):108689.

Simpson RM, Meran S, Thomas D, Stephens P, Bowen T, Steadman R, et al. Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2009;175(5):1915-28.

Slivka PF, Hsieh CL, Lipovsky A, Pratt SD, Locklear J, Namovic MT, et al. Small Molecule and Pooled CRISPR Screens Investigating IL17 Signaling Identify BRD2 as a Novel Contributor to Keratinocyte Inflammatory Responses. *ACS Chem Biol* 2019;14(5):857-72.

Smits JPH, Meesters LD, Maste BGW, Zhou H, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH. CRISPR-Cas9 based genomic engineering in keratinocytes: from technology to application. *JID Innovations* 2021.

Smits JPH, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems I, van de Zande G, Zeeuwen P, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep* 2017;7(1):11838.

Smits JPH, van den Brink NJM, Meesters L, van Vlijmen-Willems I, Evrard C, Poumay Y, et al. Filaggrin knock-out in keratinocytes indicates a functional role in skin barrier formation. *Abstract ESDR* 2021.

Spicer A, Lee Tien J, Joo A, Bowling Jr R. Investigation of hyaluronan function in the mouse through targeted mutagenesis. *Glycoconjugate Journal* 2003;19:341-5.

Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* 1998;273(4):1923-32.

Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003;13(12):105R-15R.

Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006;85(8):699-715.

Stober VP, Johnson CG, Majors A, Lauer ME, Cali V, Midura RJ, et al. TNF-stimulated gene 6 promotes formation of hyaluronan-inter-alpha-inhibitor heavy chain complexes necessary for ozone-induced airway hyperresponsiveness. *J Biol Chem* 2017;292(51):20845-58.

Swaidani S, Cheng G, Lauer ME, Sharma M, Mikecz K, Hascall VC, et al. TSG-6 protein is crucial for the development of pulmonary hyaluronan deposition, eosinophilia, and airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Biol Chem* 2013;288(1):412-22.

Symonette CJ, Kaur Mann A, Tan XC, Tolg C, Ma J, Perera F, et al. Hyaluronan-phosphatidylethanolamine polymers form pericellular coats on keratinocytes and promote basal keratinocyte proliferation. *Biomed Res Int* 2014;2014:727459.

Szanto S, Bardos T, Gal I, Glant TT, Mikecz K. Enhanced neutrophil extravasation and rapid progression of proteoglycan-induced arthritis in TSG-6-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2004;50(9):3012-22.

Talagas M, Lebonvallet N, Leschiera R, Elies P, Marcorelles P, Misery L. Intra-epidermal nerve endings progress within keratinocyte cytoplasmic tunnels in normal human skin. *Exp Dermatol* 2020;29(4):387-92.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002;277(7):4581-4.

Tammi R, MacCallum D, Hascall V, Pienimäki J, Hyttinen M, Tammi M. Hyaluronan Bound to CD44 on Keratinocytes Is Displaced by Hyaluronan Decasaccharides and Not Hexasaccharides. *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273(44):28878-88.

Tammi R, Rilla K, Pienimäki JP, MacCallum DK, Hogg M, Luukkonen M, et al. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem* 2001;276(37):35111-22.

Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Tammi M. Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol* 1988;90(3):412-4.

Tammi R, Tammi M. Correlations between Hyaluronan and Epidermal Proliferation as Studied by [3H]Glucosamine and [3H]Thymidine Incorporations and Staining of Hyaluronan on Mitotic Keratinocytes. *Experimental cell research* 1991;195:524-7.

Tammi RH, Hyyryläinen AMH, Maibach HI, Tammi MI. Ultrastructural localization of keratinocyte surface associated heparan sulphate proteoglycans in human epidermis. *Histochemistry* 1987;87:243-50.

Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, et al. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J* 2011;278(9):1419-28.

Tammi RH, Tammi MI. Hyaluronan accumulation in wounded epidermis: a mediator of keratinocyte activation. *J Invest Dermatol* 2009;129(8):1858-60.

Tammi RH, Tammi MI, Hascall VC, Hogg M, Pasonen S, MacCallum DK. A preformed basal lamina alters the metabolism and distribution of hyaluronan in epidermal keratinocyte "organotypic" cultures grown on collagen matrices. *Histochem Cell Biol* 2000;113(4):265-77.

Tan KT, McGrouther DA, Day AJ, Milner CM, Bayat A. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25(3):317-27.

Tan Q, Thomassen M, Burton M, Mose KF, Andersen KE, Hjelmborg J, et al. Generalized Correlation Coefficient for Non-Parametric Analysis of Microarray Time-Course Data. *J Integr Bioinform* 2017;14(2).

Tanabe Y, Yamane M, Kato M, Teshima H, Kuribayashi M, Tatsukawa H, et al. Studies on differentiation-dependent expression and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three-dimensional reconstituted epidermis. *FEBS J* 2019;286(13):2536-48.

Tavianatou AG, Caon I, Franchi M, Piperigkou Z, Galessio D, Karamanos NK. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J* 2019;286(15):2883-908.

Terazawa S, Nakajima H, Tobita K, Imokawa G. The decreased secretion of hyaluronan by older human fibroblasts under physiological conditions is mainly associated with the down-regulated expression of hyaluronan synthases but not with the expression levels of hyaluronidases. *Cytotechnology* 2015;67(4):609-20.

Teye K, Numata S, Ishii N, Krol RP, Tsuchisaka A, Hamada T, et al. Isolation of All CD44 Transcripts in Human Epidermis and Regulation of Their Expression by Various Agents. *PLoS One* 2016;11(8):e0160952.

Thones S, Rother S, Wippold T, Blaszkiewicz J, Balamurugan K, Moeller S, et al. Hyaluronan/collagen hydrogels containing sulfated hyaluronan improve wound healing by sustained release of heparin-binding EGF-like growth factor. *Acta Biomater* 2019;86:135-47.

Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Ablueva J, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* 2013;499(7458):346-9.

Tong HX, Zhou YH, Hou YY, Zhang Y, Huang Y, Xie B, et al. Expression profile of microRNAs in gastrointestinal stromal tumors revealed by high throughput quantitative RT-PCR microarray. *World J Gastroenterol* 2015;21(19):5843-55.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12(2):79-87.

Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):528-39.

Triggs-Raine B, Natowicz MR. Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism. *World J Biol Chem* 2015;6(3):110-20.

Triggs-Raine B, Salo T, Hachem JP, Zhang X, Wicklow B, Natowicz M. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:6296-300.

Trothe J, Ritzmann D, Lang V, Scholz P, Pul U, Kaufmann R, et al. Hypotonic stress response of human keratinocytes involves LRRC8A as component of volume-regulated anion channels. *Exp Dermatol* 2018;27(12):1352-60.

Uchiyama A, Nayak S, Graf R, Cross M, Hasneen K, Gutkind JS, et al. SOX2 Epidermal Overexpression Promotes Cutaneous Wound Healing via Activation of EGFR/MEK/ERK Signaling Mediated by EGFR Ligands. *J Invest Dermatol* 2019;139(8):1809-20 e8.

Umayahara T, Shimauchi T, Iwasaki M, Sakabe JI, Aoshima M, Nakazawa S, et al. Protective role of Galectin-7 for skin barrier impairment in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2020.

Vabres P. Acide hyaluronique, embryogenèse et morphogenèse. *Annales de dermatologie* 2010;137:S9-S14.

van den Bogaard EH, Tjabringa GS, Joosten I, Vonk-Bergers M, van Rijssen E, Tijssen HJ, et al. Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2014;134(3):719-27.

van Drongelen V, Danso MO, Mulder A, Mieremet A, van Smeden J, Bouwstra JA, et al. Barrier properties of an N/TERT-based human skin equivalent. *Tissue Eng Part A* 2014;20(21-22):3041-9.

Velez-DelValle C, Marsch-Moreno M, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Decorin gene expression and its regulation in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411(1):168-74.

Verdier-Sévrain S, Bonté F. Skine hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2007;6:75-82

Wagner T, Beer L, Gschwandtner M, Eckhart L, Kalinina P, Laggner M, et al. The Differentiation-Associated Keratinocyte Protein Cornifelin Contributes to Cell-Cell Adhesion of Epidermal and Mucosal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2019;139(11):2292-301 e9.

Walters K, Roberts M. *The Structure and function of skin. Dermatological and Transdermal Formulations* 2002.

Wang A, de la Motte C, Lauer M, Hascall V. Hyaluronan matrices in pathobiological processes. *FEBS J* 2011;278(9):1412-8.

Wang B, Wang Z, Wang D, Zhang B, Ong SG, Li M, et al. krCRISPR: an easy and efficient strategy for generating conditional knockout of essential genes in cells. *J Biol Eng* 2019;13:35.

Wang H, Chen Z, Li XJ, Ma L, Tang YL. Anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *Eur J Pharmacol* 2015;751:42-9.

Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res* 2018;371(3):531-9.

Wang S, Olt S, Schoefmann N, Stuetz A, Winiski A, Wolff-Winiski B. SPINK5 knockdown in organotypic human skin culture as a model system for Netherton syndrome: effect of genetic inhibition of serine proteases kallikrein 5 and kallikrein 7. *Exp Dermatol* 2014;23(7):524-6.

Wang XW, Wang JJ, Gutowska-Owsiak D, Salimi M, Selvakumar TA, Gwela A, et al. Deficiency of filaggrin regulates endogenous cysteine protease activity, leading to impaired skin barrier function. *Clin Exp Dermatol* 2017;42(6):622-31.

Watanabe J, Shetty AK, Hattiangady B, Kim DK, Foraker JE, Nishida H, et al. Administration of TSG-6 improves memory after traumatic brain injury in mice. *Neurobiol Dis* 2013;59:86-99.

Watt FM, Jones PH. Expression and function of the keratinocyte integrins. *Development* 1993:185-92.

Weigel PH, DeAngelis PL. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem* 2007;282(51):36777-81.

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 1997;272(22):13997-4000.

Weitzman I, Summerbell RC. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* 1995;8:240-59.

Wells AF, Lunding A, Michaëlsson G. Histochemical localization of hyaluronan in psoriasis, allergic contact dermatitis and normal skin. *Acta Derm Venereol* 1991;71(3):232-8.

Wight TN. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biol* 2017;60-61:38-56.

Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2(7):379-88.

Wisniewski HG, Colon E, Liublinska V, Karia RJ, Stabler TV, Attur M, et al. TSG-6 activity as a novel biomarker of progression in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22(2):235-41.

Withe T, Findley K, Dawson Jr T, Scheynius A, Boekhout T, Cuomo C, et al. Fungi on the skin: Dermatophytes and Malassezia. *Perspectives in Medicine* 2014;4.

Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, et al. Up-regulation of interleukin-13 receptor α 1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science* 2003;33(1):31-40.

Wright A, Day A. Hyaluronan in immune processes. *Glycobiology and Medicine* 2005:57-69.

Yan B, Liu N, Li J, Li J, Zhu W, Kuang Y, et al. The role of Langerhans cells in epidermal homeostasis and pathogenesis of psoriasis. *J Cell Mol Med* 2020;24(20):11646-55.

Yan C, Grimm WA, Garner WL, Qin L, Travis T, Tan N, et al. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *Am J Pathol* 2010;176(5):2247-58.

Yang Z, Zhang L, Zhang H, Zhou C. The Anti-inflammatory Protein TSG-6 Induced by *S. aureus* Regulates the Chemokine Function of Endothelial Cells In Vitro by Inhibiting the Chemokine-Glycosaminoglycan Interaction. *Inflammation* 2021;44(3):1194-202.

Yoshida H, Komiya A, Ohtsuki R, Kusaka-Kikushima A, Sakai S, Kawabata K, et al. Relationship of hyaluronan and HYBID (KIAA1199) expression with roughness parameters of photoaged skin in Caucasian women. *Skin Res Technol* 2018;24(4):562-9.

Yoshida H, Okada Y. Role of HYBID (Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization), Alias KIAA1199/CEMIP, in Hyaluronan Degradation in Normal and Photoaged Skin. *Int J Mol Sci* 2019;20(22).

Yuki T, Yoshida H, Akazawa Y, Komiya A, Sugiyama Y, Inoue S. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *J Immunol* 2011;187(6):3230-7.

Zanna G, Docampo MJ, Fondevila D, Bardagi M, Bassols A, Ferrer L. Hereditary cutaneous mucinosis in shar pei dogs is associated with increased hyaluronan synthase-2 mRNA transcription by cultured dermal fibroblasts. *Vet Dermatol* 2009;20(5-6):377-82.

Zhan P, Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. *Mycopathologia* 2017;182(1-2):77-86.

Zhou L, Jing J, Wang H, Wu X, Lu Z. Decorin promotes proliferation and migration of ORS keratinocytes and maintains hair anagen in mice. *Exp Dermatol* 2018;27(11):1237-44.

Zhu L, Donhou S, Burleigh A, Miotla Zarebska J, Curtinha M, Parisi I, et al. TSG-6 Is Weakly Chondroprotective in Murine OA but Does not Account for FGF2-Mediated Joint Protection. *ACR Open Rheumatol* 2020;2(10):605-15.

Zhuo L, Kanamori A, Kannagi R, Itano N, Wu J, Hamaguchi M, et al. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J Biol Chem* 2006;281(29):20303-14.

Zhuo L, Yoneda M, Zhao M, Yingsung W, Yoshida N, Kitagawa Y, et al. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* 2001;276(11):7693-6.

Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278(46):45801-10.

TSG-6 (*TNF α -stimulated gene 6*) est une protéine anti-inflammatoire présente dans la peau humaine. Au niveau de l'épiderme, la protéine TSG-6 est principalement sécrétée dans la matrice extracellulaire (MEC), entre les kératinocytes, où elle interagit avec l'hyaluronan (HA). L'HA est un glycosaminoglycan majoritairement synthétisé par la HAS1 dans l'épiderme sain et la HAS3 en conditions pathologiques telle que la dermatite atopique et dont les fonctions épidermiques semblent encore troubles.

Dans une première partie, l'étude de la dégradation de l'HA épidermique a été menée dans un modèle d'épidermes reconstruits *in vitro* (RHE) et sur la souris déficiente pour la hyaluronidase 1 (*Hyal1^{-/-}*). Il apparaît que HYAL1 serait impliqué, au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme, dans la dégradation de l'HA internalisé en fragments de bas poids moléculaires. Sur base de ces observations, nous posons l'hypothèse que l'accumulation de fragments d'HA dans les cornéocytes participerait à l'hydratation cutanée.

Dans un second temps, la caractérisation de la protéine TSG-6 dans les RHE a montré que cette dernière est exprimée et sécrétée en faible quantité en conditions saines. Cependant, l'exposition des RHE à des éléments fongiques (pour mimer une dermatophytose) ou à des cytokines Th2 (pour mimer une dermatite atopique) induit une surexpression et une sécrétion augmentée de la protéine TSG-6 ; parallèlement à une production accrue d'HA.

Finalement, les rôles de la protéine TSG-6 dans l'épiderme ont été investigués en créant des cellules TSG-6^{-/-} en utilisant la méthode CRISPR/Cas9 dans des kératinocytes immortalisés. L'absence de la protéine TSG-6 n'affecte ni la capacité de prolifération, ni le processus de différenciation des kératinocytes qui sont capables de produire une barrière efficace. Alors qu'aucune modification de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'HA n'a été mesurée, une plus grande quantité d'HA est détectée dans le milieu de culture sous-jacent aux épidermes déficients pour TSG-6 et ce de manière plus importante dans les conditions qui miment une dermatite atopique ou une dermatophytose ; ce qui suggère l'implication de la protéine TSG-6 dans la rétention de l'HA dans la matrice extracellulaire de l'épiderme.

Cette thèse a donc permis de mettre en évidence un rôle pour la protéine TSG-6 dans le maintien de l'HA épidermique. Cette observation ouvre des perspectives quant à l'effet de la désorganisation de la MEC épidermique, induite par l'absence de la protéine TSG-6, sur le bon fonctionnement des kératinocytes épidermiques.

Céline
Evrard

21 janvier
2022