



THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES BIOMÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES

Analyse de l'implication de récepteurs multiples des interleukines 4 et 13 dans la dermatite atopique

Progneaux, Audrey

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

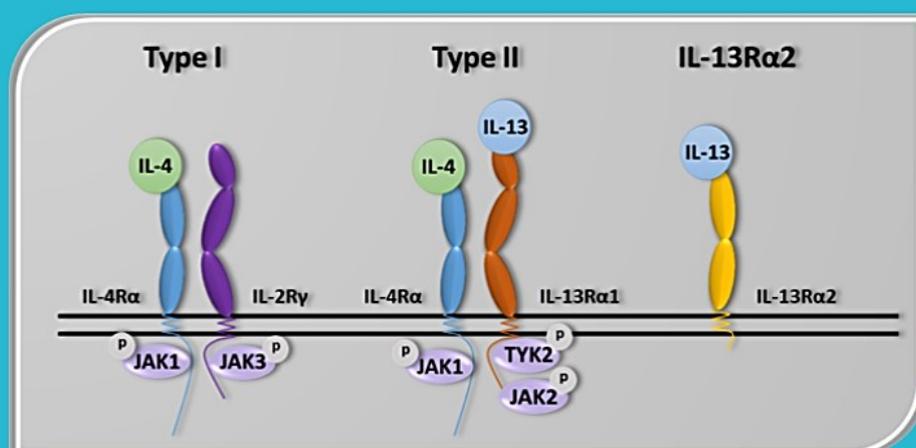
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Analyse de l'implication de récepteurs multiples des interleukines 4 et 13 dans la dermatite atopique

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

**Audrey
Progneaux**

16 décembre
2022



Composition du jury :

Dr. Corinne Leprince

Dr. Marc Eeman

Pr. Laure Dumoutier

Pr. Florence Chainiaux

Pr. Jean-Pierre Gillet

Dr. Catherine Lambert de Rouvoit

Pr. Yves Poumay

Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires, France

Dow Silicones Belgium SRL, Seneffe

Institut de Duve, UCLouvain, Bruxelles

URBC, Unamur, Namur

Président de jury, URPhyM, UNamur, Namur

Co-promoteur URPhyM, UNamur, Namur

Promoteur URPhyM, UNamur, Namur

Remerciements

Ainsi s'achève quatre années de recherche durant lesquelles j'ai pu m'épanouir professionnellement et personnellement. Mon projet de recherche au sein du laboratoire LabCeTi m'a permis d'élargir mes connaissances scientifiques, de gagner en maturité et surtout de booster ma confiance en moi. De nombreuses personnes ont contribué à l'aboutissement de ma thèse, c'est pourquoi je tiens à leur manifester ma gratitude. Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement Prof. Yves Poumay, mon promoteur, qui m'a accueillie chaleureusement et humainement au sein de son laboratoire, le LabCeTi. Mr Poumay a toujours cru en moi et en mon projet. Je tiens également à le remercier pour ses nombreux conseils grâce auxquels j'ai pu améliorer ma rigueur scientifique (surtout dans l'expression orale et écrite) et mon esprit critique. Plus encore, ses remarques bienveillantes afin de booster ma confiance en moi resteront gravées dans ma mémoire pour la suite de ma vie professionnelle et personnelle. Je voudrais également remercier Dr Catherine Lambert de Rouvoit, ma co-promotrice, qui a pris le temps de corriger mes manuscrits. Ses messages d'encouragement et de félicitation lors des différentes réunions avec Almirall et lors des présentations au cours des congrès scientifiques m'ont été d'un grand soutien.

Je souhaite remercier vivement les différents membres de mon jury de thèse, Dr. Corine Leprince, Dr. Marc Eeman, Prof. Laure Dumoutier, Prof. Florence Chainiaux et le Prof. Jean-Pierre Gillet, qui ont pris le temps de lire ma thèse. Merci pour les remarques pertinentes afin d'améliorer mon manuscrit ainsi que pour les compliments à propos de ma présentation orale lors de ma défense privée de thèse. Je remercie particulièrement Prof. Laure Dumoutier et Prof. Florence Chainiaux qui ont contribué à l'aboutissement de ma thèse en me conseillant tout au long de ma recherche.

Il est important également de remercier les principaux acteurs de ma vie au laboratoire, mes collègues du LabCeTi/LNR, une équipe de choc qu'il sera difficile de quitter. Leur soutien, leur bonne humeur et leurs déconnades me manqueront énormément. Pour commencer, je remercie ceux qui ne sont plus au laboratoire, merci à Evelyne, mon ancienne encadrante de mémoire qui a initié mon envie de faire un doctorat et à Joanna qui fut à un moment ma compagne de bureau. Je remercie affectueusement Céline et Emilie qui m'ont soutenue et conseillée durant la totalité (ou presque) de ma thèse et Bastien, avec qui je n'ai pu passer qu'une petite moitié de ma thèse. Merci pour les merveilleux congrès passés ensemble ainsi que les nombreuses discussions scientifiques (mais pas uniquement 😊). Je remercie également nos précieux techniciens de laboratoire, Kat, Valéry et Valérie dont les conseils techniques

m'ont été indispensables. Merci particulièrement à Valérie qui a grandement contribué aux mises au point des expériences. Je n'oublie pas la team « LNR » : merci à Nico, malgré son petit côté Caliméro 😊, il a amené une ambiance joviale au laboratoire ; merci à Lili, avec qui j'ai partagé mon année de mémoire (d'ailleurs on n'a jamais mis cette photo sur le mur 😂) et toutes mes années de thèse ; merci à Margot, la petite nouvelle toujours optimiste et enfin merci à Charles Nicaise pour ses précieux conseils pour mon avenir professionnel. Pour finir, je remercie, Céline et Nicolas, mes deux étudiants en mémoire, Alix, mon ancienne étudiante chercheuse et Julia, doctorante venant du Brésil, que j'ai pu former à la recherche et avec qui j'ai pu partager mes connaissances techniques et scientifiques.

Dans ce dernier paragraphe, j'aimerais remercier des personnes qui n'ont pas arrêté de croire en moi. Avec eux, j'ai eu l'impression d'être une super-héroïne qui allait révolutionner le monde 😂. Je parle bien évidemment de mes amis et surtout de ma famille et mon copain, Fred, qui m'ont soutenue dans les moments plus difficiles que peut engendrer une thèse. Merci également d'avoir écouté attentivement (ou pas) pendant toutes ses années lorsque je m'extasiais sur l'un ou l'autre résultat de ma recherche. Pour finir, je tiens à remercier particulièrement ma maman qui a consacré du temps pour corriger l'orthographe et la syntaxe de ma thèse. Je parie qu'elle connaît le manuscrit aussi bien que moi 😊.

Abréviations

A	α -hydroxylé
ARNg	ARN guide
CA2	Anhydrase carbonique 2
CCR	Chemokine receptors
CHI3L1	Chitinase-3-like-1
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CP	Cellule progénitrice
CS	Cellule souche
DA	Dermatite atopique
DAB	Diaminobenzidine
DS	Dihydrosphingosine
EASI	Eczema Area and Severity Index
Egr	Early growth reponse protein
ELVOL3	Elongase
EO	Estérifié- ω -hydroxylé
Fc ϵ RI	Récepteur à l'IgE
FLG	Filaggrine
FOXP3	Forkhead box P3
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence
GAP	GTPase activating protein
GATA	Trans-acting T-cell-specific transcription factor
Gcase	Glucocérébrosidases
GEF	Guanine exchange factors
Grb2	Growth factor receptor-bound protein
H	6-hydroxy sphingosine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HA	Acide hyaluronique
HAS3	Hyaluronic acid synthase 3
hBD	Human beta-defensins
HES	Hémalun-Eosine-Safran
HRP	Peroxydase de raifort
HSE	Peaux humaines reconstruites
hTERT	Sous-unité catalytique de la télomérase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDEC	Inflammatory dendritic epidermal cells
IGA	Investigator's Global Assessment
IgE	Immunoglobulines E
IGF	Insulin growth factor
IL	Interleukine
ILC	Cellules lymphoïdes innées
IRS	Insulin receptor substrate

IVL	Involucrine
J11	Jour 11
JAK	Janus kinase
JAM	Junctional adhesion molecule
JH	JAK homology
K10	Kératine 10
K14	Kératine 14
KD	Knock-Down
KLK	Kallikréine
KO	Knock-Out
LEKTI	Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor
LOR	Loricrine
LPP	Phase de périodicité longue
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinases
MUPP1	Multi-PDZ domain protein 1
N	Non-hydroxylé
NELL2	Neural EGFL Like 2
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues
NLR	Récepteurs NOD-like
NMF	Facteur d'hydratation naturelle
OR	Odd ratio
P	Phytosphingosine
PAD	Peptidylarginine déiminase
PAM	Peptide antimicrobien
PAM	Protospacer adjacent motif
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCA	Acide pyrrolidone carboxylique
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT of transcription
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PTP	Protein tyrosine phosphatase
RHE	Epidermes humains reconstruits
RNP	Ribonucléoprotéines
S	Sphingosine
SCORAD	SCORing Atopic Dermatitis
SDS	Dodécylsulfate de sodium
sgRNA Seq	Single cell RNA sequencing
SHP	SH2-containing tyrosine phosphatase
Smase	Sphingomyélinases
snoARN	Small nucleol ARN
SOCS	Suppressor of cytokine signaling

Sos	Son of sevenless
SPP	Phases de périodicité courte
SPR/SPRR	Petites protéines à proline
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAD	Transactivating domain
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
TCR	T cell receptor
TEER	Résistance électrique transépithéliale
Teff	Lymphocytes Th effecteurs
TGF β	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
Treg	Lymphocytes T régulateurs
Trm	Lymphocyte T résidents mémoires
TSG-6	TNF-stimulated gene-6
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
UCA	Acide urocanique
ZO	Zonula occludens

Table des matières

PREAMBULE	9
INTRODUCTION	13
1. La peau	15
1.1. L'hypoderme	15
1.2. Le derme	16
1.3. L'épiderme.....	17
1.3.1. La lame basale.....	18
1.3.2. La couche basale	19
1.3.3. La couche épineuse	20
1.3.4. La couche granuleuse	20
1.3.5. La couche cornée.....	22
1.3.6. La desquamation	24
1.4. La barrière.....	24
1.4.1. La barrière physique.....	25
1.4.2. La barrière chimique	28
1.4.3. La barrière biologique	29
1.4.4. Le système immunitaire inné cutané	29
2. La dermatite atopique.....	31
2.1. La prévalence.....	31
2.2. Les symptômes	32
2.2.1. Les manifestations cliniques	32
2.2.2. Les caractéristiques histologiques.....	33
2.2.3. La marche atopique	34
2.2.4. Les manifestations psychosociales.....	35
2.3. L'étiologie	36
2.3.1. L'altération de la barrière.....	38
2.3.2. La dérégulation du système immunitaire	40
2.3.3. Les hypothèses dans l'initiation du cercle vicieux.....	42
3. Les interleukines 4 et 13 et leurs récepteurs	43
3.1. Les interleukines.....	43
3.2. Les récepteurs	44
3.2.1. Le récepteur de type I IL4R α /IL-2R γ	45
3.2.2. Le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1.....	49
3.2.3. Le récepteur IL-13R α 2.....	50
3.3. Les expressions cellulaires des récepteurs.....	52

3.4.	Les similitudes et les différences d'effets biologiques entre les IL-4 et IL-13	53
3.5.	Les inhibiteurs naturels de l'activation des récepteurs.....	53
4.	Les traitements contre la dermatite atopique	54
4.1.	Les anticorps.....	58
4.1.1.	Les anticorps qui ciblent IL-4R α : le dupilumab	58
4.1.2.	Les anticorps qui ciblent IL-13 : le tralokinumab et le lébrikizumab	59
4.2.	Les inhibiteurs de JAK	60
5.	Les modèles de dermatite atopique	62
5.1.	Les modèles <i>in vivo</i>	62
5.2.	Les modèles <i>in vitro</i>	63
5.3.	Le modèle RHE de DA et le rôle des interleukines 4 et 13	65
	OJECTIFS	69
	RESULTATS	73
	Publication en soumission.....	79
	DISCUSSION	109
1.	Les modèles utilisés et leurs limites.....	111
2.	Etude de l'expression d'IL-2R γ par les kératinocytes	116
3.	Etude de la formation du récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ fonctionnel	117
4.	Etude du rôle d'IL-2R γ dans l'altération de la barrière épidermique.	121
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	127
	ANNEXES	133
	REFERENCES.....	137

PREAMBULE

La dermatite atopique (DA) est une maladie de la peau caractérisée par une altération de la barrière épidermique, induite notamment par les interleukines (IL) 4 et 13 via l'activation du récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1, le seul récepteur de ces interleukines qui soit exprimé par les kératinocytes. IL-4 est toutefois capable d'activer le récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ mais dont l'expression se trouve restreinte aux cellules hématopoïétiques. Cependant, des données transcriptomiques collectées par *microarray* ont suggéré une expression d'IL-2R γ par les kératinocytes au niveau d'épidermes quand ils sont stimulés par exposition aux IL-4, IL-13 et IL-25. Cette observation a initié notre recherche qui visait à découvrir la fonction de cette sous-unité de récepteur quant à un rôle éventuel dans l'altération du phénotype des kératinocytes eux-mêmes et l'altération de la barrière épidermique. Cette recherche est l'objet de notre thèse rapportée en trois parties majeures : l'introduction, les résultats et la discussion qui s'y rapporte.

L'introduction remet en contexte la physiologie de la peau et de sa barrière épidermique. Puisqu'une altération de la barrière épidermique est retrouvée dans la DA, la prévalence, les symptômes et l'étiologie de la DA seront décrits. Comme les IL-4 et IL-13 jouent un rôle majeur dans la DA, un chapitre sur ces interleukines et sur les récepteurs qu'ils activent est ajouté. Par la suite, les traitements contre la DA qui ciblent les effets des IL-4 et IL-13 soit en ciblant les récepteurs/ligands soit en inhibant les voies de signalisation activées par ces interleukines seront détaillés dans cette introduction. Pour la compléter, j'expliquerai brièvement les modèles existant pour étudier la DA, ce qui conduit à parler de l'analyse transcriptomique par *microarray* d'épidermes humains reconstruits stimulés par exposition aux IL-4, IL-13 et IL-25, un des modèles *in vitro* des altérations épidermiques de la DA. Comme expliqué dans le premier paragraphe, ce *microarray* montre une induction par les kératinocytes d'IL-2R γ , sous-unité de récepteur normalement uniquement exprimée par les cellules hématopoïétiques.

La partie résultats de cette thèse reprend l'article qui est en cours de soumission au journal « *Experimental Dermatology* ». Actuellement, l'article a été re-soumis après y avoir apporté des modifications et compléments demandés par les pairs. L'article est divisé en deux objectifs. Le premier est l'étude des conditions qui régissent l'expression d'IL-2R γ par les kératinocytes et le second a investigué la fonction d'IL-2R γ dans les épidermes, ainsi que sa relation avec la barrière épidermique et ses altérations.

La discussion passe en revue les résultats obtenus lors de ma recherche pour les commenter en rapport avec la littérature, et lister les perspectives nouvelles ouvertes par notre recherche. La partie discussion porte sur quatre points majeurs, les modèles utilisés et leurs limites, l'étude de l'expression d'IL-2R γ par les kératinocytes, la formation du récepteur de

type I IL-4R α /IL-2R γ fonctionnel, et enfin le rôle d'IL-2R γ dans l'altération de la barrière épidermique.

Cette thèse élargit la connaissance et la compréhension des rôles des récepteurs aux IL-4 et IL-13 au niveau des kératinocytes épidermiques. Elle permet également de contribuer à la compréhension des mécanismes des nouveaux traitements contre la DA qui ciblent spécifiquement l'activation des récepteurs aux IL-4 et IL-13.

INTRODUCTION

1. La peau

La peau, organe le plus volumineux de l'organisme, est la première ligne de défense contre le monde extérieur ce qui lui confère un rôle important de barrière (Gallo and Hooper, 2012, Ojeh et al., 2015). La peau est constituée de trois couches nommées hypoderme, derme et épiderme (**Figure 1**) (Wong et al., 2016).

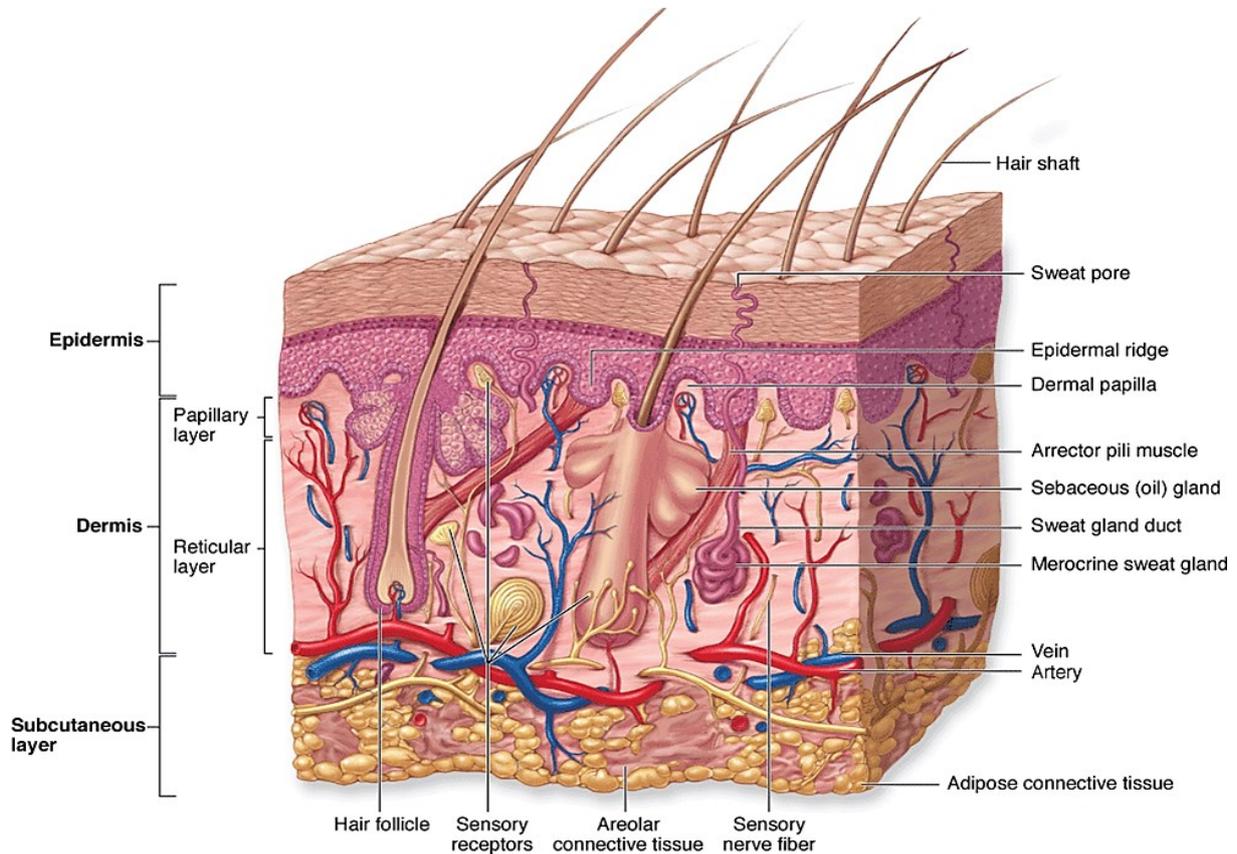


Figure 1: Représentation schématique de la peau humaine. Le schéma représente les trois couches de la peau; l'hypoderme (tissus conjonctifs aréolaire et adipeux), le derme (dermes papillaire et réticulaire) et l'épiderme. Les appendices de l'épiderme (follicule pileux, glande sébacée et glande sudoripare), la vascularisation (veines et artères) et l'innervation de la peau (fibres nerveuses sensorielles et récepteurs sensoriels) sont également représentées Copyright © The McGraw-Hill Companies.

1.1. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et constitue donc le lien entre la peau et les tissus sous-jacents tels que les muscles et les os (Losquadro, 2017). Cette couche est majoritairement composée d'adipocytes organisés en lobules et séparés par des septa fibreux contenant des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes et quelques fibres de collagène. Ce tissu pauvre en fibres apporte à cette couche des propriétés de résistance mécanique (Kolarsick et al., 2011, Wong et al., 2016). L'hypoderme fournit une isolation corporelle et une réserve d'énergie par l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes (Ali et al., 2013, Kolarsick et al., 2011).

1.2. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif davantage fibreux qui se trouve parcouru par les vaisseaux sanguins qui proviennent d'artères et de veines contenues dans l'hypoderme sur lequel le derme repose. Dès lors, la circulation sanguine du derme fournit l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'épiderme dépourvu de vaisseaux sanguins (Kolarsick et al., 2011, Losquadro, 2017). Le derme contient également des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes pour constituer avec les fibres de collagène et d'élastine sa matrice extracellulaire (MEC), mais aussi des cellules immunitaires et des fibroblastes (Chu, 2012, Rippa et al., 2019). Cette MEC est entre autre constituée de glycoprotéines telles que la fibronectine qui joue un rôle important dans la réparation tissulaire (Tracy et al., 2016). Le derme est un tissu hautement innervé par la présence de corpuscules de Meisner, de Ruffini et de Pacini ainsi que de terminaisons libres de fibres nerveuses qui vont quant à elles jusqu'au niveau de l'épiderme. Ces différents types de nerfs et de terminaisons confèrent au derme une sensibilité tactile, thermique et nociceptive (Tissot et al., 2016).

Par ailleurs, le derme contient les appendices épithéliaux de l'épiderme qui comprennent les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. Les glandes sébacées, productrices de sébum par les sébocytes, sécrètent leurs produits au niveau du follicule pileux qui est responsable du développement du poil (Kolarsick et al., 2011, Shamloul and Khachemoune, 2021). Le poil pourra donc étaler les sécrétions de ces glandes à la surface de la peau afin d'ajouter le sébum à la barrière cutanée hydrophobe (Cao et al., 2019). Puisque le sébum est composé de lipides (triglycérides, diglycérides, cérides, squalènes, cholestérol et acides gras libres), il confère à la peau une imperméabilité à l'eau et il fournit une protection contre le monde extérieur par la formation d'un manteau acide à partir des acides gras libres. Suite à une exposition aux pathogènes, les sébocytes sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (Cao et al., 2019, Shamloul and Khachemoune, 2021). Les glandes sudoripares apocrines, fonctionnelles à partir de la puberté, sécrètent également leurs contenus dans le follicule pileux. Ces glandes, localisées au niveau des aisselles, des seins, du visage, du cuir chevelu et du périnée, sont capable de produire une substance riche en phéromones, responsable de l'odeur corporelle (Baker, 2019). Les glandes sudoripares eccrines, dont l'ouverture est directement présentée à la surface de la peau, quant à elles, sécrètent la sueur pour réguler par son évaporation la température de l'organisme (Kolarsick et al., 2011).

Le derme peut être divisé en deux parties, le derme réticulaire et le derme papillaire (Kolarsick et al., 2011, Rippa et al., 2019). Le **derme réticulaire** est formé d'une MEC

conjonctive dense composée de collagène de type I synthétisé par les fibroblastes. Les fibres de collagène sont organisées en un maillage très serré. Les fibroblastes produisent également des fibres élastiques organisées sur base d'élastine, une protéine qui induit l'élasticité mais qui est peu résistante à la déformation. Le **derme papillaire**, quant à lui, possède une MEC conjonctive lâche composée de fibres de collagène des types I et III dont l'alignement des fibres est moins prononcé. La partie papillaire du derme porte son nom car elle forme les papilles dermiques, protubérances du derme qui s'enfoncent dans l'épiderme. Inversement, l'épiderme forme des crêtes épidermiques dans le derme.

1.3. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle en contact direct avec l'extérieur et il joue donc un rôle important de barrière face aux micro-organismes et aux allergènes notamment et contre la perte de fluide transépithélial. Bien que 80 % des cellules contenues dans cette couche soient des kératinocytes, l'épiderme contient également des cellules de Merkel, des cellules de Langerhans et des mélanocytes. L'épiderme repose sur une lame basale et est divisé en quatre couches distinctes, à savoir basale, épineuse, granuleuse et cornée. Les kératinocytes prennent 14 jours pour migrer de la couche basale à la couche granuleuse et 14 autres jours pour atteindre la couche la plus superficielle de la couche cornée où se produit le processus de desquamation. Il faut donc 28 jours pour un renouvellement complet de la peau (**Figure 2**) (Chu, 2012, Kolarsick et al., 2011).

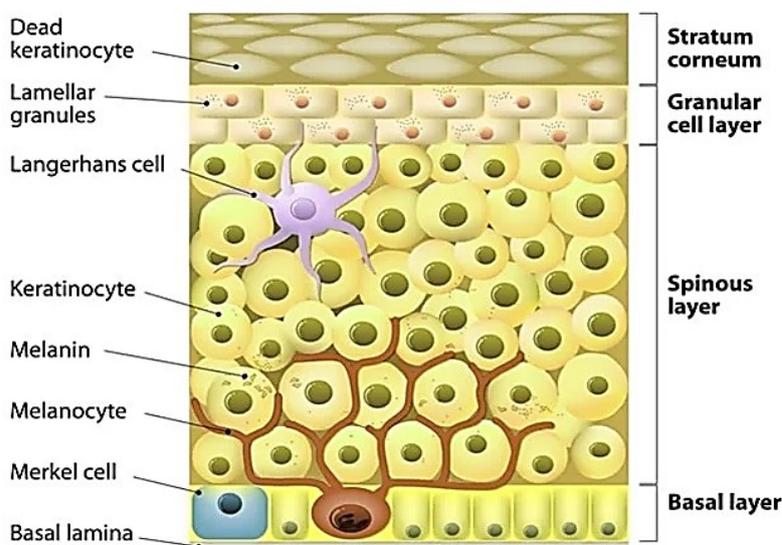


Figure 2: Représentation schématique de l'épiderme. Le schéma représente l'épiderme qui repose sur une lame basale, les quatre couches de l'épiderme (couches basale, épineuse, granuleuse et cornée) et les cellules présentes dans l'épiderme (kératinocytes, mélanocytes, cellules de Merkel et cellules de Langerhans) (Nocchi et al., 2017).

1.3.1. La lame basale

La lame basale qui forme la jonction entre le derme et l'épiderme est produite par les fibroblastes du derme et les kératinocytes de la couche basale qui synthétisent, tous deux, du collagène de type IV et VII et de la laminine (Chan, 1997). Les kératinocytes sont ancrés à la lame basale par des hémidesmosomes qui sont composés de plakines, d'intégrines $\alpha\beta4$, de collagènes de type XVII, de CD151 et de laminine 332 (**Figure 3**) (Todorović et al., 2013). Les hémidesmosomes lient les filaments intermédiaires du cytosquelette des kératinocytes au collagène de type VII de la lame basale. Les intégrines $\alpha\beta4$ jouent également un rôle dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la survie et la migration des kératinocytes dans l'épiderme (Eckhart et al., 2013, Todorović et al., 2013). Cette lame basale étant poreuse, elle permet le transfert de cytokines, de facteurs de croissance, de nutriments et d'oxygène du derme à l'épiderme, ainsi que l'évacuation du CO_2 et des déchets de l'épiderme au derme (Kolarsick et al., 2011).

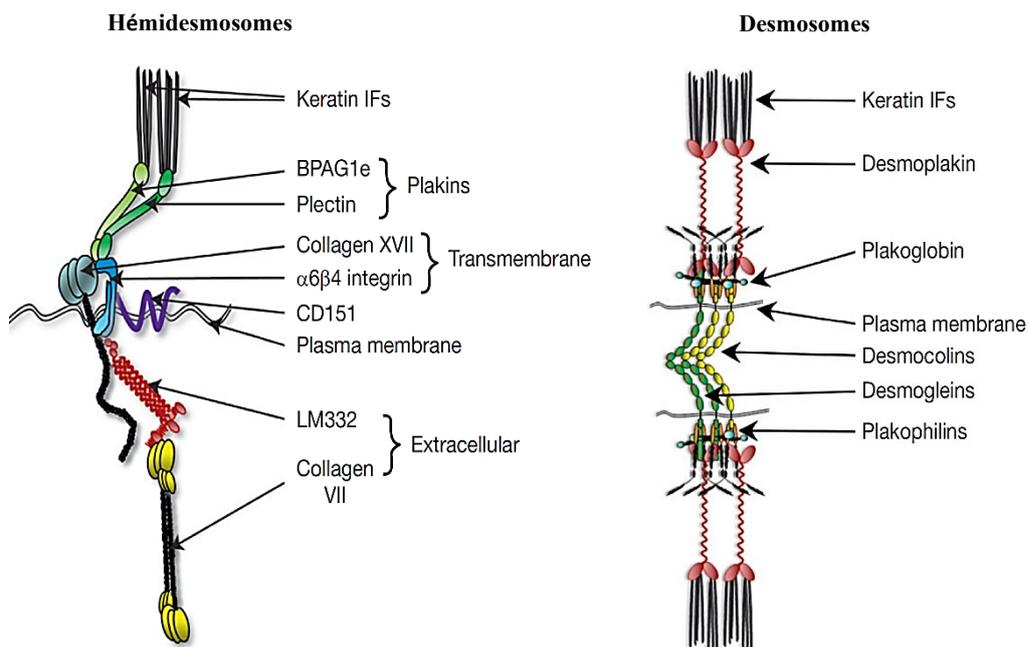


Figure 3: Hémidesmosomes et desmosomes. Les hémidesmosomes sont composés de plakines (plectine et dystonine/BPAG1e), d'intégrines $\alpha\beta4$, de collagènes des types VII et XVII, de CD151 et de laminines 332. Les hémidesmosomes lient d'une part les filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette des kératinocytes et d'autre part le collagène de type VII présent dans le derme. Les desmosomes sont composés de desmoplakines, de plakoglobines, de plakophilines, de desmocollines et de desmoglénines. Les desmosomes lient les filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette de deux kératinocytes adjacents (Todorović et al., 2013).

1.3.2. La couche basale

La couche basale, qui repose sur la lame basale, est constituée d'une seule couche proliférative de kératinocytes cylindriques avec un noyau ovale et allongé (Chu, 2012, Kolarsick et al., 2011). En plus des hémidesmosomes qui lient les kératinocytes de la couche basale à la lame basale, ces cellules adhèrent entre elles grâce aux desmosomes, ce qui leur confère une résistance au stress mécanique. Les desmosomes sont formés de desmoplakines, de plakoglobines, de plakophilines, de desmocollines et de desmoglénines qui lient la surface des cellules à la kératine du cytosquelette (**Figure 3**) (Koch and Roop, 2004, Todorović et al., 2013).

Les kératinocytes de la couche basale expriment les kératines 5 et 14. Ces kératines jouent un rôle important dans la structure cellulaire, dans la résistance mécanique ainsi que dans la prolifération des kératinocytes de cette couche en formant les filaments intermédiaires (Alam et al., 2011, Koch and Roop, 2004). La couche basale se renouvelle par divisions asymétriques ou symétriques de cellules souches (CS). En effet, une CS est capable de se diviser soit en une CS et une cellule progénitrice (CP) soit en deux CS ou en deux CP. Les CP qui ont un taux de prolifération plus rapide que les CS subissent également des divisions asymétriques ou symétriques. Une CP peut donner une CP et une cellule différenciée, deux CP ou deux cellules différenciées. La CS « mère » sert d'ancrage pour ses cellules « filles » (Eckhart et al., 2013, Mascré et al., 2012).

Deux autres types cellulaires sont présents dans la couche basale, les cellules de Merkel et les mélanocytes (Chu, 2012, Kolarsick et al., 2011). Les **cellules de Merkel** sont des mécanorécepteurs à adaptation lente de type I qui se trouvent aux sites de sensibilité tactile élevé. Dès lors, une petite déformation est suffisante pour activer les canaux de type piézo qui permettent le passage d'ion calcium dans la cellule de Merkel. L'augmentation de la concentration en ion calcium provoque l'exocytose de neurotransmetteurs tels que la sérotonine aux neurones afférents de type A β pour générer un potentiel d'action et relayer le signal au cerveau (Woo et al., 2015). Les **mélanocytes**, dont le corps se localise entre les kératinocytes de la couche basale, sont des cellules en forme d'étoile portant des dendrites qui s'enroulent autour des kératinocytes de la couche épineuse. Ces cellules produisent des mélanosomes, vésicules remplies de mélanine, qui migrent par cytotricie dans le cytoplasme des kératinocytes. La mélanine, positionnée au sommet des noyaux, protège les kératinocytes d'une exposition aux rayonnements UV. Les UV infiltrent la peau et induisent donc la production de la mélanine qui pigmente la peau (Chu, 2012, Kolarsick et al., 2011).

1.3.3. La couche épineuse

Les kératinocytes de la couche basale se trouvent recrutés vers la différenciation terminale et migrent donc dans la couche épineuse. Cette couche est composée de 5 à 10 couches de kératinocytes polygonaux qui deviennent de plus en plus aplatis (Chu, 2012, Kolarsick et al., 2011). Les kératines 5 et 14 disparaissent pour laisser place à l'expression des kératines 1 et 10 qui forment un nouveau réseau de filaments intermédiaires très robuste dans les kératinocytes (Alam et al., 2011, Koch and Roop, 2004). La couche épineuse porte son nom car les kératinocytes sont liés entre eux par de nombreux desmosomes dont l'observation au microscope électronique est assimilée à des épines (Chu, 2012, Kolarsick et al., 2011).

Des cellules de Langerhans sont également localisées dans cette couche (Kolarsick et al., 2011). Ce sont des cellules présentatrices d'antigène qui sont produites par la moelle osseuse (Collin and Milne, 2016). Les prolongements de ces cellules sont capables de passer les jonctions serrées de la couche granuleuse afin de capturer les micro-organismes et les allergènes et appréter les antigènes pour les présenter ensuite aux lymphocytes T après avoir migré dans les ganglions lymphatiques (Yokouchi and Kubo, 2018).

1.3.4. La couche granuleuse

Les kératinocytes de la couche granuleuse renferment dans leur cytoplasme des granules de kératohyalines. Ces granules contiennent principalement de la profilaggrine, protéine hautement phosphorylée qui est composée d'une répétition de dix à douze filaggrines liées par des liaisons hydrophobes (Brettmann and de Guzman Strong, 2018, Eckhart et al., 2013). La profilaggrine est clivée en unités de filaggrine (FLG) par des protéases (**Figure 4**). La filaggrine mène à l'agrégation des filaments de kératine pour faciliter l'aplatissement des cellules lors de la kératinisation, ce qui confère un cytosquelette extrêmement robuste dans les cellules cornées et y induit donc des propriétés de résistance mécanique (Kim and Lim, 2021). Après désimination par des peptidylarginines déiminases (PAD), la filaggrine peut être à son tour dégradée par la caspase 14, entre autres, en métabolites d'acides aminés tels que l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA) et l'acide urocanique (UCA) (Cau et al., 2018, Kim and Lim, 2021). Ces acides diminuent donc le pH dans la couche cornée, dont la régulation est importante pour l'activité d'enzymes actives dans la barrière cutanée (Elias, 2007). Ces acides aminés libres, aussi appelés facteurs d'hydratation naturelle, sont capables de lier l'eau et participent ainsi à l'hydratation de la peau (Kim and Lim, 2021, Rawlings and Harding, 2004). L'UCA est également capable d'absorber les UV-B du soleil et participe donc à la photoprotection cutanée (Cau et al., 2018).

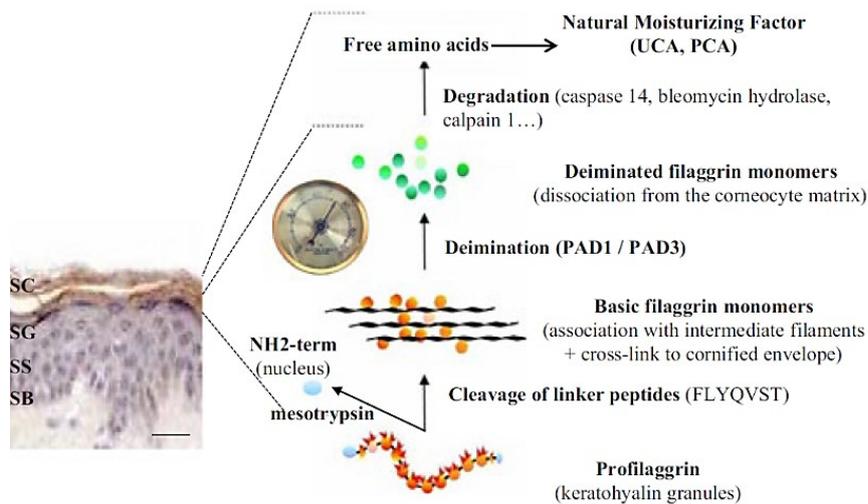


Figure 4: Dégradation de la profilaggrine en filaggrine et en acides aminés libres. La profilaggrine est dégradée en unités de filaggrine qui se lient aux filaments de kératine afin d'induire leur agrégation. Les monomères de filaggrine, désiminés par des PAD, se dissocient des filaments de kératine et sont dégradés par des protéases (caspase 14, calpain 1 et bleomycine hydrolase) en métabolites d'acides aminés (PCA et UCA). L'extrémité N-terminale de la profilaggrine transloque dans le noyau et jouerait un rôle dans la dégradation du noyau lors de la cornification (Cau et al., 2018).

En outre, les granules de kératohyalines contiennent certaines protéines qui constituent l'enveloppe cornée (**voir section 1.3.5**) telles que la loricine (LOR) et l'hornerine. Cette dernière possède des similitudes avec la filaggrine car elle appartient aussi à la famille « S100A-fused protein » (Henry et al., 2011). Les granules renferment également de la profilaggrine-2. Cette protéine est constituée de répétitions de domaine de type-A et de type-B qui possèdent des homologies avec respectivement l'hornerine et la filaggrine. De ce fait, le domaine type-A est considéré comme un composant de l'enveloppe cornée alors que le domaine type-B joue les mêmes rôles que ceux de la filaggrine décrits ci-dessus (Alberola et al., 2019, Le Lamer et al., 2015, Wu et al., 2009).

Au cours de leur différenciation, les kératinocytes produisent des corps lamellaires contenant les lipides qui seront par la suite sécrétés et modifiés dans la couche cornée. Ces vésicules possèdent donc du cholestérol, des phospholipides, des sphingomyélines et des glucosylcéramides. Dans la couche cornée, les sphingomyélines et les glucosylcéramides sont transformées en céramides, respectivement grâce aux sphingomyélinases et aux glucocérobrosidases, enzymes contenues dans les corps lamellaires. Les phospholipides, quant à eux, sont transformés en acides gras libres ou en glycérol (Eckhart et al., 2013, Feingold, 2012). En plus, ces vésicules transportent des enzymes importantes dans le processus de desquamation telles des protéases et des inhibiteurs de protéases (Kolarsick et al., 2011, Milstone, 2004).

A noter que les kératinocytes de la couche granuleuse sont liés entre eux par des jonctions serrées (**voir section 1.4.1.2**) qui préviennent la perte de fluide transépithéliale (Basler et al., 2016, Proksch et al., 2008).

1.3.5. La couche cornée

Les kératinocytes de la couche granuleuse subissent un processus de cornification (aussi appelé kératinisation terminale) caractérisé par la différenciation des cellules en cornéocytes. Les cornéocytes qui sont des cellules mortes, perdent leurs organites et leur noyau. Par ailleurs, le réseau de kératines intracellulaires des cornéocytes se densifie pour former une matrice dense et la membrane plasmique est remplacée par une enveloppe cornée (**Figure 5**) (Candi et al., 2005, Eckhart et al., 2013). La loricine, l'involucrine, la filaggrine-2, l'hornerine et les petites protéines à proline constituent la face interne de l'enveloppe cornée tandis que les lipides en forment la face externe. Les protéines sont liées grâce à des ponts disulfures par la sulfhydryl oxydase. Des transglutaminases forment des liaisons covalentes entre une glutamine d'une protéine et une lysine d'une deuxième protéine ou entre une glutamine d'une protéine et des acylcéramides (Alberola et al., 2019, Chu, 2012, Coderch et al., 2003, Ishida-Yamamoto and Iizuka, 1998). Ces liaisons s'établissent grâce aux ions calcium libérés par la dégradation du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Candi et al., 2005, Eckhart et al., 2013).

Puisqu'elle est en contact direct avec l'extérieur, la couche cornée a été traditionnellement représentée comme un modèle de brique/mortier qui forme une barrière compétente. Les cornéocytes représentent les briques et les lipides excrétés par les corps lamellaires désignent le mortier (Nemes and Steinert, 1999, Nocchi et al., 2017). Les cornéocytes sont liés entre eux par des cornéodesmosomes qui sont constitués de périplakines, d'envoplakines de plakoglobines, de plakophilines, de desmocollines, de desmogléines et de cornéodesmosines. (**Figure 5b**). Les cornéodesmosomes sont résistants à la protéolyse et ils confèrent une cohésion entre les cornéocytes dans la couche la plus profonde de la couche cornée qui, de ce fait, est plus compacte (Evora et al., 2021).

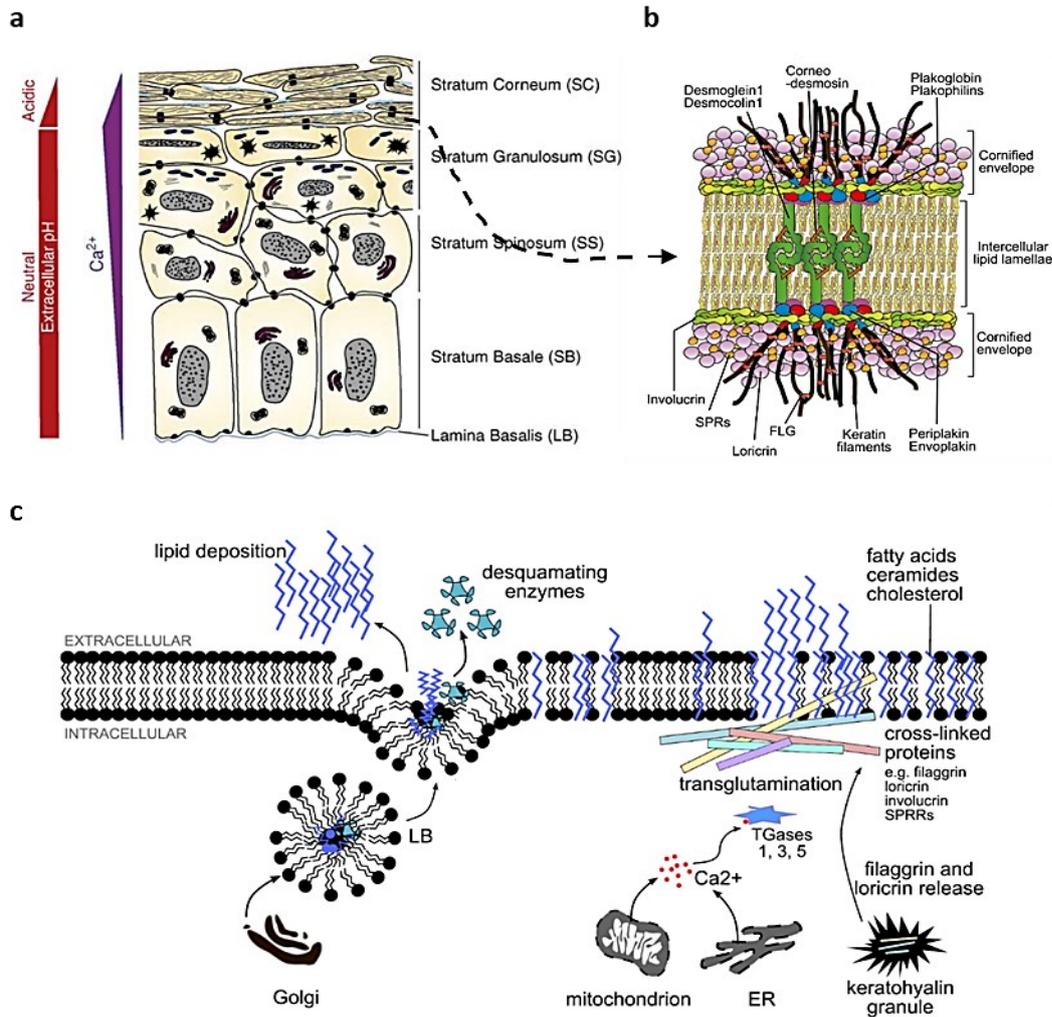


Figure 5: Formation de l'enveloppe cornée. (a) Modélisation de la concentration en ion calcium et de l'acidité dans l'épiderme (Ovaere et al., 2009). (b) Représentation schématique des cornéodesmosomes et de l'enveloppe cornée. Les cornéodesmosomes sont composés de périplakines, d'envoplakines de plakoglobines, de plakophilines, de desmocollines, de desmogléines et de cornéodesmosines. Les cornéodesmosomes lient les filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette de deux kératinocytes adjacents. L'enveloppe cornée contient de la loricrine, de l'involucrine et de petites protéines à proline (SPR). La filaggrine (FLG) provoque l'agrégation des filaments intermédiaires de kératine (Egawa et al., 2018). (c) Remplacement de la membrane plasmique par l'enveloppe cornée. Lors de la différenciation épidermique, les corps lamellaires formés à partir de l'appareil de Golgi sécrètent les lipides (céramides, acides gras et cholestérol) et les enzymes de desquamation dans les espaces intercellulaires de la couche cornée. Simultanément, la filaggrine et la loricrine sont relarguées par les granules de kératohyaline. Les protéines (filaggrine, loricrine, involucrine et petites protéines à proline (SPRRs)) sont liées entre elles et aux lipides par l'activation (dépendante des ions calcium libérés lors de la dégradation des mitochondries et du réticulum endoplasmique (ER)) des transglutaminases pour former l'enveloppe cornée (Eckart et al., 2008).

1.3.6. La desquamation

La desquamation est un processus actif qui permet de détacher les cornéocytes de la couche cornée sans friction ou grattage. Ce processus constitue une ligne de défense générale en éliminant les cellules potentiellement infectées (Milstone, 2004). La desquamation se réalise grâce à des enzymes telles que les kallikréines (KLK5 et KLK7) contenues dans les corps lamellaires (Egawa and Kabashima, 2018). Bien que les kallikréines aient une activité optimale à un pH neutre, ces protéinases sont capables de dégrader les cornéodesmosomes avec une activité régulée dans la couche la plus superficielle de la couche cornée qui est à pH acide. Dans la couche la plus profonde de la couche cornée qui est à pH neutre, l'activité des kallikréines est régulée par les anti-protéases telles que la protéine LEKTI, également sécrétées par les corps lamellaires (Deraison et al., 2007). En se rapprochant de la couche la plus superficielle, le pH diminue, ce qui altère l'activité des anti-protéases. Les KLK5 et KLK7 peuvent donc dégrader les cornéodesmosomes pour détacher les cornéocytes de l'épiderme (Deraison et al., 2007, Egawa and Kabashima, 2018, Ovaere et al., 2009).

1.4. La barrière

Comme l'épiderme est en contact direct avec l'extérieur, l'établissement d'une barrière épidermique est essentiel pour la survie de l'organisme humain. La barrière protège contre les passages « *outside-in* » et « *inside-out* » (**Figure 6**). La barrière contre les passages *outside-in* protège contre l'entrée dans l'organisme de micro-organismes, d'allergènes ou de produits chimiques. Tandis que la barrière contre le passage *inside-out* empêche la perte de fluide transépithéliale et donc la déshydratation de la peau. Plusieurs éléments participent à la barrière épidermique tels que la couche cornée, les jonctions serrées, le pH, le microbiote, les peptides antimicrobiens (PAM), les facteurs d'hydratation naturelle (NMF) et le système immunitaire cutané (Basler et al., 2016, Eckhart et al., 2013).

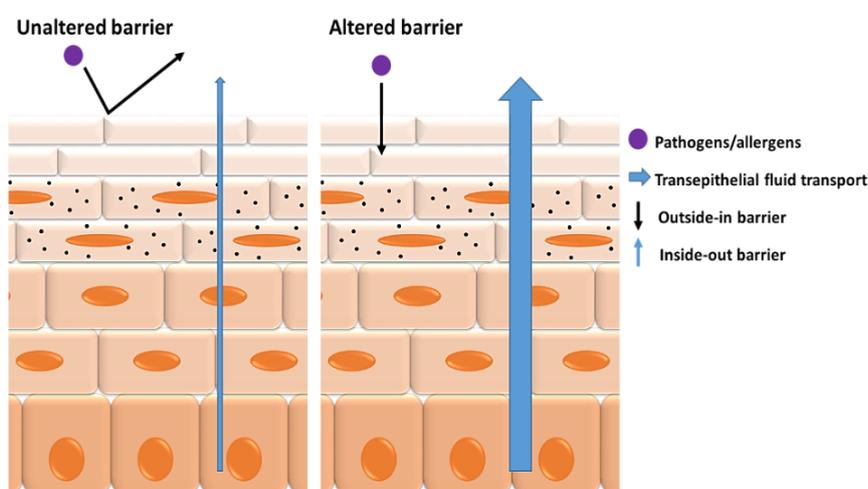


Figure 6: Modèle de barrière dans les directions *outside-in* et *inside-out*. La barrière contre le passage *outside-in* empêche les pathogènes et allergènes de rentrer dans l'épiderme alors que la barrière contre le passage *inside-out* prévient la perte de fluide transépithéliale.

1.4.1. La barrière physique

La barrière dite physique est constituée de la couche cornée et des jonctions serrées. Cette barrière fonctionne à la fois dans les directions *outside-in* et *inside-out* (Basler et al., 2016).

1.4.1.1. La couche cornée

La couche cornée, comme mentionné plus haut, forme l'équivalent d'un mur compact grâce aux lipides entourant les cornéocytes. Ces lipides forment une substance cristalline composée principalement de céramides, de cholestérols et d'acides gras libres dont les précurseurs ont été sécrétés par les corps lamellaires (**voir section 1.3.4**). 50 % des lipides présents dans la couche cornée sont des céramides qui sont formés par la liaison d'une base sphingoïde (sphingosine (S), dihydrosphingosine (DS), phytosphingosine (P) et 6-hydroxy sphingosine (H)) et d'un acide gras (non-hydroxylé (N), α -hydroxylé (A) et estérifié- ω -hydroxylé avec de l'acide linoléique (EO)) (**figure 7a**) (van Smeden et al., 2014). L'acide gras estérifié ω -hydroxycéramide forme les acylcéramides qui sont liés par la TGM1 aux protéines de l'enveloppe cornée. Comme ces céramides contiennent de longues chaînes d'acides gras, ils servent d'ancrage aux autres céramides ainsi qu'aux acides gras libres et au cholestérol pour former une couche de lipides ordonnée (Evora et al., 2021, Kim and Lim, 2021). La couche lipidique présente une organisation lamellaire unique en forme de feuillet lipidique (**Figure 7b**). Chaque feuillet comprend une phase fluide due au cholestérol et aux acylcéramides entre deux phases cristallines pour former une structure trilamellaire d'une distance approximative de 13 nm (phase de périodicité longue (LPP)). Quelque fois, il est également retrouvé dans la matrice lipidique de la couche cornée des phases de périodicité courte (SPP) d'une taille approximative de 6 nm (Coderch et al., 2003, Kapoor et al., 2017, van Smeden et al., 2014). La répétition des LPP et SPP forme une multicouche lipidique perpendiculaire aux cornéocytes. L'organisation latérale de ces couches (**Figure 7c**) présente une organisation ordonnée principalement dense (orthorhombique) ou parfois moins dense (hexagonale) (van Smeden et al., 2014). La composition en lipides de la couche cornée, l'organisation lamellaire et l'organisation latérale est importante dans l'efficacité de la barrière épidermique qui empêche une diffusion trop rapide des substances (Coderch et al., 2003, van Smeden et al., 2014). Le cholestérol sulfate est, quant à lui, essentiel pour la cohésion entre les cornéocytes et il sera donc désulfaté préalablement à la desquamation (Coderch et al., 2003).

La rigidité des cornéocytes due à l'enveloppe cornée et l'agrégation de la kératine par la filaggrine rajoutent une résistance mécanique à la couche cornée, caractéristique importante pour la formation de la barrière. Par ailleurs, les cornéodesmosomes qui relient entre elles les

cellules mortes contiennent de la cornéodesmosine, protéine qui augmente l'adhésion entre les cellules (Evora et al., 2021, Yasuo, 2015).

Fatty acid \ Sphingoid base	Non-hydroxy fatty acid, [N]	α -hydroxy fatty acid, [A]	Esterified ω -hydroxy fatty acid, [EO]
Dihydrosphingosine, [dS]	[NdS]	[AdS]	[EOdS]
Sphingosine, [S]	[NS]	[AS]	[EOS]
Phytosphingosine, [P]	[NP]	[AP]	[EOP]
6-hydroxy sphingosine, [H]	[NH]	[AH]	[EOH]

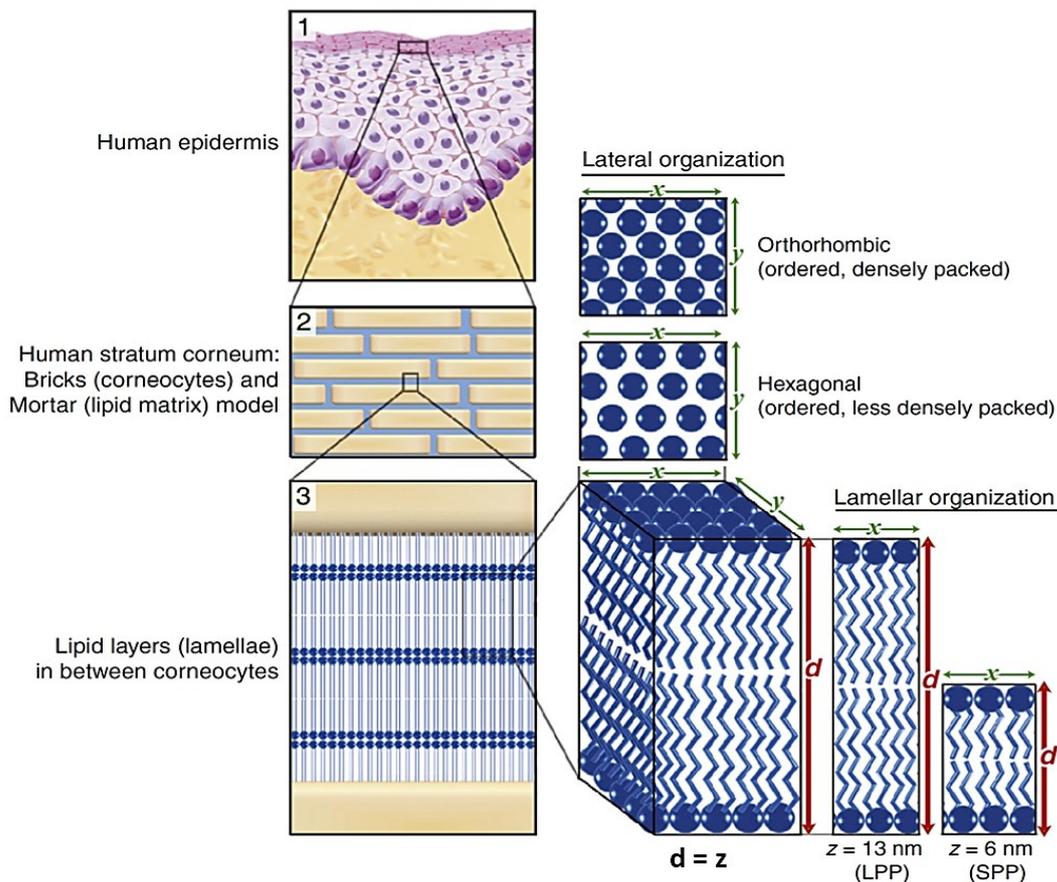


Figure 7 : Composition et organisation de la couche cornée. (a) Les céramides sont composés d'une base sphingoïde (dihydrosphingosine (dS), sphingosine (S), phytosphingosine (P) et 6-hydroxy sphingosine (H)) et d'un acide gras (non-hydroxylé (N), α -hydroxylé (A) et estérifié- ω -hydroxylé (EO)). La nomenclature d'un céramide est l'acronyme de l'acide gras suivi de l'acronyme de la base sphingoïde. (b) Organisation lamellaire (plan xy) de la couche lipidique. La couche la plus superficielle de l'épiderme est la couche cornée (1) qui est représentée comme un modèle de briques (cornéocytes) / mortier (couche lipidique) (2) L'organisation lamellaire est l'organisation des lipides dans le plan z. La couche lipidique est organisée en feuillet lipidique (lamellae) perpendiculaire aux cornéocytes (3) à des distances répétées (d) de 13 nm (LPP) et de 6 nm (SPP). L'organisation latérale est l'organisation des lipides dans le plan xy. Les lipides présentent une organisation ordonnée très dense (orthorhombique) et une organisation ordonnée moins dense (hexagonale).

1.4.1.2. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées lient les cellules entre elles afin de former une barrière étanche paracellulaire. Plusieurs protéines sont responsables de la formation des jonctions. La disposition des protéines dépend de la localisation des jonctions dans l'épiderme (**Figure 8**) (Basler et al., 2016).

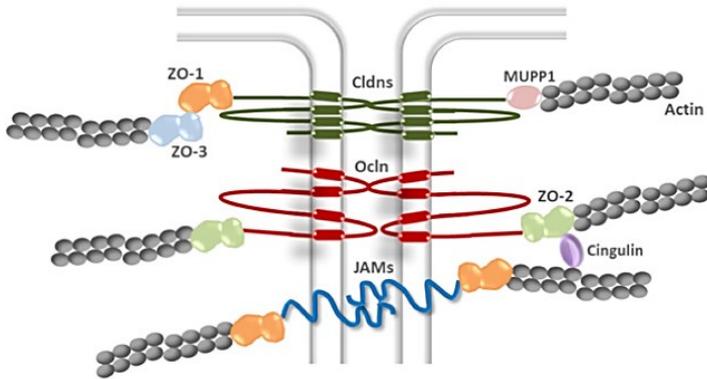


Figure 8: Structure des jonctions serrées. Les jonctions serrées sont formées à partir de protéines transmembranaires (claudines, occludines et JAM) et des protéines cytoplasmiques (ZO, MUPP1, cingulines). Les protéines transmembranaires d'une cellule lient les protéines transmembranaires d'une autre cellule. Les protéines cytoplasmiques se lient d'une part aux protéines transmembranaires et d'autre part aux filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules (Basler et al., 2016)

En général, les protéines des jonctions serrées peuvent être classées en 2 catégories, les protéines transmembranaires et les protéines cytoplasmiques. Les protéines transmembranaires, qui possèdent 1, 3 ou 4 domaines transmembranaires, se lient d'une part à des protéines transmembranaires des cellules adjacentes et d'autre part au domaine PDZ des protéines cytoplasmiques de leurs propres cellules. Les protéines cytoplasmiques se lient également aux filaments intermédiaires du cytosquelette. Les protéines transmembranaires sont des claudines, des occludines ou des *junctional adhesion molecule* (JAM) tandis que les protéines cytoplasmiques sont des zonula occludens (ZO), des cingulines ou *Multi-PDZ domain protein 1* MUPP1 (Basler et al., 2016, Gunzel and Fromm, 2012). MUPP1, JAM-A et les claudines 1 et 7 sont localisées dans toutes les couches vivantes de l'épiderme. Cependant, ZO et la claudine 4 sont localisées dans la sous-couche supérieure de la couche épineuse et dans la couche granuleuse alors que l'occludine et les claudines 2 et 17 se retrouvent dans la couche granuleuse. De ce fait toutes les protéines des jonctions serrées sont présentes dans la couche granuleuse, ce qui confère à cette couche un rôle de barrière plus important que pour les autres couches (Kirschner and Brandner, 2012, Yokouchi and Kubo, 2018).

1.4.2. La barrière chimique

Le pH acide de la peau (pH 4-6 (Ali and Yosipovitch, 2013)) est dû à la dégradation de la filaggrine en métabolite d'acides aminés, à l'hydrolyse de phospholipides en acides gras libres ou encore à l'échange Na^+/H^+ via des pompes (Behne et al., 2002, Elias, 2015). L'acidification de l'épiderme est importante pour plusieurs processus biologiques qui amènent à une homéostasie de la barrière épidermique. En effet, le pH régule l'activité de sphingomyélinases, de glucocérébrosidases, d'enzymes responsables de la desquamation et d'anti-protéases telles que la protéine *Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor* (LEKTI) (Ali and Yosipovitch, 2013, Deraison et al., 2007). De plus, le pH acide de la couche cornée est un environnement hostile contre le microbiote pathogène tandis que cet environnement est favorable pour le microbiote commensal (Ali and Yosipovitch, 2013). Il contribue également à l'exocytose des lipides et des enzymes présents dans les corps lamellaires et à l'activité des PAM (Elias, 2007, 2015).

Les PAM sont des peptides également capables d'exercer une action de défense contre les micro-organismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites (Clausen and Agner, 2016). Comprenant les B-cathélicidines, les β -défensines, les S100A et les RNases, les PAM sont produits par les kératinocytes, les glandes sudoripares, les sébocytes, les lymphocytes T, les mastocytes et les phagocytes. Bien qu'ils soient exprimés dans la peau saine afin d'exercer une activité basale de protection, ils sont également régulés positivement ou négativement après une infection, une blessure ou une inflammation (Gallo and Hooper, 2012, Niyonsaba et al., 2017). Puisque les PAM sont chargés positivement, ils ciblent des structures chargées négativement telles que les phospholipides ou les peptidoglycanes localisés à la surface des bactéries. Les PAM peuvent donc s'ancrer dans la paroi pour y former des pores et ainsi détruire le pathogène. Par ailleurs, les PAM sont capables d'entrer dans la bactérie pour empêcher la formation de la paroi cellulaire et inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (Brogden, 2005). En plus de leurs activités antimicrobiennes, les PAM sont capables de recruter des cellules dendritiques et des lymphocytes T mémoires. Ils stimulent aussi les kératinocytes afin qu'ils prolifèrent et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Les peptides seuls ne sont pas très efficaces contre les microbes. Néanmoins, *in vivo*, ceux-ci agissent en synergie afin d'augmenter leur efficacité (Clausen and Agner, 2016).

Les NMF, comme leur nom l'indique, sont des petites molécules qui lient l'eau afin de procurer une certaine hydratation à la peau (Rawlings and Harding, 2004). La principale source des NMF est le produit de dégradation de la filaggrine. En effet, cette protéine est dégradée

dans les cornéocytes en acides aminés libres (Cau et al., 2018). D'autres NMF existent tels que les sucres, le lactate, l'urée ou encore l'acide hyaluronique (Evrard et al., 2021b, Rawlings and Harding, 2004).

1.4.3. La barrière biologique

Le microbiote cutané constitué principalement de bactéries et de champignons colonise la peau dès la naissance. A ce moment de la vie, le nouveau-né développe son système immunitaire (Scharschmidt, 2017). La maturation des lymphocytes T se déroule dans le thymus par la sélection positive (cortex ; sélection de lymphocytes T capables de reconnaître le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I ou de type II) et la sélection négative (médullaire ; mort cellulaire de lymphocytes T dont leur *T cell receptor* (TCR) à une haute affinité pour les antigènes du soi) (Forsdyke, 2015). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui sont impliqués dans la tolérance périphérique sont également sélectionnés dans le thymus. Les antigènes du soi avec une affinité intermédiaire pour le TCR présentés par les cellules thymiques induisent l'expression de *forkhead box P3* (FOXP3) dans les lymphocytes T. FOXP3 est un facteur de transcription qui joue un rôle crucial dans le développement et la fonction des lymphocytes Treg. Toutefois, d'autres études ont démontré que certains lymphocytes T expriment FOXP3 de manière basale. Lors de la sélection négative, ces lymphocytes activés par des antigènes du soi avec une haute affinité pour le TCR survivent et sont différenciés en lymphocyte Treg (Hsieh et al., 2012). Comme le microbiote cutané est présent lors de la maturation du système immunitaire, il serait considéré comme le soi et donc toléré par le système immunitaire par la production de lymphocytes Treg (Scharschmidt, 2017). Le microbiote cutané aide son hôte à se protéger contre les pathogènes par compétition soit en occupant l'espace disponible soit en utilisant les nutriments apportés par l'hôte. Le microbiote commensal est également capable de produire des PAM ou de bactériocines pour détruire le pathogène. En outre, les micro-organismes commensaux peuvent dégrader les lipides présents dans le sébum. Les acides gras libres vont donc acidifier la surface de la peau qui devient un environnement nocif pour les micro-organismes pathogènes (Swaney and Kalan, 2021).

1.4.4. Le système immunitaire inné cutané

L'épiderme joue un rôle important dans l'immunité de la peau (**Figure 9**). Les kératinocytes reconnaissent les *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) par leurs *toll-like receptor* (TLR). La liaison des PAMP aux récepteurs active des voies de signalisation qui induisent la sécrétion de cytokines et de PAM. Par ailleurs, l'épiderme contient des cellules de Langerhans, cellules dendritiques qui appréhendent et présentent les antigènes par le CMH2 aux

récepteurs présents sur les lymphocytes T (TCR) qui seront activés avec l'aide de co-stimulation (Chambers and Vukmanovic-Stejic, 2020).

Toutefois la principale activité immunitaire se déroule dans le derme. Les fibroblastes contiennent les 10 types de TLR existants alors que les kératinocytes n'en contiennent que 8. La concentration pour chaque TLR est plus élevée à la surface des fibroblastes qu'à la surface des kératinocytes. Par ailleurs, les cellules dendritiques dermiques et les macrophages activent le système immunitaire en présentant les antigènes aux lymphocytes T mémoires ou aux lymphocytes T naïfs présents respectivement dans le derme et dans les ganglions lymphatiques (Chambers and Vukmanovic-Stejic, 2020).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont des cellules de l'immunité innée qui produisent des cytokines inflammatoires afin de protéger des infections. Elles sont classées en trois catégories les ILC1, ILC2 et ILC3. Les ILC1 sécrètent des cytokines de type Th1 et activent les lymphocytes Th1. Les ILC2 et ILC3 quant à elles sont associées à une réponse immunitaire respectivement de type Th2 et de type Th17. Les ILC permettent d'activer une réponse immunitaire contre les pathogènes de manière plus rapide et de déclencher la transition entre réponse immunitaire innée et adaptative (Artis and Spits, 2015, Chambers and Vukmanovic-Stejic, 2020).

Les mastocytes, cellules immunitaires également présentes dans le derme, contiennent des granules qui produisent des substances impliquées dans l'inflammation telles que l'histamine, l'héparine, les protéases à sérine, les leucotriènes, les prostaglandines et les facteurs chimiotactiques. La reconnaissance de l'antigène par les immunoglobulines E (IgE) liées à leurs récepteurs Fc en surface des mastocytes provoque la dégranulation de ces cellules et donc la libération de leurs substances. Ces substances provoquent la dilatation des vaisseaux sanguins et le recrutement de neutrophiles et de lymphocytes T (Chambers and Vukmanovic-Stejic, 2020, Galli et al., 2020, Stone et al., 2010).

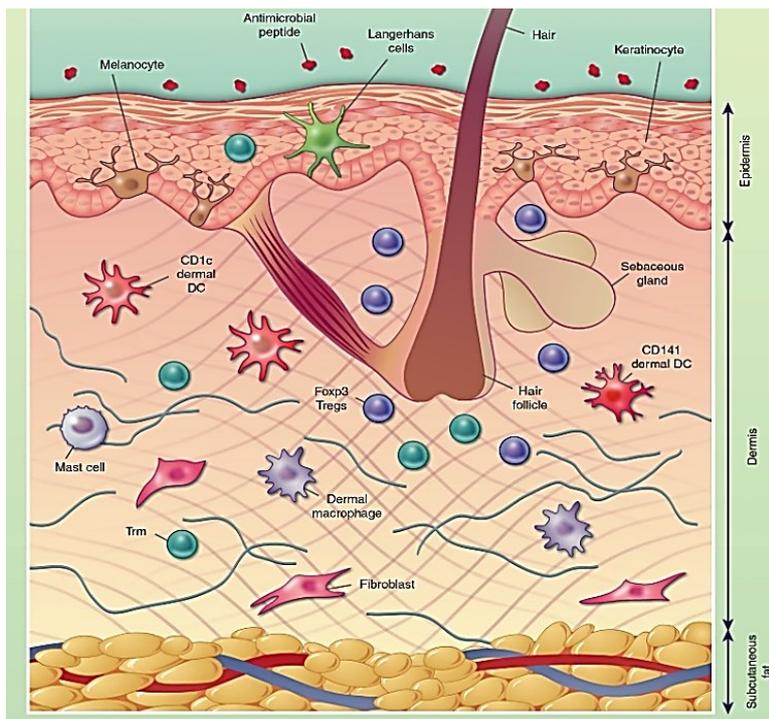


Figure 9: Système immunitaire de la peau. Au niveau de l'épiderme, les PAM, les cellules de Langerhans, les kératinocytes jouent un rôle important dans l'immunité de la peau. Les lymphocyte T résidents mémoires (Trm) sont également présents dans l'épiderme ainsi que dans le derme. Le derme contient des fibroblastes, des mastocytes, des lymphocytes T régulateurs (Foxp3 Tregs), des macrophages et des cellules dendritiques (CD) dermiques (CD1c et CD141c reconnaissent respectivement les lymphocytes TCD4+ et TCD8+) (Chambers et al., 2020).

2. La dermatite atopique

Plusieurs facteurs peuvent altérer la barrière épidermique, ce qui peut engendrer une dérégulation de l'homéostasie de la peau. De nombreuses maladies cutanées ont comme caractéristique une altération de la barrière épidermique telles que le psoriasis, l'ichtyose, l'acné (Rocha and Bagatin, 2018), ainsi que la dermatite atopique qui sera plus détaillée dans cette thèse (Proksch et al., 2008, van den Bogaard et al., 2014).

La dermatite atopique (DA) est la maladie inflammatoire de la peau la plus commune. En phase aiguë des réponses inflammatoires de types Th2 et Th22 sont engendrées tandis que dans la phase chronique, des réponses immunitaires de types Th1 et Th17 sont induites en plus des deux autres réponses (Cork et al., 2009, De Vuyst et al., 2016, Weidinger et al., 2018).

2.1. La prévalence

La DA touche 15 à 30 % des enfants puis disparaît à l'adolescence. Néanmoins, 2 à 10 % des adultes sont atteints de cette maladie (Bieber, 2010). Bien que pour 80 % des patients la maladie apparait dans les six premières années de leur vie, la DA peut se manifester à n'importe quel âge (Weidinger et al., 2018). La prévalence de la DA dépend de la localisation

géographique. En effet, la pathologie est plus fréquente dans les pays développés même si sa prévalence augmente dorénavant dans les pays en voie de développement (Langan et al., 2020). Une revue récente a rassemblé les données de la littérature pour évaluer la prévalence de la DA parmi les cinq continents (**Table 1**) (Hadi et al., 2021). La fréquence de la DA a doublé, voire triplé, durant les quatre dernières décennies (De Vuyst et al., 2016). Cette augmentation peut être due à l'exposition plus importante aux allergènes, au régime alimentaire, à la pollution, au tabagisme ou au stress (Liang et al., 2016, Weidinger et al., 2018).

Table 1 : Prévalence de la DA en fonction de la localisation géographique et de l'âge (Hadi et al., 2021).

Continent	Pays	Age	Prevalence	Année de l'étude	Continent	Pays	Age	Prevalence	Année de l'étude
Afrique	Tunisie	entre 5 et 6 ans	0,65 %	2007	Amérique	Canada	entre 13 et 14 ans	8,20 % - 10,40 %	2008
	Rwanda	entre 4 et 20 ans	0,80 %	2007		Amérique latine	entre 6 et 7 ans	11,30 %	2010
	Ghana	entre 4 et 20 ans	1,6 %	2007			entre 13 et 14 ans	10,60 %	2010
	Gabon	entre 4 et 20 ans	4,00 %	2007			entre 12 et 15 ans	18,20 %	2015
	Namibia	entre 15 et 30 ans	43,30 %	2014		Brésil	entre 6 et 7 ans	9,60%	2010
Sénégal	moins de 15 ans	12,20 %	2015	entre 13 et 14 ans			3,40 %	2012	
Océanie	Australie	12 mois	20,3 %	2011		USA	entre 0 et 5 ans	24,00 %	2019
	Nouvelle-Zélande	entre 6 et 7 ans	15,00 %	2013			entre 5 et 15 ans	14,80 %	2019
		entre 13 et 14 ans	8,80 %	2013			adulte	7,30 %	2019
Asie	Japon	entre 6 et 14 ans (tokyo)	10,90 % - 19,60 %	2015		Europe	Hongrie	moins de 19 ans	17,50 %
		enfants (campagnes)	4,30%	2016	Allemagne		moins de 17 ans	13,2 %	2006
	Corée du sud	entre 13 et 18 ans	23,10 %	2017	Danemark		moins de 5 ans	13,00 %	2010
		Adulte	3,1 %	2014	UK		moins de 17 ans	12,30 %	2013
	Chine	moins de 7 ans	12,94 %	2014			adulte	6,90 %	2013
		adolescent	6,70 %	2017	Pologne		entre 6 et 7 ans	6,50 %	2015
		adulte	4,60%	2014			entre 13 et 14 ans	9,00 %	2015
	Taiwan	entre 13 et 15 ans	7,60 %	2015			adulte	3,61 %	2015
	Malaisie	moins de 6 ans	13,4 %	2018	Suisse		moins de 14 ans	34,00 %	2018

2.2. Les symptômes

2.2.1. Les manifestations cliniques

Les principaux symptômes de la DA sont du prurit, des lésions érythémateuses et de la xérose (De Vuyst et al., 2016). Le prurit est une démangeaison cutanée engendrée par l'activation de nerfs sensitifs. La xérose est une sécheresse de la peau due à une perte de fluide transépithéliale plus élevée lors d'une altération de la barrière épidermique (Bieber, 2010, 2022). La localisation des lésions érythémateuses dépend de l'âge. Chez les nouveau-nés de moins de deux ans, les lésions sont généralement localisées au niveau des joues, des bras, des jambes, de l'abdomen et du front, tandis que chez les enfants de plus de 2 ans elles se situent sur le visage, le cou, dans les plis des coudes et des genoux. Les lésions des adolescents et des adultes se situent davantage au niveau du visage, des mains et de la nuque (**Figure 10**) (Langan et al., 2020).



Figure 10: Localisation des lésions érythémateuses en fonction de l'âge. (i) Les enfants de moins de deux ans présentent des lésions au niveau des joues, des bras, des jambes, de l'abdomen et du front. (ii) Les enfants de plus de 2 ans présentent des lésions au niveau du visage, du cou, des plis, des coudes et des genoux. (iii) Les adolescents et les adultes présentent des lésions au niveau du visage, des mains et de la nuque (Langan et al., 2020).

2.2.2. Les caractéristiques histologiques

D'un point de vue histologique, la DA se caractérise par de nombreuses altérations de l'épiderme, ce qui entraîne l'infiltration dermique de leucocytes tels que les lymphocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes, les éosinophiles et les macrophages (**Figure 11**) (Bieber, 2010, 2022). En phase aiguë, une spongiose peut être observée dans les épidermes lésionnels. La spongiose se produit à la suite de l'accumulation de liquide dans les espaces intercellulaires, ce qui provoque une augmentation de ces espaces (Bieber, 2010, Ohtani et al., 2009). En phase chronique, l'épiderme subit une acanthose, c'est-à-dire une prolifération de la couche basale menant à l'augmentation de l'épaisseur de la couche épineuse et donc à l'hyperplasie de l'épiderme (Weidinger et al., 2018). Les épidermes peuvent également subir une hyperkératose due à une augmentation de la kératinisation qui se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la couche cornée (De Vuyst et al., 2017). La DA est également caractérisée par une parakératose définie par la présence de noyaux dans la couche cornée à la suite d'une cornification incomplète. La parakératose est souvent associée à une hypogranulose, c'est-à-dire une diminution de l'épaisseur de la couche granuleuse (Brady, 2004, De Vuyst et al., 2017). Dans certains cas, une acantholyse peut résulter d'une perte d'adhérence entre les cellules, ce

qui entraîne la dissociation des cellules et l'apparition de cavités intratissulaires (Brihan et al., 2022, Girolomoni et al., 2021, Seshadri et al., 2013). De plus, les fibroblastes du derme prolifèrent et produisent du collagène qui forme des fibres plus épaisses conduisant à une fibrose, ce qui mène à une lichénification de la peau (Murota et al., 2017, Oh et al., 2011).

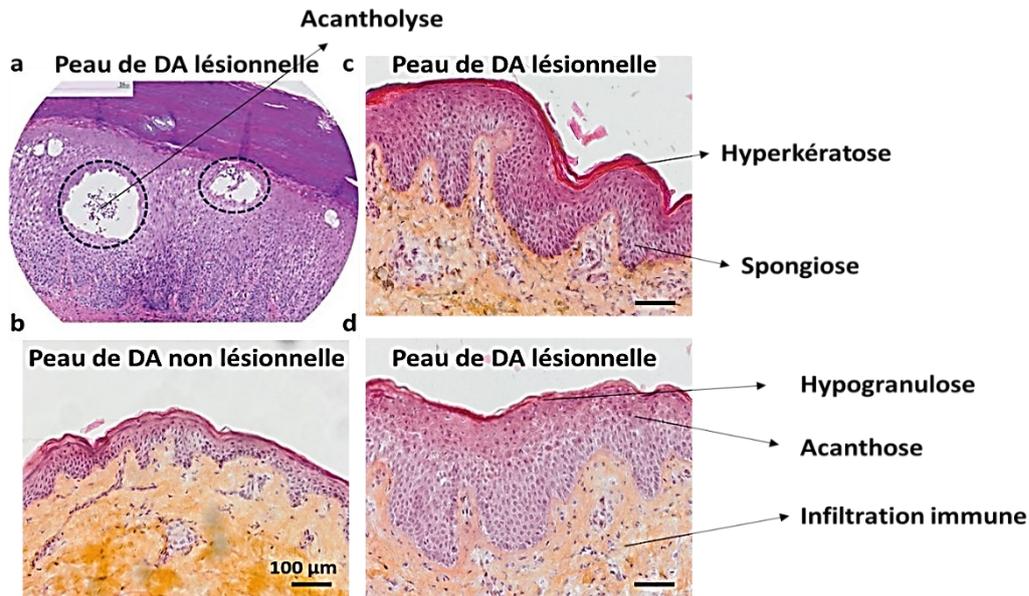


Figure 11: caractéristiques histologiques de peaux lésionnelles de patients atteints de dermatite atopique. (a) Acantholyse dans une peau lésionnelle d'un patient atteint de DA (Girolomoni et al., 2021). (b-d) Les peaux non lésionnelles (b) et lésionnelles (c-d) de patients atteints de DA ont été collectées en collaboration avec le Professeur Arjen Nikkels, chef du service de dermatologie au CHU de l'Université de Liège. Les peaux ont été congelées au cryostat et colorées à l'Hémalun-Eosine-Safran (HES).

2.2.3. La marche atopique

30 à 50% des enfants atteints de DA au plus jeune âge développent par la suite d'autres maladies de type Th2, telles que l'asthme et/ou la rhinite allergique (De Vuyst et al., 2016). L'asthme est une maladie inflammatoire caractérisée par l'obstruction des voies respiratoires à la suite d'une production de mucus et une contraction de muscles lisses bronchiques. La rhinite allergique est une maladie qui concerne les fosses nasales. En effet, les patients qui développent la rhinite allergique sont atteints de rhinorrhée, d'éternuement, de congestion nasale et de prurit au niveau des yeux, des oreilles et de la gorge. Les IL-4 et IL-13 sont, en autres, responsables de ces manifestations. En effet, ces interleukines induisent l'expression de VCAM-1 en surface des cellules endothéliales, ce qui facilite la migration des éosinophiles, des mastocytes et des basophiles. Simultanément, IL-4 et IL-13 activent les lymphocytes B afin qu'ils produisent des IgE. En se liant à leur récepteur, les IgE permettent la dégranulation des éosinophiles, des mastocytes et des basophiles qui relarguent des médiateurs. Dans l'asthme, ces médiateurs sont responsables de la bronchoconstriction et IL-4 et IL-13 induisent aussi la

différenciation de cellules caliciformes qui produisent énormément de mucus. Dans la rhinite allergique, les médiateurs relargués après la dégranulation des cellules provoquent la dilatation des vaisseaux sanguins ce qui entraîne des œdèmes et des rhinorrhées et stimulent les nerfs sensitifs, ce qui provoque les éternuements et le prurit (Hammad and Lambrecht, 2021, Skoner, 2001).

L'apparition progressive de l'asthme et la rhinite allergique sont appelées « la marche atopique ». Ce phénomène est accentué avec la persistance et la sévérité de la maladie. La cause de la marche atopique est principalement l'activation du système immunitaire qui induit la sensibilisation aux IgE et les allergies. Le système immunitaire est activé par la protéine *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) qui est produite et libérée par les kératinocytes. En effet, TSLP active les cellules de Langerhans pour permettre la différenciation des lymphocyte T naïfs en lymphocytes Th2 producteurs d'IL-4 et IL-13 et donc pour induire la production d'IgE par les lymphocytes B (Leyva-Castillo et al., 2013, Paller et al., 2019, Zhu et al., 2011).

2.2.4. Les manifestations psychosociales

Bien que les liens entre la DA et la santé mentale et émotionnelle du patient soient étudiés depuis peu, quelques études ont démontré une corrélation entre la sévérité de l'eczéma et celle des troubles mentaux (**Table 2**) (Weidinger et al., 2018, Yaghmaie et al., 2013). En cas de prurit intense, ces personnes voient leur sommeil fortement diminuer, ce qui provoque la fatigue et donc la mauvaise humeur des patients (Silverberg et al., 2015, Yaghmaie et al., 2013). De même, les patients adolescents peuvent présenter un parcours scolaire plus chaotique à la suite d'un trouble de l'attention (Simpson et al., 2020). Enfin, le coût des traitements peut également avoir un impact négatif sur la santé mentale (Zeiser et al., 2021). Tout ceci peut conduire à de l'anxiété, à une dépression, voire, dans de rares cas, au suicide (Drucker et al., 2018, Halvorsen et al., 2014, Yaghmaie et al., 2013) (Drucker et al., 2018, Simpson et al., 2020, Weidinger et al., 2018, Zeiser et al., 2021).

Table 2 : Manifestations psychosociales dans la dermatite atopique

		Pas de DA	DA faible	DA modérée	DA sévère
Yaghmaie et al., 2012 : Enfant USA de 0-18 ans (Résultats obtenus par le rapport parental)	Trouble de l'attention	8.19%	10.68%	13.21%	27.70%
	Anxiété	4.13%	5.47%	9.11%	16.26%
	Dépression	3.37%	5.40%	7.20%	14.11%
	0-3 nuits de sommeil adéquat / semaine	4.96%	10.08%	10.28%	20.11%
Silverberg et al., 2015 : Population d'Oslo (Norvège) de + 18 ans		pas de DA	DA		
	Fatigue	14%	32%		
	3-6h de sommeil / nuit	28%	34%		
Halvorsen et al., 2014 : population USA entre 18 et 22 ans		pas de DA	DA sans prurit	DA avec prurit	
	Idée suicidaire	9.10%	11.00%	23.80%	
Drucker et al., 2018 : Population Ontario (Canada) entre 15 et 55 ans		pas de DA	DA		
	Suicide	0.77%	0.94%		

2.3. L'étiologie

La DA est une maladie hétérogène sur le plan clinique dont les causes exactes ne sont pas bien connues. Il s'agit, en effet, d'une maladie multifactorielle qui fait intervenir à la fois l'environnement et la génétique. Dans tous les cas, un cercle vicieux s'installe entre l'altération de la barrière et la réponse inflammatoire de type Th2 (**Figure 12**) (De Vuyst et al., 2016, Liang et al., 2016).

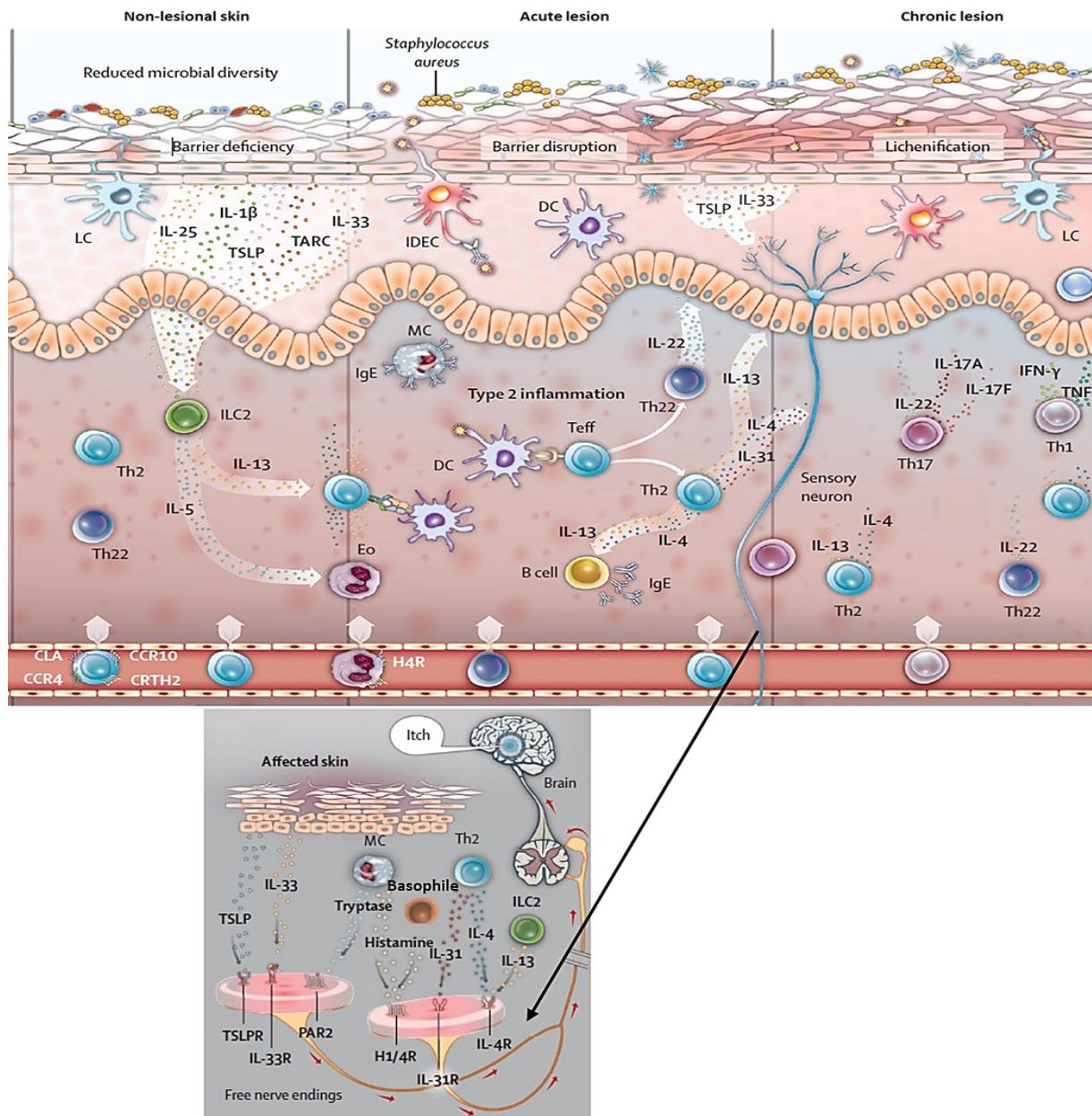


Figure 12: Physiopathologie de la dermatite atopique. L'image représente les différentes phases de la DA (la peau non lésionnelle, la peau lésionnelle en phase aiguë et la peau lésionnelle en phase chronique). Dans la peau non lésionnelle, la diversité du microbiote est réduite et l'efficacité de la barrière diminue. L'altération de la barrière active les kératinocytes qui sécrètent des alarmines telles que TSLP, IL-33, TARC, IL-25 et IL-1β. Ces alarmines activent les cellules ILC2 afin qu'elles sécrètent IL-13 et IL-5 et induisent le recrutement de lymphocytes Th2 qui expriment à leur surface *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA), *chemokine receptors* (CCR) 4, CCR10 et CRTH2. IL-13 activent les lymphocytes Th2 alors qu'IL-5 provoque le recrutement et l'activation des éosinophiles. L'affaiblissement de la barrière active également les cellules de Langerhans (LC) dont les dendrites traversent la couche granuleuse pour capturer les micro-organismes ou les allergènes. Dans la peau lésionnelle, les cellules dendritiques (DC), les LC et les *inflammatory dendritic epidermal cells* (IDEC) activent les lymphocytes Th effecteurs (Teff) permettant leur différenciation en lymphocyte Th22 ou Th2. Les lymphocytes Th22 produisent de l'IL-22 qui joue un rôle sur la biologie des kératinocytes. Les lymphocytes Th2 sécrètent des IL-4 et IL-13, cytokines responsables de la maturation des lymphocytes B producteurs d'IgE. Les IgE se lient aux mastocytes et aux basophiles pour induire leur dégranulation lors de la liaison de l'antigène aux IgE provoquant ainsi la libération de l'histamine et de la tryptase. En se liant à leurs récepteurs, ces protéines ainsi que TSLP, IL-33, IL-31, IL-4 et IL-13 activent les fibres nerveuses sensibles aux démangeaisons. IL-33 est sécrétée par les kératinocytes et IL-31 par les lymphocytes Th2. Dans la phase chronique, en plus de la présence de lymphocytes TH2/22, les lymphocytes Th1 (produisent de l'IFNγ et du TNFα) et les lymphocytes Th17 (produisent IL-17 et IL-22) sont recrutés (Langan et al., 2020).

2.3.1. L'altération de la barrière

L'altération de la barrière peut être induite par des facteurs environnementaux ou/et génétiques (David Boothe et al., 2017).

Des études initiées en Ecosse au début des années 2000 ont montré que le gène de la filaggrine localisé sur le chromosome 1q21 dans le cluster de différenciation épidermique, est muté chez 60 % des patients atteints de DA (David Boothe et al., 2017, Palmer et al., 2006). 80% de ces mutations sont des mutations « perte de fonction » R501X et 2282del4 (Brettmann and de Guzman Strong, 2018). Ces deux mutations mènent à la présence d'un STOP prématuré au début de l'exon 3 dans la partie codant pour le premier monomère de la filaggrine (Smith et al., 2006). Les mutations homozygotes (R501X/R501X) ou des mutations hétérozygotes composées (R501X/2282del4) induisent une perte de l'expression alors que les mutations hétérozygotes (R501X/wt et 2282del4/wt) provoquent une diminution de l'expression de la filaggrine (Gruber et al., 2007). Les mutations perte de fonction dans le gène FLG causent l'ichtyose vulgaire, une maladie dermatologique courante avec une prévalence d'au moins 1/250. Les hétérozygotes n'ont pas de phénotype ou sont affectés d'une forme légère, alors que les homozygotes ou hétérozygotes composés ont une ichtyose marquée et un défaut sévère de la barrière (Smith et al., 2006). Les individus qui possèdent des mutations homozygotes ou hétérozygotes composées ont aussi plus de risque de développer la DA (Odd ratio (OR) par rapport aux individus sains est égal à 85.9) que ceux qui possèdent des mutations sur un seul allèle (OR par rapport aux individus sains est égal à 4.6) (Sandilands et al., 2006). Une étude américaine a constaté que le pourcentage de patients DA caucasiens (27,5 %) qui possèdent une mutation sur le gène de la filaggrine est plus élevé que celui des patients afro-américains (5,8 %) (Margolis et al., 2012). Une autre étude a constaté que la prévalence de patients singapouriens (20,2 %) atteints de DA portant une mutation sur le gène de la filaggrine est plus faible que celle des patients irlandais atteints de DA (46 %) (Chen et al., 2011). Ces études suggèrent donc que le statut de la filaggrine dans la DA est dépendant de l'ethnie. Une perte de l'expression de la filaggrine entraîne une perte de l'agrégation de la kératine ce qui altère la structure des cornéocytes (Boguniewicz and Leung, 2011). Chez les patients dont le gène est muté, une diminution de la dégradation de la filaggrine en acides aminés est constatée, ce qui se traduit par une diminution de la quantité de NMF et donc par une sécheresse de la peau. La diminution de la dégradation de la filaggrine entraîne également une augmentation du pH en surface de l'épiderme. Comme mentionné plus haut, un pH acide de la peau est important pour un fonctionnement adéquat de la barrière. En effet, une élévation du pH en surface cutanée favorise les infections bactériennes et/ou virales. De plus, les protéases à sérine présentes dans

l'épiderme ont une activité accrue à pH plus élevé. Elles dégradent donc les cornéodesmosomes de manière précoce, ce qui diminue la performance de la barrière (O'Regan et al., 2008). En même temps, l'activité des sphingomyélinases est altérée à pH neutre, ce qui impacte la synthèse des céramides dans la couche cornée. Ceci entraîne une diminution de l'épaisseur de cette couche et par conséquent une altération de la barrière épidermique (Jensen et al., 2004, Nomoto et al., 2018)

Une dysbiose -altération du microbiote cutané- est également observée au cours de la DA. En effet, un microbiote pathogène remplace le microbiote commensal, faisant la place à *staphylococcus aureus* (*S. aureus*) par exemple. Une revue systématique a rapporté une colonisation de *S. aureus* dans les peaux lésionnelles de 70 % de patients atteints de DA (OR par rapport aux patients sains est égal à 19,74) et dans les peaux non lésionnelles de 39 % des patients (OR par rapport aux patients sains est égal à 7,77) (Totte et al., 2016). En plus du pH qui augmente et de la production de NMF qui diminue dans les épidermes déficients en filaggrin, IL-4 et IL-13 (deux cytokines qui jouent un rôle important dans la DA) diminuent l'expression des PAM. Cet environnement est alors favorable à l'infection bactérienne. Le *S. aureus*, via ses propres protéases ou via l'augmentation de l'activité des protéases de l'hôte par sa présence excessive, induit une dégradation de la structure de la desmogléine 1, une protéine importante dans la composition des desmosomes favorisant l'invasion bactérienne (Patrick et al., 2021). Simultanément, les α -toxines de *S. aureus* peuvent se lier à la sphingomyéline pour former des pores néfastes aux cellules en induisant une perméabilité dans la membrane plasmique. Elles provoquent ainsi la destruction du tissu (Brauweiler et al., 2013, Dal Peraro and van der Goot, 2016).

Les jonctions serrées jouent un rôle important dans la barrière paracellulaire qui empêche le passage intercellulaire de grosses molécules et d'ions et la perte de fluide transépithéliale (David Boothe et al., 2017, Kezic et al., 2014). Des polymorphismes du gène codant pour la claudine 1 sont associés à un risque de développement de la DA (De Benedetto et al., 2011). Par ailleurs, ZO-1, la claudine 8, la claudine 23 et l'occludine voient leurs niveaux d'expression diminués dans les épidermes de patients atteints de DA (Namrata and Bai, 2021).

Dans la couche cornée d'épidermes de patients atteints de DA, la concentration en céramides est diminuée ce qui induit une altération de la barrière épidermique (Brauweiler et al., 2014, Hatano et al., 2005). Ces céramides sont construits à base de chaînes d'acides gras plus petites, ce qui induit une désorganisation dans la structure de la couche lipidiques (Berdyshev et al., 2018). L'environnement extérieur à l'organisme aussi peut favoriser le risque de développer la DA. Par exemple, les savons augmentent le pH de la peau et émulsifient les

lipides du sébum qui sont donc éliminés de la surface de la peau lors du rinçage à l'eau. Par ailleurs, une humidité basse, les régimes alimentaires, le stress, la pollution et le tabac sont tous des facteurs qui favorisent le risque de développer la DA (Cork et al., 2009, De Benedetto et al., 2009, Hussein et al., 2011, Liang et al., 2016).

2.3.2. La dérégulation du système immunitaire

La dérégulation du système immunitaire est due soit à la pénétration excessive de pathogènes et d'allergènes, soit à des facteurs génétiques.

Après la pénétration de pathogènes et d'allergènes dans la peau, le système immunitaire inné est activé. Les kératinocytes et les cellules dendritiques reconnaissent les PAMP arrivant dans leur environnement immédiat grâce aux TLR présents à leur surface et des récepteurs NOD-like (NLR) présents dans leur cytoplasme. La coactivation des voies de signalisation par les TLR et par les NLR induit la sécrétion de PAM, l'augmentation de l'expression de protéines des jonctions serrées et la production de TNF α , IL-8, et IL-6 afin de mettre en place une réponse immunitaire contre l'entrée des pathogènes. Des mutations dans les gènes qui codent pour les TLR et les NLR ont été constatées chez les patients atteints de DA, or ces mutations peuvent diminuer l'activité de ces récepteurs. Dans de tels cas, une augmentation de l'invasion microbienne, par *S. aureus* par exemple, est observée (Gavrilova, 2018, Kezic et al., 2014, Leung, 2013).

En ce qui concerne la peau non lésionnelle de patients de DA, après affaiblissement de la barrière (**section 2.3.1**), les kératinocytes produisent des alarmines telles que TSLP, IL-33, IL-25, IL-1 β et *thymus and activation-regulated chemokine* (TARC) (Langan et al., 2020). Ces cytokines activent les cellules ILC-2 afin qu'elles sécrètent des cytokines de type Th2 telles que l'IL-5 et l'IL-13 qui activent respectivement les éosinophiles et les lymphocytes Th2 (Lloyd and Snelgrove, 2018). TSLP, IL-33 et IL-25 activent également les cellules de Langerhans, cellules capables de capturer les micro-organismes pathogènes et les allergènes en vue de la présentation des antigènes. Les cellules de Langerhans migrent alors dans les ganglions lymphatiques qui drainent les tissus où elles se trouvent pour présenter les peptides via le CMH2 pour activer les lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de type Th2 et Th22 (Gavrilova, 2018). Ces lymphocytes sont ensuite recrutés dans le derme grâce à des chémokines (Langan et al., 2020).

Les lymphocytes Th22 sécrètent IL-22, cytokine qui joue un rôle important dans l'hyperplasie, l'hypogranulose, la parakératose et la diminution de l'expression de marqueurs de différenciation épidermique (Fujita, 2013, Gittler et al., 2012). Les lymphocytes Th2, quant

à eux, sécrètent des cytokines de type Th2 telles que les IL-4 et IL-13 qui jouent un rôle primordial dans la phase aiguë de la DA (Hanel et al., 2013). Les lymphocytes sécrètent également de l'IL-5 qui est responsable du recrutement et de l'activation des éosinophiles qui libèrent, eux aussi, les IL-4 et IL-13 mais à des doses plus faibles que les lymphocytes Th2 (Stone et al., 2010). Les IL-4 et IL-13 activent les lymphocytes B pour les différencier en plasmocytes producteurs d'IgE (Gavrilova, 2018). Ces IgE se lient grâce à leur domaine Fc aux récepteurs à l'IgE présents à la surface des mastocytes et des basophiles. La liaison d'antigènes aux IgE induit la dégranulation de ces cellules et la libération d'histamine (Stone et al., 2010). En se liant à leurs récepteurs, l'histamine active les fibres nerveuses sensibles aux démangeaisons. Néanmoins, l'histamine n'est pas le seul responsable des démangeaisons puisque les traitements antihistaminiques ne sont pas complètement efficaces contre le prurit chez les patients atteints de DA. En effet, les mastocytes libèrent également de la tryptase qui possède un récepteur à la surface des fibres nerveuses. De plus, TSLP, IL-33, IL-31, IL-4 et IL-13 se lient à leurs récepteurs, également présents sur les terminaisons nerveuses cutanées, pour induire le prurit. Le prurit mène à une altération de la barrière épidermique due à un grattage excessif (Elmariah and Lerner, 2013, Langan et al., 2020).

Les IL-4 et IL-13 induisent une altération de la barrière en modifiant le phénotype des kératinocytes. Cette modification est détaillée dans la **Section 5**. Brièvement, ces interleukines altèrent l'expression de protéines importantes pour l'homéostasie de l'épiderme et la formation de la barrière épidermique, comme par exemple la diminution de l'expression de la filaggrine, des protéines des jonctions serrées, des PAM, etc. IL-4 et IL-13 activent également chez les kératinocytes des voies qui déclenchent la sécrétion du TSLP, maintenant ainsi une réponse immunitaire de type Th2 (De Vuyst et al., 2016, De Vuyst et al., 2017).

De ce fait, la phase chronique de la DA est le résultat du cercle vicieux entre altération de la barrière et dérégulation immunitaire. Dans cette phase, une invasion et une activation de lymphocytes T qui produisent des réponses immunitaires de types Th17 et Th1 est observée en plus des réponses immunitaires de types Th2 et Th22. L'activation de réponses immunitaires de type Th1 et Th17 est variable parmi les patients et dépend de l'ethnie et de l'âge de ceux-ci (Puar et al., 2021). Alors que les réponses immunitaires de types Th17 et Th1 sont connues pour être responsables du développement du psoriasis, leur rôle dans la DA n'est pas encore bien connu (Langan et al., 2020). Les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN γ et du TNF α qui induisent la production des défensines (hBD) dans les kératinocytes. Comme IL-4 et IL-13 inhibent la production de hBD, IFN γ et TNF α pourraient être produites dans la phase chronique de DA pour compenser le manque de PAM (Albanesi et al., 2007). L'IFN γ induit également

dans les kératinocytes une diminution de l'expression en surface de E-cadhérine (protéine importante dans la formation de jonctions étanches) et une augmentation de la production d'HA. La diminution de E-cadhérine induit une augmentation des espaces intercellulaires permettant une accumulation de l'acide hyaluronique (HA) dans ces espaces. La réponse immunitaire de type Th1 pourrait dès lors jouer un rôle dans la spongiose (Ohtani et al., 2009). Les lymphocytes Th17, quant à eux, sécrètent IL-17 et IL-22 qui induisent l'expression de protéines S100A (S100A7, S100A8, S100A9). Ces protéines jouent un rôle important dans le recrutement des cellules immunitaires maintenant la réponse inflammatoire (Gittler et al., 2012, Langan et al., 2020, Puar et al., 2021). Un microarray réalisé sur des kératinocytes stimulés à IL-17 a reporté qu'IL-17 est responsable de la diminution de transcrits qui codent pour la FLG, pour les protéines importantes dans la dégradation de la profilaggrine et pour les protéines de jonctions serrées. Ces résultats suggèrent qu'IL-17 jouerait également un rôle dans l'altération de la barrière épidermique (Gutowska-Owsiak et al., 2012).

2.3.3. Les hypothèses dans l'initiation du cercle vicieux

Deux hypothèses ont été proposées dans l'initiation du cercle vicieux. L'hypothèse *inside-outside* met en avant la conséquence d'une réponse immunitaire excessive due aux mutations éventuelles de différents gènes codant pour des protéines du système immunitaire. L'activation du système immunitaire conduit à une production excessive d'interleukines de type Th2, telles que les IL-4 et IL-13, qui altèrent la barrière épidermique comme expliqué plus haut. L'altération de la barrière implique une augmentation de l'infection par des virus et des bactéries qui sécrètent des protéases maintenant cette altération. Les cellules de Langerhans présentent les antigènes des pathogènes et des allergènes aux lymphocytes T naïfs afin de les différencier en lymphocytes T de type Th2 qui migrent du ganglion lymphatique au derme pour sécréter des cytokines de type Th2. Cela engendre donc le cercle vicieux entre altération de la barrière et dérégulation immunitaire. Au contraire, dans l'hypothèse *outside-inside*, la barrière est initialement altérée par des facteurs environnementaux ou génétiques, ce qui induit une réponse immunitaire de type Th2 suite à la pénétration accrue de pathogènes et d'allergènes. La sécrétion des interleukines provoque dès lors une altération de la barrière. Dans les deux cas, IL-4 et IL-13, par l'activation de leurs récepteurs à la surface des kératinocytes épidermiques, jouent un rôle important dans la physiopathologie de la DA (De Vuyst et al., 2016, De Vuyst et al., 2017, Elias and Steinhoff, 2008).

3. Les interleukines 4 et 13 et leurs récepteurs

3.1. Les interleukines

Les gènes qui codent pour les IL-4 et IL-13 partagent 25 % d'homologie. Ils forment un cluster sur le chromosome 5 où se localisent d'autres gènes codant pour des interleukines de type Th2 telles que l'IL-5 et l'IL-9 (Chomarat and Banchereau, 1998, Iwaszko et al., 2021). Ces cytokines sont produites principalement par les lymphocytes Th2. En effet, les lymphocytes T naïfs sont différenciés par les activations simultanées du TCR et des récepteurs à l'IL-2 ou à l'IL-4 (**Figure 13**). L'activation du TCR induit le transport, dépendant du Ca^{2+} , dans le noyau de *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). Les récepteurs à l'IL-2 ou à l'IL-4 activent respectivement *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 5 et STAT6 permettant l'augmentation de l'expression de *trans-acting T-cell-specific transcription factor* (GATA3) qui transloque dans le noyau pour se lier aux promoteurs des gènes de l'IL-4 et l'IL-13. La co-stimulation de GATA3 et de NFAT permet donc la transcription des gènes qui codent pour ces interleukines (Iwaszko et al., 2021, Yao et al., 2012, Zhu, 2015). Dans certains cas, GATA3 est capable de modifier la conformation 3D de la chromatine afin de rapprocher les promoteurs des gènes codants pour les IL-4 et IL-13. NFAT se lie donc aux deux promoteurs dans le but de transcrire ces gènes simultanément (Huang et al., 2015, Yao et al., 2012). D'autres cellules peuvent être responsables de la production de ces interleukines. Parmi ces cellules, nous retrouvons les lymphocytes B, les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles, les cellules NK, les cellules dendritiques et les ILC-2 (Formentini et al., 2012, Junttila, 2018).

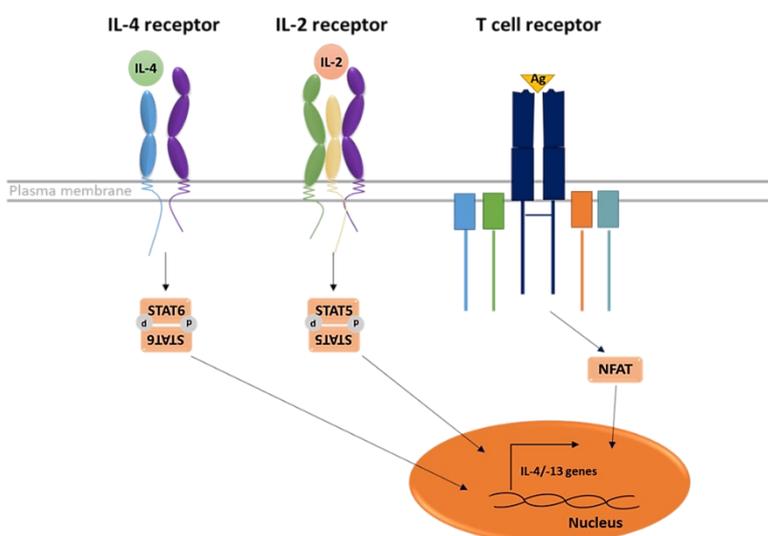


Figure 13: Production d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes T par l'activation simultanée du récepteur TCR et du récepteur à l'IL-4 ou à l'IL-2. Après activation du récepteur au lymphocytes T (TCR) par la présentation des antigènes, NFAT est activée et transloque dans le noyau pour réguler la transcription des gènes qui codent pour IL-4 et IL-13. Simultanément, IL-4 active STAT6 ou IL-2 active STAT5 par l'activation de leur récepteur respective. Les STAT migrent dans le noyau pour réguler la transcription du gène qui code pour GATA3, protéine qui régule également la transcription des gènes des IL-4 et IL-13.

Les IL-4 et IL-13 sont constituées de quatre hélices alpha nommées A, B, C et D sur lesquelles se localisent les domaines de liaison aux récepteurs. Le domaine avec une haute affinité pour son récepteur se trouve au niveau des hélices AC alors que le domaine de plus faible affinité se localise sur les hélices AD (**Figure 14**) (Mueller et al., 2002). IL-4 et IL-13 contiennent respectivement 3 et 2 ponts disulfures qui relient deux cystéines. Ces ponts sont importants pour la structure 3D des protéines et donc pour leurs fonctions (Plugis et al., 2018).

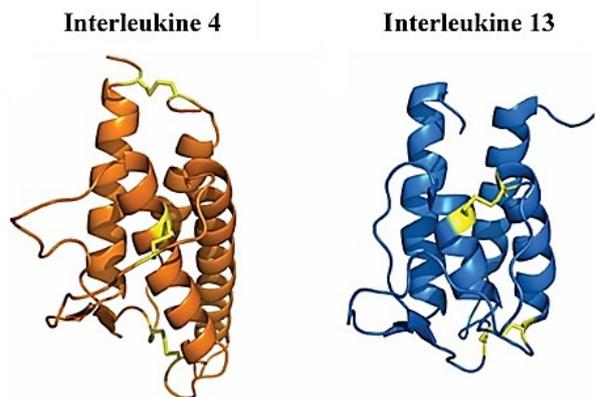


Figure 14 : Structure moléculaire de l'IL-4 et d'IL-13. Les IL-4 et IL-13 contiennent 4 hélices alpha nommées A, B, C et D et respectivement 3 et 2 ponts disulfures (en jaune) qui relient deux cystéines (Plugis et al., 2018).

3.2. Les récepteurs

Les récepteurs aux IL-4 et IL-13 sont au nombre de trois. Le récepteur de type I, localisé dans les cellules hématopoïétiques, est composé d'IL-4R α et d'IL-2R γ (aussi nommée γc). IL-4R α dimérise également avec IL-13R $\alpha 1$ pour former le récepteur de type II. Il existe aussi un récepteur antagoniste nommé IL-13R $\alpha 2$. Le récepteur de type II et IL-13R $\alpha 2$ sont exprimés en surface de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques (**Figure 15**) (Junttila, 2018, Shankar et al., 2022).

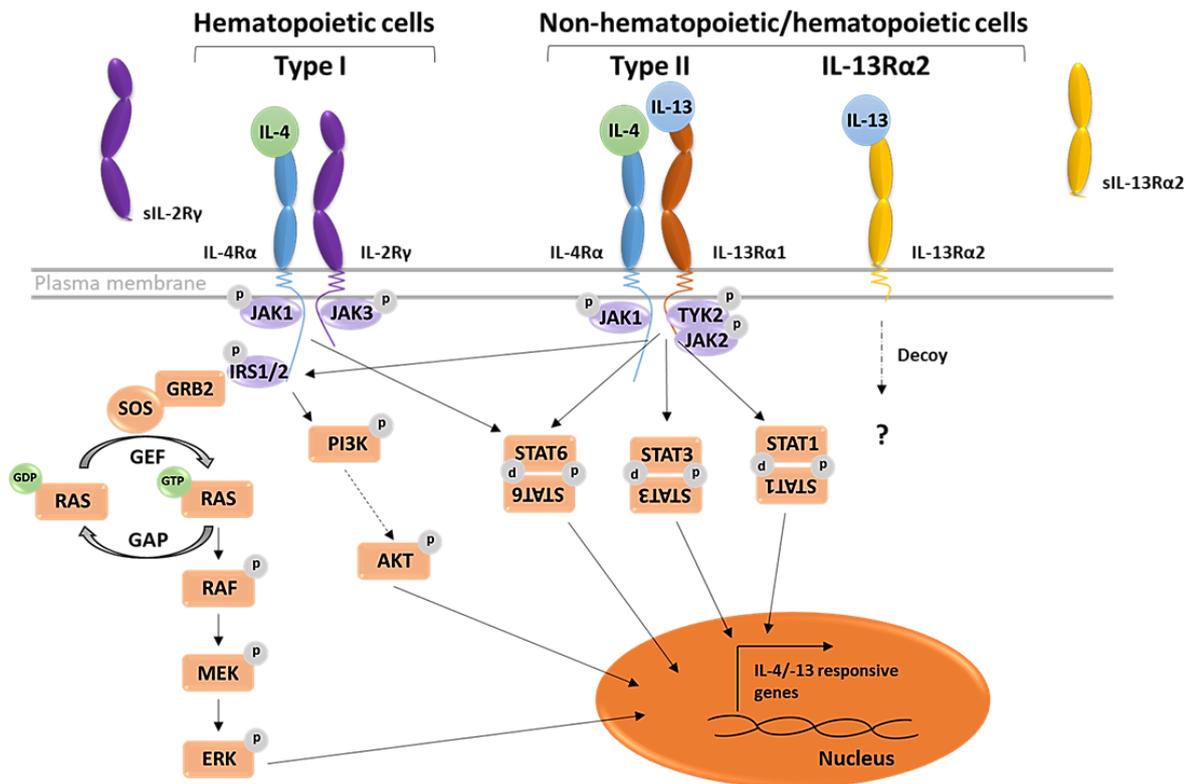


Figure 15 : Les récepteurs aux IL-4 et IL-13 et leurs voies de signalisation. Les récepteurs des IL-4 et IL-13 sont au nombre de trois ; le récepteur de type I, le récepteur de type II et IL-13Rα2. IL-4 active le récepteur de type I par la dimérisation d'IL-4Rα et d'IL-2Rγ. IL-4 et IL-13 activent le récepteur de type II par la dimérisation d'IL-4Rα et d'IL-13Rα1. Les récepteurs de type I et de type II activent les voies de signalisation de JAK/STAT, de PI3K/Akt et de MAPK. IL-13Rα2 est considéré comme un récepteur antagoniste qui inhibe les effets d'IL-13 par compétition. Toutefois, certaines études démontrent qu'IL-13Rα2 est capable d'activer des voies de signalisation. Le récepteur de type I est exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques alors que le récepteur de type II et IL-13Rα2 sont exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. IL-2Rγ et IL-13Rα2 existent sous forme soluble. Grb2, Growth factor receptor-bound protein 2; Sos, son of sevenless; GEF, guanine exchange factors; GAP, GTPase activating protein

3.2.1. Le récepteur de type I IL4Rα/IL-2Rγ

Pour former le récepteur de type I, IL-4, grâce à son domaine localisé sur les hélices AC, se lie à IL-4Rα avec une grande affinité (~150 pM) pour dimériser avec une faible affinité avec IL-2Rγ (~500 nM). Ainsi IL-4 se lie à IL-2Rγ par son domaine présent sur les hélices AD ce qui permet d'augmenter la stabilité du complexe IL-4/IL-4Rα/IL-2Rγ (**Figure 16**) (LaPorte et al., 2008, Mueller et al., 2002). La liaison du ligand induit un changement conformationnel du récepteur afin de réorienter les protéines Janus kinase (JAK) associées au récepteur pour permettre la trans-phosphorylation des JAK. Cet événement est important pour l'activation du récepteur et des voies de signalisation en aval (**voir section 3.2.1.3**) (Babon et al., 2014).

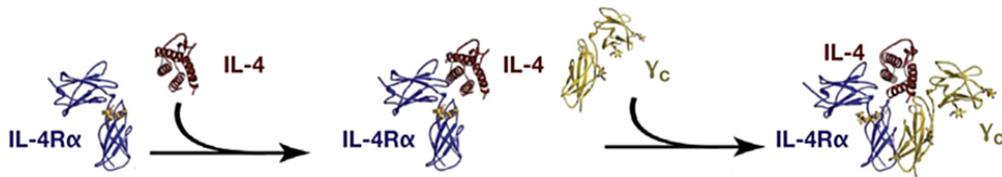


Figure 16 : Formation du récepteur de type I. IL-4 se lie à IL-4R α et le complexe se lie ensuite à IL-2R γ (LaPorte et al., 2008).

3.2.1.1. La sous-unité IL-4R α

IL-4R α , dont le gène se trouve sur le chromosome 16 (Khoo et al., 2006), produit une sous-unité dont la taille est de 140 kDa. Elle est composée de trois domaines communs à de nombreux récepteurs en surface, un domaine extracellulaire à l'extrémité N-terminale, un domaine membranaire et un domaine intracellulaire à l'extrémité C-terminale (Murata et al., 1998, Tabata and Khurana Hershey, 2007).

Le domaine extracellulaire, est constitué de deux domaines de fibronectines de type III nommés D1 et D2 (LaPorte et al., 2008). Le domaine D1 contient des résidus de cystéine qui forment des ponts disulfures pour stabiliser la conformation 3D de la protéine. Le domaine D2 possède un domaine WSXWS qui est important pour le changement conformationnel de la protéine lors de la liaison du ligand au récepteur (Waickman et al., 2016). De plus, la partie extracellulaire d'IL-4R α possède un coude CHR qui permet la liaison à son ligand, IL-4 (LaPorte et al., 2008).

Le domaine membranaire quant à lui permet l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique de la cellule (Andrews et al., 2006a).

Le domaine intracellulaire est localisé dans le cytoplasme de la cellule pour transmettre l'information du ligand à la cellule en déclenchant une signalisation intracellulaire. En effet, ce domaine contient une séquence Box 1 riche en prolines sur laquelle JAK1, protéine des voies de signalisation de JAK/STAT, s'y lie (Huang et al., 2015). Ce domaine présente également 5 résidus tyrosine qui sont phosphorylés par les JAK. L'*insulin receptor substrate* (IRS)1/2, les STAT et les *SH2-containing tyrosine phosphatase* (SHP) s'en servent alors comme ancrage pour se lier à IL-4R α . Ces protéines peuvent ensuite être activées en étant phosphorylées par les JAK (Ul-Haq et al., 2016) (Tabata and Khurana Hershey, 2007, Ul-Haq et al., 2016).

3.2.1.2. La sous-unité IL2R γ

IL-2R γ , ayant pour sa part son gène localisé sur le chromosome X, est assimilé à l'immuno-déficience sévère liée à l'X. Cette sous-unité est constituée des trois mêmes domaines qu'IL-4R α avec des caractéristiques identiques (Waickman et al., 2016). Néanmoins,

la queue cytoplasmique est plus courte ce qui lui confère une taille de 60 kDa (McCormick and Heller, 2015). Le domaine intracellulaire ne possède aucun résidu tyrosine qui peut être phosphorylé mais il contient uniquement les domaines Box sur lesquels JAK3 est capable de se lier. IL-2R γ a également la capacité de dimériser avec d'autres sous-unités qu'IL-4R α et peut ainsi former les récepteurs aux IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 qui jouent des rôles clés dans les processus biologiques de la réponse immunitaire (Waickman et al., 2016). Des études récentes ont démontré que les récepteurs aux IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 sont fonctionnels dans les kératinocytes épidermiques (Kamiya et al., 2022, Nowak et al., 2017).

La sous-unité IL-2R γ peut exister sous forme soluble (sIL-2R γ) à la suite d'un épissage alternatif de l'exon 6 qui code pour le domaine transmembranaire. L'expression de cette forme soluble augmente en condition inflammatoire (Waickman et al., 2016). Une étude sur des lignées cellulaires rénales a constaté que la liaison de sIL-2R γ à l'IL-4R α inhibe l'activation des voies de signalisation par IL-4 et IL-13, ce qui conduit à une diminution de la production d'IL-13R α 2, d'IL-13R α 1 et d'*intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) (Obiri et al., 1997).

3.2.1.3. Les voies de signalisation activées par le récepteur de type I IL4R α /IL-2R γ

IL-2R γ est considérée comme activateur catalytique car cette sous-unité de récepteur est capable de faire des allers-retours entre les complexes IL-4/IL-4R α pour les activer et ainsi induire l'activation de voies de signalisation (Andrews et al., 2006a). Il a été démontré que l'endocytose renforçait la rencontre des deux sous-unités du récepteur de type I. En effet, après une endocytose, les récepteurs se localisent dans les endosomes corticaux, dont la membrane présente une surface moins étendue que celle de la membrane plasmique. Cela diminue la distance entre les deux sous-unités et facilite donc leur dimérisation. Par ailleurs, ces endosomes servent de plateforme pour l'assemblage des protéines impliquées dans les voies de signalisation activées par IL-4 (Kurgonaite et al., 2015).

Le récepteur de type I active les voies de signalisation de JAK/STAT (**Figure 17**) (Shankar et al., 2022). A ce jour, quatre JAK sont connues ; JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Elles ont toutes sept domaines d'homologie (JH) (Hu et al., 2021). En général, les JAK, associées aux récepteurs grâce à leurs domaines SH2 et FERM, se réorientent grâce au changement de conformation du récepteur par la liaison du ligand. La nouvelle orientation des JAK libère le domaine à activité kinase, initialement inhibé par la liaison du domaine pseudokinase. Les JAK peuvent donc se transphosphoryler et ensuite phosphoryler des résidus tyrosine présents sur le récepteur. La phosphorylation du récepteur va servir d'ancrage pour les protéines STAT qui se lient au récepteur grâce à leur domaine SH2 pour y être également phosphorylées (Babon et al.,

2014, Schindler et al., 2007). Les STAT sont au nombre de 7 ; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 (Hu et al., 2021). Dans le cytoplasme, les STAT existent sous forme de monomères (Hu et al., 2021) ou d'homodimères (Babon et al., 2014, Schindler et al., 2007). Après leur phosphorylation, les homodimères changent de conformation avec une orientation antiparallèle et les monomères forment des homodimères ou des hétérodimères pour être activés afin de transloquer dans le noyau pour finalement se lier aux promoteurs de gènes dont elles régulent la transcription (Babon et al., 2014, Hu et al., 2021, Schindler et al., 2007).

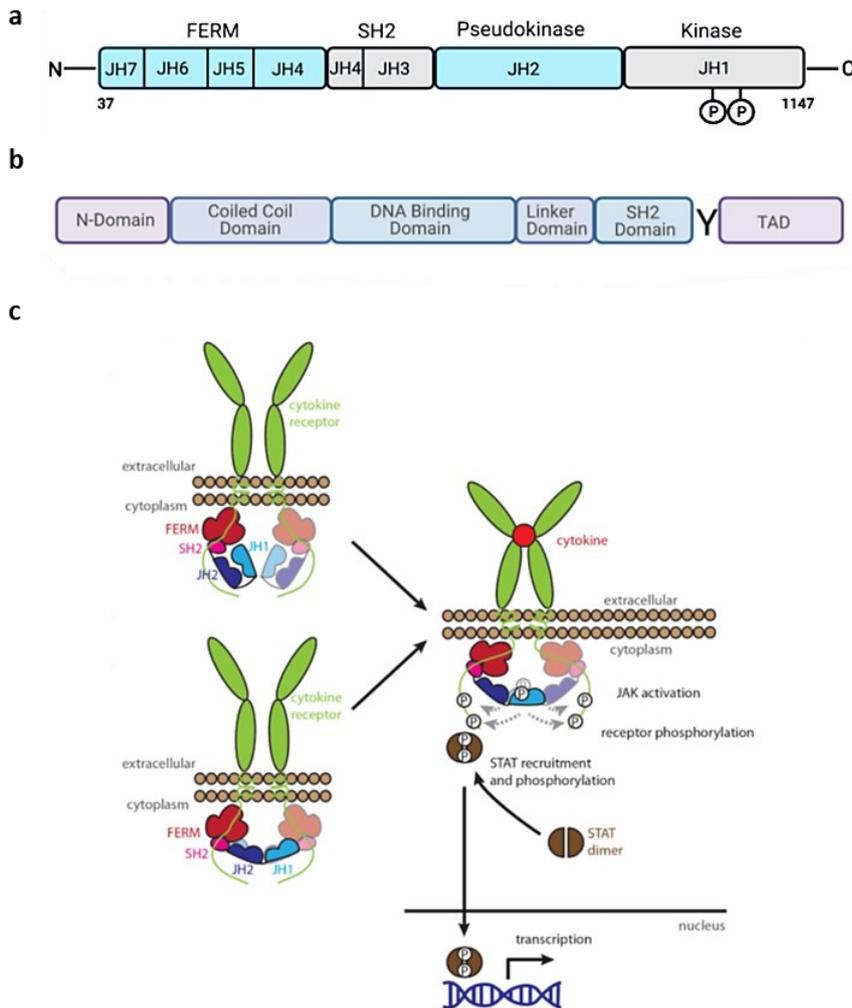


Figure 17 : Les voies de signalisation de JAK/STAT. (a-b) Structure de (a) JAK et de (b) STAT. (a) JAK contient 7 domaines (JAK homology domaine (JH)). Les JAK contiennent un *kinase domain*, un *pseudokinase domain*, un *SH2 domain* et un *FERM domain*. (b) Les STAT contiennent un *N-domain*, un *coiled-coil domain*, un *DNA binding domain*, un *linker domain*, un *SH2 domain*, un résidu tyrosine (Y) et un *transactivating domain (TAD)* (Hu et al., 2021). (c) Représentation de l'activation des voies de signalisation de JAK/STAT. Le domaine pseudokinase (JH2) inhibe l'activité du domaine kinase (JH1) soit par auto-inhibition soit par trans-inhibition. Après liaison du ligand à son récepteur, le changement conformationnel du récepteur induit la libération du domaine kinase. Les JAK phosphorylent le récepteur pour induire le recrutement et l'activation des STAT qui migrent dans le noyau pour réguler la transcription de gènes (Babon et al., 2014).

Pour ce qui est du récepteur de type I (**Figure 15**), JAK1 se lie à IL-4R α et JAK3 se lie à son unique sous-unité de récepteur, IL-2R γ . La phosphorylation du récepteur par les JAK permet le recrutement de STAT6 pour l'activer. Le recrutement d'IRS a également lieu sur la tyrosine phosphorylée d'IL-4R α . Ce recrutement induit l'activation de Ras par un *guanine exchange factor* (GEF) et ensuite l'enchaînement d'activation de MAPK (Shankar et al., 2022). ERK peut alors transloquer dans le noyau et activer les facteurs de transcription fos/jun (Liu et al., 2018). Par ailleurs, la phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) est phosphorylée en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) par la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) activée par IRS. Akt sera alors activée par PDK, elle-même activée par PIP3 (Bhatt and Damania, 2012). Akt régule de nombreux processus biologiques. Elle participe à la survie de la cellule en inhibant des protéines pro-apoptotiques ou en activant mdm2, un inhibiteur de P53. Elle joue un rôle dans la prolifération en inhibant GSK3b et dans la croissance de la cellule en activant Rheb qui active mTOR (He et al., 2021).

3.2.2. Le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1

Ce récepteur partage une même sous-unité avec le récepteur de type I, c'est-à-dire IL-4R α . IL-4 se lie donc à IL-4R α et le complexe se lie à IL-13R α 1 avec une faible affinité (500 nM). Néanmoins le récepteur de type II peut également être activé par IL-13 qui se lie à IL-13R α 1 avec une faible affinité (2-10 μ M) et le complexe se lie à IL-4R α avec une plus grande affinité. L'affinité est mesurée par le Kd ($\frac{\text{constante de dissociation}}{\text{constante d'association}}$) et plus le Kd est petit, plus l'affinité est grande. Puisque la constante de dissociation du complexe IL-4/IL-4R α /IL-13R α 1 est plus élevée que celle du complexe IL-13/IL-4R α /IL-13R α 1, ce dernier est plus stable (**Figure 18**) (Andrews et al., 2002, Kioi et al., 2004, LaPorte et al., 2008).

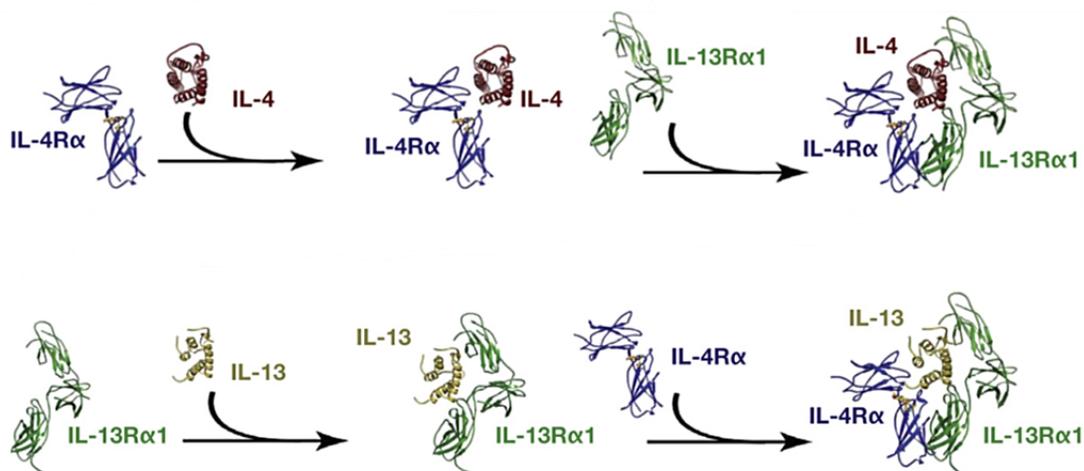


Figure 18 : Formation du récepteur de type II. IL-4 se lie à IL-4R α et le complexe se lie ensuite à IL-13R α 1 alors qu'IL-13 se lie à IL-13R α 1 et le complexe se lie ensuite à IL-4R α (LaPorte et al., 2008).

3.2.2.1. La sous-unité IL-13R α 1

IL-13R α 1 a une taille de 65 kDa et son gène se trouve également sur le chromosome X. Comme pour les deux autres sous-unités, IL-13R α 1 contient les 3 domaines propres aux récepteurs membranaires (Daines and Hershey, 2002, Tabata and Khurana Hershey, 2007). IL-13R α 1 possède, en position N-terminale dans le domaine extracellulaire, un domaine Ig-like qui permet la liaison d'IL-13R α 1 à la face dorsale d'IL-13 (LaPorte et al., 2008). De plus, il contient uniquement deux résidus tyrosine sur son domaine cytoplasmique (Huang et al., 2015).

3.2.2.2. Les voies de de signalisation par le récepteur de Type II IL4R α /IL-13R α 1

JAK1 est associée à IL-4R α et JAK2 et TYK2 sont liées à IL-13R α 1. Après dimérisation du récepteur, les JAK activent STAT6, STAT3 et STAT1 pour migrer dans le noyau. Certaines études ont démontré que le récepteur de type II est également capable d'activer les voies des MAPK et de PI3K/Akt via IRS comme pour le récepteur de type I (**Figure 15**) (Bhattacharjee et al., 2013, Junttila, 2018).

3.2.3. Le récepteur IL-13R α 2

Le gène qui code pour IL-13R α 2, et qui possède 37 % d'homologie avec celui qui code pour IL-13R α 1, se retrouve lui aussi sur le chromosome X (Daines and Hershey, 2002). Ce récepteur de 56 kDa est composé de trois domaines. Le domaine extracellulaire comprend un domaine fibronectine de type III et une protubérance sur laquelle s'y lie IL-13. Cette protubérance est responsable de l'affinité de liaison d'IL-13 pour IL-13R α 2 (Tabata and Khurana Hershey, 2007). Le domaine membranaire contient un motif trileucine critique pour la régulation de l'internalisation du récepteur (Kawakami et al., 2001b). La queue cytoplasmique d'IL-13R α 2 est plus courte que celle des autres sous-unités des récepteurs, et donc il lui manque les domaines BOX pour que s'y lient les JAK. De ce fait, IL-13R α 2 est considéré incapable d'activer des voies de signalisation (Andrews et al., 2006b, Broughton et al., 2012, Kawakami et al., 2001a).

3.2.3.1. Le rôle antagoniste d'IL-13R α 2

Par son affinité supérieure, IL-13R α 2 est considéré comme un récepteur antagoniste inhibant les voies de signalisation activées par IL-13 via le récepteur de type II. En effet, IL-13 se lie préférentiellement à IL-13R α 2 plutôt qu'à IL-13R α 1 puisque cette interleukine a une plus grande affinité pour IL-13R α 2 (0,25 nM) que pour IL-13R α 1 (2-10 μ M) (Andrews et al., 2002). De ce fait IL-13 est internalisé et ne peut donc pas activer des voies de signalisation (Junttila, 2018).

IL-13R α 2 est également capable d'inhiber les voies de signalisation activées par IL-4 sans pourtant être capable de lier ce ligand. Effectivement, il a été démontré dans des cellules de glioblastome, qu'IL-13R α 2 est capable de se lier à IL-4R α . Cette liaison inhibe l'activation de STAT6. De plus, le récepteur antagoniste est capable d'internaliser IL-13R α 1 en s'y liant. De ce fait, il manque une sous-unité pour former le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 ce qui empêche une éventuelle activation de voie de signalisation par IL-4. Plus la concentration en IL-13R α 2 est élevée plus l'inhibition de STAT6 par IL-4 devient importante (Rahaman et al., 2002). Une seconde étude a prouvé, cette fois-ci dans des fibroblastes, qu'une concentration plus élevée d'IL-13R α 2 est nécessaire pour inhiber les effets d'IL-4 (Andrews et al., 2006b).

Le récepteur membranaire IL-13R α 2 peut être clivé en une protéine soluble (sIL-13R α 2) extracellulaire par des métalloprotéinases (MMP), une enzyme dont l'expression est augmentée par IL-13. sIL-13R α 2 possède une affinité 2 à 3 fois plus forte pour IL-13 que la forme membranaire. sIL-13R α 2 peut lier IL-13 ailleurs qu'en surface des cellules qui expriment ce récepteur et peut donc inhiber les effets d'IL-13 dans des zones plus lointaines. La forme soluble est uniquement capable d'inhiber les effets d'IL-13 et non ceux d'IL-4 (Chen et al., 2013, Chen et al., 2009).

3.2.3.2. Le rôle d'IL-13R α 2 dans l'activation des voies de signalisation

Bien qu'IL-13R α 2 ait une courte queue cytoplasmique, certaines études ont prouvé que ce récepteur est capable d'activer des voies de signalisation responsables de la fibrose du poumon et du côlon. Dans les macrophages de souris balb/c sensibilisées au TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique), la liaison d'IL-13 à IL-13R α 2 active AP1, un facteur de transcription composé de jun/fos habituellement activé par la voie des MAPK. AP1 active la transcription du *transforming growth factor* (TGF β) qui induit l'expression de l'*insulin growth factor* (IGF) par l'activation du facteur de transcription SMAD3. En se liant à leurs récepteur, TGF β et IGF permettent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, cellules qui produisent du collagène de type I en abondance. De plus, IGF induit l'expression de l'*early growth response protein* (Egr) qui active la caspase 3 pour provoquer l'apoptose de vieux myofibroblastes (Fichtner-Feigl et al., 2008).

Un second ligand d'IL-13R α 2 a été découvert et se nomme *chitinase-3-like-1* (CHI3L1). CHI3L1 augmente la susceptibilité à développer de l'asthme, provoque l'hyperréactivité bronchique et altère les fonctions pulmonaires (He et al., 2013, Kim et al., 2012). En outre, CHI3L1 est retrouvé dans le sérum de patients atteints de DA et il serait donc responsable en partie de l'activation d'une réponse de type Th2 (Kwak et al., 2019, Salomon et al., 2017).

CHI3L1 lie IL-13R α 2 avec une haute affinité sur un site différent qu'IL-13. De ce fait, les deux ligands ne sont pas en compétition et n'inhibent pas leurs effets respectifs. En se liant à IL-13R α 2, CHI3L1 active ERK, Akt et Wnt/ β -caténine alors que la forme soluble d'IL-13R α 2 inhibe cette activation (He et al., 2013).

Par ailleurs, IL-13R α 2, par sa liaison à IL-13, est responsable de l'activation d'ERK et d'Akt dans certains cancers tels que celui du pancréas et des ovaires. ERK active AP1 dans le noyau pour induire l'expression de MMP. Ces protéinases inhibent la croissance et la prolifération cellulaires et activent l'invasion de métastases (Fujisawa et al., 2009, Fujisawa et al., 2012). A ce jour, la manière dont IL-13R α 2 active ces voies de signalisation reste peu connue. Une étude a démontré qu'IL-13R α 2, responsable des métastases dans le cancer du côlon par son activation par IL-13, active les voies de signalisation d'ERK et d'Akt grâce à une protéine d'échafaudage. Cette protéine est FAM120A qui est également responsable de la migration en surface d'IL-13R α 2 (Bartolome et al., 2015).

IL-13R α 2 est donc capable d'inhiber ou d'activer des voies de signalisation selon la forme sous laquelle il se trouve (soluble ou membranaire). Ces deux formes jouent donc des rôles dans des processus biologiques différents. La forme membranaire est plutôt associée à la fibrose, la sclérose systémique et les cancers, alors que la forme soluble est associée aux infections parasitaires et à l'asthme (Tabata and Khurana Hershey, 2007).

3.3. Les expressions cellulaires des récepteurs

Le récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ est exprimé préférentiellement par les cellules hématopoïétiques. D'ailleurs, JAK3, protéine associée uniquement à la partie intracellulaire de la sous-unité IL-2R γ , est aussi uniquement exprimée dans ces cellules (LaPorte et al., 2008, Schindler et al., 2007).

Le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques, les fibroblastes, les cellules épithéliales respiratoires, les hépatocytes, les kératinocytes et bien d'autres encore (Daines and Hershey, 2002). Ce récepteur est exprimé de manière constitutive dans la plupart des cellules. Toutefois, dans certaines cellules, l'expression du récepteur de type II est régulée de manière différentielle par les IL-4 et IL-13. Ces interleukines augmentent la production d'IL-4R α et d'IL-13R α 1 respectivement dans les lymphocytes T et les lymphocytes B et diminuent la production d'IL-4R α et d'IL-13R α 1 dans les monocytes (Graber et al., 1998).

L'expression d'IL-13R α 2 est induite par IL-4 et IL-13 dans les cellules qui expriment le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1. De plus, IL-13R α 2 peut être produit par TNF α et amené

en surface grâce à l'IFN γ (Daines and Hershey, 2002, David et al., 2001, O'Toole et al., 2008, Yoshikawa et al., 2003).

3.4. Les similitudes et les différences d'effets biologiques entre les IL-4 et IL-13

Puisque les IL-4 et IL-13 partagent un même récepteur, elles ont des fonctions biologiques similaires. En effet, les deux cytokines sont responsables, entre autres, de la production d'IgE et IgG4 par les lymphocytes B ainsi que de l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IgE (Fc ϵ RI) en surface des lymphocytes B, des mastocytes, des éosinophiles et des basophiles. Elles jouent également un rôle dans la production d'éotaxine par les fibroblastes et dans le recrutement de lymphocytes T (Akaiwa et al., 2001, Andrews et al., 2006b).

Toutefois, IL-4 est le seul à agir sur la prolifération et la différenciation des lymphocytes T pour déclencher la sécrétion des interleukines de type Th2. Cette différence est obtenue parce qu'aucun récepteur de l'IL-13 n'est exprimé à la surface des lymphocytes T (Avlas et al., 2022, Iwaszko et al., 2021). IL-13, quant à elle, participe de manière plus importante dans l'hypersensibilité des voies respiratoires. IL-13 induit la production de mucus et la contraction des muscles lisses des bronches, ce qui peut amener à une obstruction des voies respiratoires (Mueller et al., 2002, O'Toole et al., 2008, Shankar et al., 2022). Par ailleurs, LaPorte et ses collègues ont montré, dans des lignées cellulaires d'épithélium de poumon, qu'IL-4 active STAT6 plus rapidement et avec une concentration plus faible qu'IL-13 (LaPorte et al., 2008) (Iwaszko et al., 2021, LaPorte et al., 2008, Minton, 2008, Mueller et al., 2002, O'Toole et al., 2008).

3.5. Les inhibiteurs naturels de l'activation des récepteurs

Les inhibiteurs des voies de signalisation activées par IL-4 et IL-13 permettent d'éviter des effets exacerbés comme constatés dans les maladies inflammatoires. Généralement, ce sont les IL-4 et IL-13 qui induisent la production de ces inhibiteurs pour engendrer une boucle de rétroaction négative. Ces protéines sont les SHP, les *suppressor of cytokine signaling* (SOCS), les *protein inhibitor of activated STAT of transcription* (PIAS) et IL-13R α 2 (**voir section 3.2.3.1**) (Junttila, 2018, Shankar et al., 2022).

Les SHP se lient à la protéine et la déphosphorylent. SHP1, appelée aussi *protein tyrosine phosphatase y* (PTP) inhibe STAT6 en s'y liant. Après déphosphorylation, STAT6 retourne dans le cytoplasme, prête à être utilisée à nouveau (Haque et al., 1998, Schindler et al., 2007). SHP2 inhibe JAK1 et JAK2, PTP1B inhibe TYK2 et JAK2 et PTPx déphosphoryle le récepteur ainsi que JAK1, JAK2 et JAK3 (Babon et al., 2014, Haque et al., 1998).

Les SOCS, au nombre de huit, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 et CIS, ont 40 acides aminés en commun en position N-terminale (Albanesi et al., 2007, Larsen and Ropke, 2002). IL-4 et IL-13 induisent l'expression de SOCS 1 et SOCS 3 (Albanesi et al., 2007). SOCS1 inhibe les JAK en s'y liant grâce à son domaine SH2. Elle empêche donc la phosphorylation du récepteur. En plus d'inhiber les JAK, SOCS3 se lie au récepteur et empêche JAK de phosphoryler le récepteur. SOCS1 est un inhibiteur 10 fois plus efficace que SOCS3 pour JAK2, TYK2 et JAK1 (Babon et al., 2014). Après liaison, les SOCS sont ubiquitinées et dégradées dans le protéasome (Larsen and Ropke, 2002).

4. Les traitements contre la dermatite atopique

Les traitements contre la DA ne permettent pas de guérir la maladie, même s'ils en ciblent les deux causes principales, à savoir une altération de la barrière épidermique et du système immunitaire (De Vuyst et al., 2017). Vu l'hétérogénéité de gravité de la maladie, plusieurs stratégies qui associent efficacité du traitement et bien-être du patient ont été mises en place (Girolomoni et al., 2021). La gravité de la maladie est évaluée par des calculs de scores en fonction des symptômes que présente le patient. Deux types de scores doivent être calculés, le *SCORing Atopic Dermatitis* (SCORAD) et le *Eczema Area and Severity Index* (EASI) (Chopra et al., 2017). Le SCORAD (**Figure 19**) évalue l'étendue (A), la sévérité (B) des lésions ainsi que l'intensité du prurit et du manque de sommeil (C). Le score du SCORAD est compris entre 0 et 103 (Oranje et al., 2007). L'EASI (**Figure 20**) évalue l'étendue (area score) et la sévérité (severity score) de la lésion pour les quatre régions du corps séparément (tête/cou, extrémité supérieure, tronc et extrémité inférieure). Le score est compris entre 0 et 72 (Hanifin et al., 2022). Plus les scores sont élevés, plus la maladie est grave (Simpson et al., 2016).

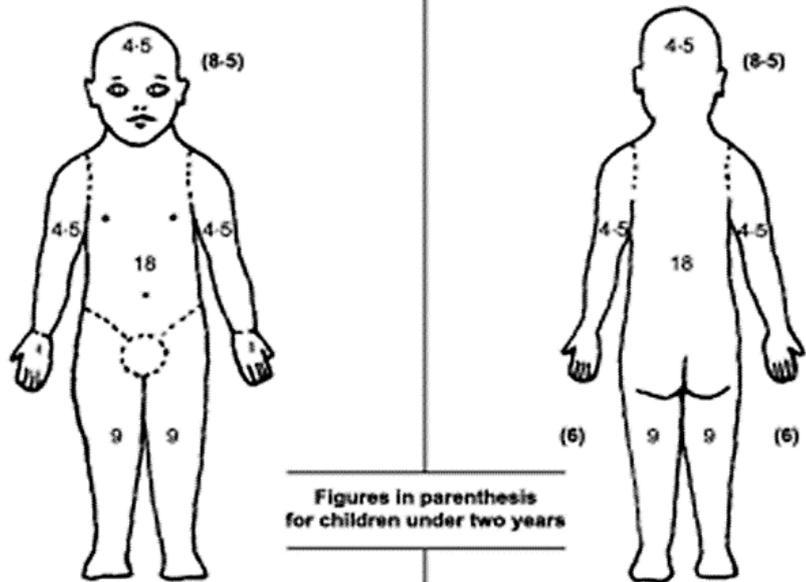
SCORAD INDEX

EUROPEAN TASK FORCE ON ATOPIC DERMATITIS

Last Name First Name

Date of Birth: DD/MM/YY

Date of Visit:



A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

C: SUBJECTIVE SYMPTOMS PRURITUS + SLEEP LOSS

A/5 + 7B/2 + C

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	
Oedema/Papulation	
Oozing/crust	
Excoriation	
Lichenification	
Dryness*	

* Dryness is evaluated on uninvolved areas

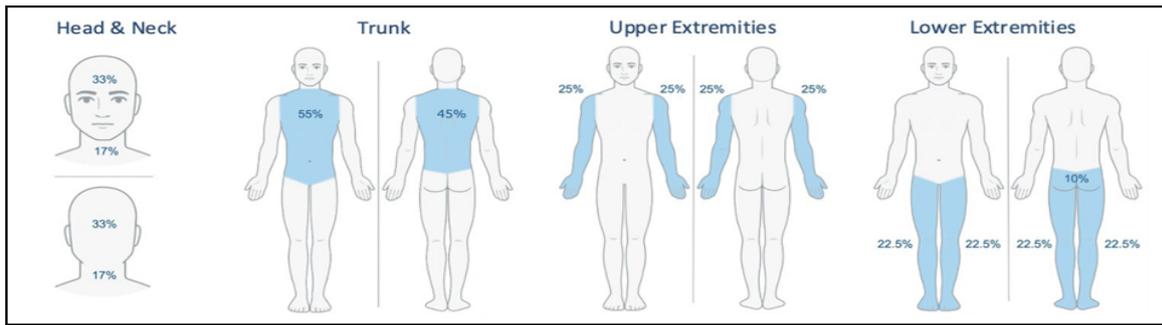
MEANS OF CALCULATION
INTENSITY ITEMS (average representative area)
0 = absence
1 = mild
2 = moderate
3 = severe

Visual analog scale (average for the last 3 days or nights)

PRURITUS (0 to 10) ||| 0 ||| 10

SLEEP LOSS (0 to 10) ||| 0 ||| 10

Figure 19: Evaluation du SCORAD : La fiche est remplie par un professionnel de la santé et le patient. Le SCORAD est égal à la somme de 1/5 du score de l'étendue des lésions (A : Les chiffres sur le corps représentent le score de l'étendue des lésions en fonction de la partie du corps), de 7/2 de la sévérité des différentes lésions (B : 0= pas de lésion, 1 = lésion légère, 2= lésion modérée et 3= lésion sévère) et l'intensité du prurit et du manque de sommeil (C : évaluée de 0 à 10 par le patient). Le score du SCORAD est compris entre 0 et 103 (Oranje et al., 2007)



Severity Score Grade each sign on a scale: 0=clear/none 1=mild 2=moderate 3=severe	Area Score							
	% Involvement	0	1-9%	10-29%	30-49%	50-69%	70-89%	90-100%
	Area Score	0	1	2	3	4	5	6

EASI Calculator (Adults)							
Body Region	Erythema (0-3)	Edema/Papulation (0-3)	Excoriation (0-3)	Lichenification (0-3)	Area Score (0-6)	Multiplier	Score
Head/Neck	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.1	
Trunk	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.3	
Upper Extremities	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.2	
Lower Extremities	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.4	
The final EASI score is the sum of the 4 region scores (0-72):							_____

EASI Calculator (Pediatrics < 8 years old)							
Body Region	Erythema (0-3)	Edema/Papulation (0-3)	Excoriation (0-3)	Lichenification (0-3)	Area Score (0-6)	Multiplier	Score
Head/Neck	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.2	
Trunk	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.3	
Upper Extremities	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.2	
Lower Extremities	(+)	(+)	(+)	()	x	x 0.3	
The final EASI score is the sum of the 4 region scores (0-72):							_____

EASI Score Interpretation					
Clear	Almost Clear	Mild	Moderate	Severe	Very Severe
0	0.1-1.0	1.1-7.0	7.1-21.0	21.1-50.0	50.1-72.0

Figure 20: Evaluation du score EASI : La fiche est remplie par un professionnel de la santé. Le score EASI (EASI calculator) est égal à la somme de la sévérité des lésions pour chacune des régions du corps (tête/cou, extrémité supérieure, tronc et extrémité inférieure) (severity score : 0= pas de lésion, 1 = lésion légère, 2= lésion modérée et 3= lésion sévère) multiplié par l'étendue de la lésion (area score 0 = 0 %, 1= 1-9 %, 2= 10-29 %, 3=30-49 %, 4= 50-69 %, 5=70-89 % et 6=90-100 %) et par le multiplicateur qui dépend de la région du corps et de l'âge du patient (moins de 8 ans ou plus de 8 ans). Le score EASI est compris entre 0 et 72 donc l'interprétation est donnée dans la grille EASI Score Interpretation ((Hanifin et al., 2022).

De ce fait, les traitements prescrits contre la DA sont choisis en fonction de la sévérité de la maladie. Par exemple, pour les formes légères de DA caractérisées par des SCORAD de moins de 25 et des EASI de moins de 7, des traitements de routine sont prescrits tels que des anti-inflammatoires topiques et des crèmes hydratantes. Les médecins ajoutent des conseils pour suivre une certaine hygiène de vie. Pour les formes graves, avec un SCORAD de plus de 50 et un EASI de plus de 21, les médecins prescrivent plutôt des anti-inflammatoires systémiques, des anticorps ou des inhibiteurs de JAK. Les différents traitements existants peuvent être prescrits séparément ou en combinaison, selon la gravité de la maladie et selon le patient. La combinaison des traitements permet de diminuer la concentration de chaque produit et donc d'en diminuer les effets secondaires (Langan et al., 2020, Remitz et al., 2018, Tanei, 2020).

Comme expliqué plus haut, les IL-4 et IL-13 jouent un rôle important dans la physiopathologie de la DA. De ce fait, les anticorps anti-IL-13, les anticorps anti-IL-4R α ou les inhibiteurs de JAK font l'objet de nouveaux traitements contre la DA. L'amélioration de nos connaissances à propos du rôle des différents récepteurs aux IL-4 et IL-13 et de leurs voies de signalisation sur la biologie des kératinocytes et la barrière épidermique est donc importante pour avoir une meilleure compréhension sur le mécanisme de ces nouveaux traitements.

4.1. Les anticorps

La **table 3** est un tableau récapitulatif des essais cliniques réalisés pour étudier l'efficacité et l'innocuité des différents anticorps comme thérapie contre la DA.

Table 3 : Tableau récapitulatif des essais cliniques sur les anticorps dirigés contre IL-4R α ou IL-13 comme thérapie contre la DA.

	Essai clinique	Age (ans) / nombre de patients	Traitement	IGA0/1 (vs Ctrl)	EASI-75 (vs Ctrl)	Diminution du prurit	Augmentation de la qualité de vie	Effets secondaires
Dupilumab (anti-IL-4Rα)	SOLO1	18+ / 671	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 2 semaines pendant 16 semaines	38 % (10 %)	51 % (15 %)	v	v	Réactions au site d'injection + Conjonctivite + Plaques de psoriasis
	SOLO2	18+ / 708	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 2 semaines pendant 16 semaines	36 % (8 %)	44 % (12 %)	v	v	
	Liberty AD Chronos	18+ / 740	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 2 semaines + TCS pendant 52 semaines	36 % (13 %)	65 % (22 %)	v	v	
	Liberty AD	12 à 18 / 251	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 4 semaines pendant 16 semaines	17,9 % (2,4 %)	38,1 % (8,2 %)	v	v	
			600 mg (DI) puis 300 mg (plus de 60 Kg) ou 400 mg (DI) puis 200 mg (moins de 60 Kg) toutes les 2 semaines pendant 16 semaines	24,4 % (2,4 %)	41,5 % (8,2 %)	v	v	
Liberty AD PEDS	6 à 12 / 367	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 4 semaines + TCS pendant 16 semaines	32,8 % (11,4 %)	69,7 % (26,8 %)	v	v		
		400 mg (DI) puis 200 mg (plus de 30 Kg) ou 200 mg (DI) puis 100 mg (moins de 30 Kg) toutes les 2 semaines + TCS pendant 16 semaines	29,5 % (11,4 %)	67,2 % (26,8 %)	v	v		
Tralokinumab (anti-IL-13)	Ecztra 1	18+ / 802	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 2 semaines pendant 16 semaines	15,8 % (7,1 %)	25 % (12,7 %)	v	v	Réactions aux sites d'injection + Conjonctivites + Infections des VRS + Maux de tête
	Ecztra 2	18+ / 793	600 mg (DI) puis 300 mg toutes les 2 semaines pendant 16 semaines	22,2 % (10,9 %)	33,2 % (11,4 %)	v	v	
	Ecztra 3	18+ / 380	300 mg toutes les 2 semaines + TCS pendant 16 semaines	38,9 % (26,2 %)	56 % (35,7 %)	v	v	
Lebrikizumab (anti-IL-13)	phase II	18+ / 209	125 mg toutes les 4 semaines + TCS pendant 12 semaines	33,3 % (18,9 %)	54,9 % (34 %)	n.d	n.d	Réactions aux sites d'injection + Fatigue + Infections des VRS + Maux de tête
	phase II	18+ / 280	500 mg (DI) puis 250 mg toutes les 2 semaines pendant 16 semaines	44,6 % (15,3 %)	60,6 % (24,3 %)	n.d	n.d	

IGA, Investigator's Global Assessment; EASI, Eczema Area and Severity Index; DI, dose initiale; TCS, topical corticosteroid; n.d, non défini; VRS, voies respiratoires supérieures

L'efficacité des traitements est analysée par le pourcentage de patients qui atteignent le score Investigator's Global Assessment (IGA) de 0 ou 1 (IGA0/1). IGA mesure la gravité des lésions dont le 0 équivaut à « pas de lésion » et le 4 équivaut à « lésions très graves ». Cependant, cette mesure sous-estime l'effet du traitement et donc d'autres caractéristiques que la gravité des lésions doivent entrer en compte. Pour ce faire, le pourcentage de patients qui atteignent l'EASI-75 (75 % de réduction du EASI) est calculé (Puar et al., 2021).

4.1.1. Les anticorps qui ciblent IL-4R α : le dupilumab

Le dupilumab est un anticorps humain monoclonal recombinant dirigé contre la sous-unité IL-4R α (Bakker et al., 2021b). Les essais cliniques pour le dupilumab (Puar et al., 2021)

reprennent les essais cliniques SOLO1, SOLO2 (Simpson et al., 2016) , Liberty AD Chronos (Blauvelt et al., 2017), Liberty AD (Simpson et al., 2020) et Liberty AD PEDS (Paller et al., 2020). En 2016, le dupilumab est devenu le premier traitement biologique accepté par le FDA (Food and Drug Administration) comme traitement contre la DA (Thibodeaux et al., 2019). Dès 2019, puis 2020, ce traitement a été mis sur le marché pour respectivement les adolescents (12 à 18 ans) et les enfants (6 à 11 ans) (Puar et al., 2021).

En plus de son effet thérapeutique, le dupilumab est utilisé dans des études in vivo sur des modèles de DA pour analyser le rôle des IL-4 et IL-13 dans cette pathologie. Le dupilumab est capable de se lier à IL-4R α endéans les 2 heures d'administration pour inhiber les voies de signalisation activées par IL-4 et IL-13 (Bakker et al., 2021b). Le blocage d'IL-4R α induit une diminution de l'expression d'IgE, de TARC et d'éotaxine-3. Comme le TARC et l'éotaxine-3 sont deux cytokines qui induisent l'attraction de lymphocytes Th2 et d'éosinophiles, le dupilumab diminue le taux sanguin d'éosinophiles (Hamilton et al., 2021). Le traitement par le dupilumab augmente également la quantité de lymphocytes T régulateurs, ce qui résulte à une diminution de la réponse inflammatoire (Bakker et al., 2021b).

4.1.2. Les anticorps qui ciblent IL-13 : le tralokinumab et le lébrikizumab

Une plus grande concentration en IL-13 qu'une concentration en IL-4 dans la DA suggère qu'IL-13 joue un rôle plus important dans la physiopathologie de la maladie. De ce fait, une des nouvelles stratégies pour traiter la DA est de cibler IL-13. Des essais cliniques ont été réalisés sur deux anticorps IgG4 monoclonaux, le tralokinumab et le lébrikizumab (Guttman-Yassky et al., 2020, Puar et al., 2021). L'anticorps humain tralokinumab, qui se lie à IL-13 avec une haute affinité, est capable d'empêcher la liaison d'IL-13 sur IL-13R α 1 et sur IL-13R α 2 (Popovic et al., 2017). En revanche, l'anticorps humanisé lébrikizumab qui se lie à IL-13 sur un épitope différent, empêche plutôt la dimérisation d'IL-13R α 1 avec IL-4R α (Labib et al., 2022). Ces deux anticorps préviennent l'activation des voies de signalisation par IL-13 (**Figure 21**).

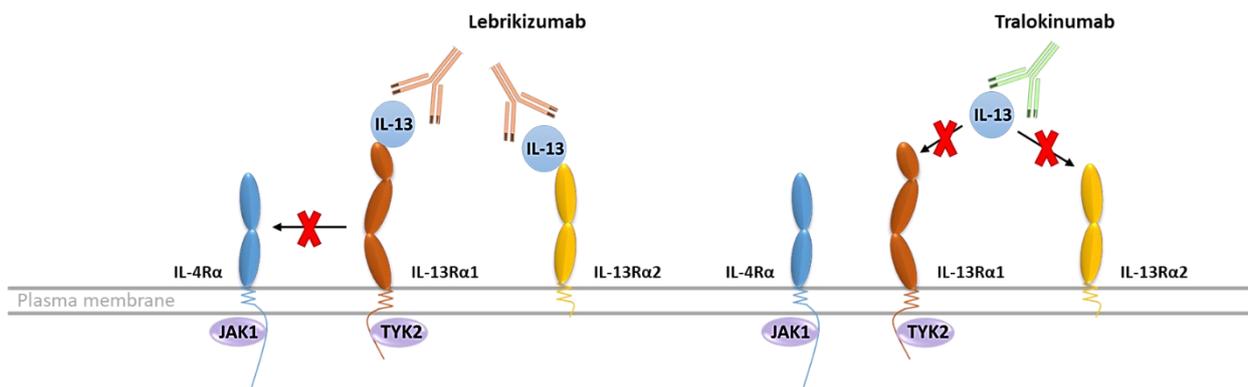


Figure 21: Mécanisme d'action du lébrikizumab et du tralokinumab. Le lébrikizumab cible IL-13 pour empêcher la dimérisation d'IL-13Rα1 avec IL-4Rα. Le tralokinumab cible IL-13 pour empêcher IL-13 de se lier à IL-13Rα1 et à IL-13Rα2.

A ce jour, trois essais cliniques en phase III (Ecztra 1, Ecztra2 (Wollenberg et al., 2021) et Ecztra 3 (Silverberg et al., 2021)) ont été réalisés pour étudier le tralokinumab comme thérapie contre la DA et deux essais cliniques en phase II pour le lébrikizumab. Le lébrikizumab n'est donc pas encore sur le marché. Toutefois, des essais cliniques en phase III sont en cours de réalisation (Guttman-Yassky et al., 2020, Labib et al., 2022).

Les essais cliniques sur le tralokinumab ECZTRA 1 et 2 ont été prolongés jusqu'à 52 semaines (Wollenberg et al., 2021) alors que l'essai ECZTRA3 (Silverberg et al., 2021) a été prolongé jusqu'à 32 semaines. Les patients qui répondaient au traitement initial ont été séparés en trois groupes ; un groupe placebo, un groupe traité toutes les 2 semaines et un groupe traité toutes les 4 semaines. Entre 20 et 40 % des patients dans le groupe placebo ne subissent pas de rechute vs entre 50 à 60 % dans le groupe traité toutes les 2 semaines et 40 à 50 % des patients traités toute les 4 semaines. Ces résultats montrent que le fait de cibler IL-13 durant une courte période permet de briser le cycle vicieux entre l'altération de la barrière et la dérégulation du système immunitaire chez certains patients. Chez d'autres patients, il est néanmoins nécessaire de poursuivre le traitement mais, de préférence, à des fréquences d'administration plus élevées.

4.2. Les inhibiteurs de JAK

Les inhibiteurs de JAK sont de petites molécules capables de se lier au domaine de liaison à l'ATP des différentes JAK pour inhiber l'activation des voies de signalisation JAK/STAT (Morinobu, 2020). Les inhibiteurs de JAK sont divisés en deux groupes, les inhibiteurs de première génération et de deuxième génération. Les inhibiteurs de première génération sont moins sélectifs que ceux de deuxième génération. A ce jour, quatre inhibiteurs de JAK ont été approuvés comme traitement contre la DA (**Table 4**) qui sont le ruxolitinib (TRuE AD1 et TRuE AD2 (Papp et al., 2021)), l'abrocitinib (JADE MONO 1, JADE MONO 2 et JADE

compare (Ferreira et al., 2020)), l'upadacitinib (Measure Up 1, Measure Up 2 (Guttman-Yassky et al., 2021) et AD Up (Silverberg et al., 2022)) et le baricitinib (Breeze AD 1, Breeze AD 2, Breeze AD 4 et Breeze AD 7 (Radi et al., 2021)). Néanmoins, des essais cliniques étudient d'autres inhibiteurs de JAK tels que le delgocitinib, le tofacitinib, le brepocitinib et l'ifidancitinib qui seront peu détaillés dans cette thèse (Nakashima et al., 2022). Tous ces inhibiteurs ont des spécificités différentes pour les différentes JAK. En effet, le ruxolitinib et le baricitinib inhibent spécifiquement JAK1 et JAK2 alors que l'abrocitinib et l'upadacitinib sont des inhibiteurs oraux spécifiques de JAK1 (Witkoff et al., 2022).

Les quatre autres inhibiteurs topiques de JAK sont étudiés pour l'instant, le delgocitinib (dirigé contre les quatre JAK), le tofacitinib (dirigé contre JAK1, JAK2 et JAK3), le brepocitinib (dirigé contre JAK1 et TYK2) et l'ifidancitinib (dirigé contre JAK1 et JAK3). À ce jour, des essais cliniques en phase II ont été finalisés pour étudier l'efficacité de ces différents inhibiteurs. Une amélioration du EASI et du prurit est observée dans les groupes traités par rapport aux groupes placebo. Par ailleurs, les traitements sont bien tolérés même si des effets indésirables, comme des infections, des éruptions et de l'acné, peuvent être observés (Witkoff et al., 2022).

Table 4: Tableau récapitulatif des essais cliniques sur les inhibiteurs de JAK comme thérapie contre la DA.

	Essai clinique	Age (ans) / nombre de patients	Traitement	IGA0/1 (vs Ctrl)	EASI-75 (vs Ctrl)	Diminution du prurit	Augmentation de la qualité de vie	Effets secondaires
Ruxolitinib (JAK1/JAK2)	TRuE AD 1	12+ / 635	crème de 1.5 % de ruxolitinib (topie) 2X/jour pendant 8 semaines	53,8 % (15,1 %)	62,1 % (24,61 %)	v	v	Etude de l'innocuité à long terme (52 semaines) est en cours de réalisation
	TRuE AD 2	12+ / 618	crème de 1.5 % de ruxolitinib (topie) 2X/jour pendant 8 semaines	51,3 % (7,6 %)	61,8 % (14,4 %)	v	v	
Abrocitinib (JAK1)	JADE MONO 1	12+ / 387	100 mg (oral) 1X/jour pendant 12 semaines	23,7 % (7,9 %)	39,7 % (11,8 %)	v	n.d	Nausées + Acné + Maux de tête + Infections des VRS
			200 mg (oral) 1X/jour pendant 12 semaines	43,8 % (7,9 %)	62,7 % (11,8 %)	v	n.d	
	JADE MONO 2	12+ / 391	100 mg (oral) 1X/jour pendant 12 semaines	28,4 % (19,1 %)	44,5 % (10,4 %)	v	n.d	
			200 mg (oral) 1X/jour pendant 12 semaines	38,1 % (19,1 %)	61 % (10,4 %)	v	n.d	
	JADE Compare	12+ / 834	100 mg (oral) 1X/jour + TCS pendant 12 semaines	36,6 % (14 %)	58,9 % (27,1 %)	v	n.d	
			200 mg (oral) 1X/jour + TCS pendant 12 semaines	48,4 % (14 %)	70,3 % (27,1 %)	v	n.d	
Upadacitinib (JAK1)	Measure Up 1	12+ / 847	30 mg (oral) 1X/jour pendant 12 semaines	62 % (8,4 %)	79,7 % (16,3 %)	v	v	Etude de l'innocuité à long terme (52 semaines) est en cours de réalisation
	Measure Up 2	12+ / 836	30 mg (oral) 1X/jour pendant 12 semaines	52 % (4,7 %)	72,9 % (13,3 %)	v	v	
	AD Up	12+ / 901	30 mg (oral) 1X/jour + TCS pendant 12 semaines	58,4 % (11,2 %)	76,9 % (26,3 %)	v	v	
Baricitinib (JAK1/JAK2)	Breeze AD1	18+ / 624	4 mg (oral) 1X/jour pendant 16 semaines	16,4 % (4,8 %)	24,8 % (8,8 %)	v	v	Maux de tête + Infections des VRS
	Breeze AD2	18+ / 615	4 mg (oral) 1X/jour pendant 16 semaines	13,8 % (4,5 %)	21,1 % (6,1 %)	v	v	
	Breeze AD4	18+ / 463	4 mg (oral) 1X/jour + TCS pendant 16 semaines	21,7 % (9,7 %)	31,5 % (17,2 %)	v	v	
	Breeze AD7	18+ / 329	4 mg (oral) 1X/jour + TCS pendant 16 semaines	30,6 % (14,7 %)	47,7 % (14,7 %)	v	v	

IGA, Investigator's Global Assessment; EASI, Eczema Area and Severity Index; TCS, topical corticosteroid; n.d, non défini; VRS, voies respiratoires supérieures

5. Les modèles de dermatite atopique

Bien que la physiopathologie de la DA soit étudiée depuis les années 40, ses traitements ne permettent pas de guérir complètement de la maladie. Puisque cette maladie est très hétérogène, plusieurs variants de la DA sont connus et dépendent de l'âge et de l'ethnie du patient ainsi que de l'âge d'apparition de la maladie. Les patients vont donc réagir différemment par rapport aux traitements existants. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier cette maladie plus en profondeur afin de trouver de nouvelles thérapies. (Bakker et al., 2021a).

5.1. Les modèles *in vivo*

Il existe de nombreux modèles animaux pour étudier la DA. Bien que les chiens, les chats et les chevaux développent spontanément la DA, les modèles murins sont préférés car les souris sont facilement manipulables et moins chères (Marsella and De Benedetto, 2017, Marsella and Girolomoni, 2009). Il est également relativement aisé de modifier leurs codes génétiques. Trois procédés différents existent pour obtenir des modèles murins de DA. Certaines souris développent spontanément des lésions AD-like telles que les souris Nc/NgA et les souris FLG^{fl/fl}. D'autres modèles sont obtenus par modification génétique des souris afin d'induire une perte de l'expression de la filaggrine ou une surexpression de TSLP, d'IL-4, d'IL-13, d'IL-31 ou d'IL-33 (Guerrero-Aspizua et al., 2020). Enfin, les souris développent également un phénotype de DA en étant exposées à des allergènes tels que l'ovalbumine et les acariens ou à des haptènes tels que 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzène et l'oxazolone. Pour améliorer le modèle, les souris exposées à des allergènes ou à des haptènes peuvent être modifiées génétiquement ou subir des lésions par tape-stripping (Guerrero-Aspizua et al., 2020, Matsumoto et al., 2021). Ces modèles présentent certaines caractéristiques retrouvées chez les patients atteints de DA comme le prurit, la sécheresse et les lésions ainsi qu'une altération de la barrière épidermique, une hyperplasie de l'épiderme et une réponse immunitaire de type Th2 avec une infiltration de cellules immunitaires dans le derme et une augmentation de production d'IgE dans le sérum. Néanmoins, ces modèles sont difficilement extrapolables chez l'humain car la peau de souris est différente de la peau humaine. En effet, il y a seulement 4 à 37 % de caractéristiques similaires, selon le modèle, entre ces souris modèle de DA et les patients atteints de DA (Guerrero-Aspizua et al., 2020, Shiohara et al., 2004).

5.2. Les modèles *in vitro*

Comme les tests de produits cosmétiques (produits finis ou ingrédients) sur les animaux de laboratoire ont été prohibés dans l'Union Européenne (Regulation (EC) No 1223/2009) pour des raisons éthiques, des modèles *in vitro* en 2D et en 3D ont été développés afin d'étudier l'effet de ces cosmétiques sur la peau (De Vuyst et al., 2017). Grâce à cela, de nombreux modèles *in vitro* (**Figure 22**) qui utilisent des cellules humaines ont été mis en place pour étudier la DA. La DA peut être étudiée dans des modèles de kératinocytes ou de cellules immunitaires cultivés en monocouche. Les avantages de ces modèles sont l'étude du rôle d'un type cellulaire spécifique et l'acquisition facile et rapide de résultats. Les cellules sont soit stimulées par des substances pour les activer, soit modifiées génétiquement (Lowa et al., 2018). Par exemple, la stimulation des kératinocytes par les IL-4 et IL-13 a permis d'étudier l'activation de voies de signalisation et l'altération du transcriptome par ces interleukines. En outre, l'étude du rôle de la filaggrine dans les kératinocytes a pu être réalisée grâce à un *Knock-Down* (KD) de la FLG par des shRNA (Hennies and Poumay, 2021). Par ailleurs il est possible de réaliser des cocultures pour étudier l'interaction entre deux types cellulaires différents. La limite des modèles de kératinocytes cultivés en monocouche est l'absence de différenciation épidermique et de barrière efficace comme observées dans un épiderme humain (Hennies and Poumay, 2021, Lowa et al., 2018).

Pour cela, des modèles en 3D ont été développés afin de reconstruire un épiderme qui mime l'*in vivo* en termes d'architecture, de différenciation et de barrière (Hennies and Poumay, 2021, Lowa et al., 2018). Deux types de modèles ont été créés : les peaux humaines reconstruites (HSE) et les épidermes humains reconstruits (RHE). Les HSE contiennent un derme équivalent et un épiderme. Le derme est produit soit par la mise en culture des fibroblastes qui synthétisent et s'entourent de leurs propres matrices extracellulaires, soit par un gel contenant du collagène et des fibroblastes, soit encore par détachement de l'épiderme d'un explant humain (De Vuyst et al., 2017). Les HSE et les RHE sont produits à partir de kératinocytesensemencés sur respectivement un derme équivalent et un filtre en polycarbonate. Après adhésion au derme ou au filtre, les kératinocytes sont placés à l'interface air-liquide afin de permettre la kératinisation terminale et la reconstruction d'un épiderme avec une barrière efficace (Bataillon et al., 2019, Frankart et al., 2012a). Comme pour les modèles en monocouche, les HSE et RHE peuvent être stimulés par des molécules ou modifiés génétiquement. L'avantage des HSE par rapport aux RHE est la possibilité d'étudier l'interaction entre le derme et l'épiderme. Néanmoins, les HSE, modèle plus complexe, mettent plus de temps à être reconstruits. Par ailleurs, l'étude de la physiopathologie de la DA avec un

modèle RHE permet de mieux comprendre l'altération du phénotype des kératinocytes et de la barrière épidermique, étant donné que les RHE sont composés uniquement de kératinocytes (De Vuyst et al., 2017, Hennies and Poumay, 2021).

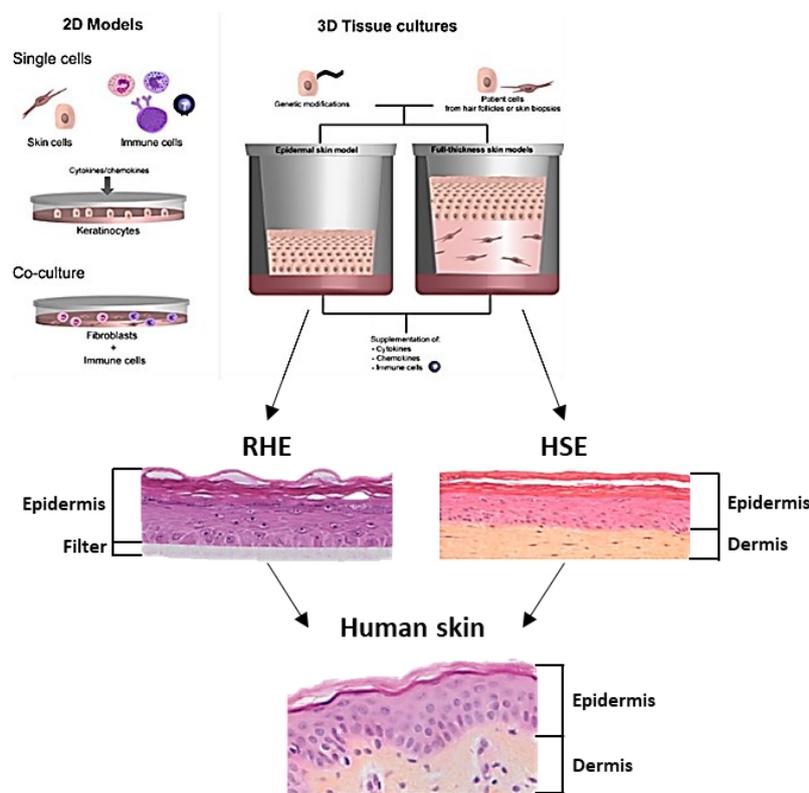


Figure 22: Les différents modèles *in vitro* de DA. Les modèles *in vitro* de DA comprennent les modèles en 2D (les kératinocytes ou les cellules immunitaires cultivés en monocouche avec (co-culture) ou sans (single cells) fibroblastes) et les modèles en 3D (les épidermes humains reconstruits (RHE) et les peaux humaines équivalentes (HSE)). Les modèles 3D ont de nombreuses similitudes avec les peaux humaines (Lowa et al., 2018, Bataillon et al., 2019 et de Frankart et al., 2012b).

Dans notre laboratoire, le modèle RHE a été mis au point soit pour étudier l'effet d'irritants et de sensibilisants (Frankart et al., 2012a) soit pour créer des modèles de DA (De Vuyst et al., 2018) ou de dermatophytoses (Faway et al., 2017). Les RHE, après mise en interface air-liquide, sont reconstruits en 11 jours (**Figure 23**). Ces RHE expriment les marqueurs de différenciation dans les quatre couches comme observés dans un épiderme humain. En effet, la couche basale est formée d'une unique couche en colonne et synthétise les marqueurs de la couche basale, tel que la kératine 14 (K14). Les cellules de la couche épineuse sont attachées entre elles par des desmosomes et elles expriment la kératine 10 (K10). La couche granuleuse contient les granules de kératohyalines et les kératinocytes de cette couche produisent l'involucrine et surtout la filaggrine. La couche cornée est formée de cellules acidophiles dépourvues de noyau. Les épidermes sont stimulés à jour 11 (J11) puisqu'il n'y a

pas de processus de desquamation et, qu'au-delà de cette période, la couche cornée s'épaissit, éloignant le modèle de la structure de l'épiderme tel qu'observé *in vivo* (Frankart et al., 2012b).

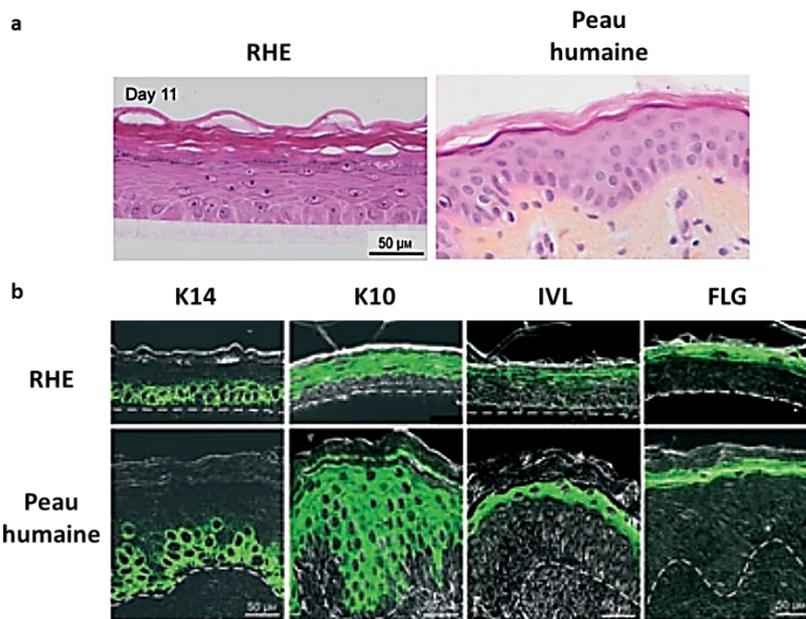


Figure 23 : Comparaison entre RHE et peau humaine. (a) les RHE présentent la même morphologie que et les épidermes humains avec ses 4 couches (basale, épineuse, granuleuse et cornée). (b) Comme pour les épidermes humains, les RHE expriment la kératine-14 (K14) dans la couche basale, la kératine-10 (K10) dans la couche épineuse et l'involucrine (IVL) et la filaggrine (FLG) dans la couche granuleuse (Frankart et al., 2012b).

5.3. Le modèle RHE de DA et le rôle des interleukines 4 et 13

La DA est étudiée dans un modèle de RHE stimulé aux IL-4 et IL-13 (Danso et al., 2014, Evrard et al., 2021a). Dans certaines études, l'IL-25, une cytokine qui est exprimée dans la DA et qui diminue l'expression de la filaggrine, a également été ajoutée aux mix d'interleukines (De Vuyst et al., 2018, Kamsteeg et al., 2011). Les RHE stimulés aux IL-4 et IL-13 subissent une hypogranulose, une spongiose (**voir section 2.2.2 : les caractéristiques histologiques**) (Danso et al., 2014, De Vuyst et al., 2018, do Nascimento Pedrosa et al., 2017, Hubaux et al., 2018) et une altération de la barrière épidermique caractérisée par une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et une augmentation de la perméabilité à la Lucifer Yellow (De Vuyst et al., 2018, do Nascimento Pedrosa et al., 2017). La Lucifer Yellow est une molécule fluorescente qui est posée au-dessus du RHE. La Lucifer Yellow, de caractéristique hydrophile, traverse difficilement la couche cornée qui est hydrophobe. Néanmoins, si la barrière est altérée, la molécule est capable de traverser la couche cornée et d'atteindre les couches vivantes de l'épiderme (Blume-Peytavi et al., 2016). Les IL-4 et IL-13 diminuent dans les kératinocytes l'expression de la FLG et la LOR (Danso et al., 2014, Hubaux et al., 2018) et

augmentent l'expression de *Neural EGFL Like 2* (NELL2) et de l'anhydrase carbonique 2 (CA2), deux marqueurs de DA connus (**Figure 24**) (De Vuyst et al., 2018, do Nascimento Pedrosa et al., 2017, Hubaux et al., 2018). Bien qu'il ait été prouvé que l'expression de ces protéines augmentent dans les peaux lésionnelles de patients atteints de DA, leur rôle dans cette maladie n'est pas bien connu. Il a été posé comme hypothèse que NELL2 est responsable de l'augmentation du nombre de fibres nerveuses ce qui induit le prurit chez les patients (Kamsteeg et al., 2011). CA2 catalyse la réaction chimique suivante : $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$. Dans ce cas, CA2 pourrait jouer un rôle dans la réduction de l'acidité. De plus, CA2 permet le transport d'eau hors de la cellule et pourrait donc être en partie responsable de la spongiose (Kamsteeg et al., 2007). IL-4 et IL-13 augmentent également l'expression de l'*hyaluronic acid synthase 3* (HAS3) qui synthétise l'HA à bas poids moléculaire (De Vuyst et al., 2018, do Nascimento Pedrosa et al., 2017, Evrard et al., 2021b). L'HA s'accumule donc dans les espaces interstitiels qui sont plus importants du fait de l'altération des cadhérines. Par ailleurs, il a été constaté récemment que la protéine *TNF-stimulated gene-6* (TSG-6), dont l'expression est fortement induite par IL-4 et IL-13, retient l'HA dans les espaces intercellulaires. Etant donné que l'HA est capable de retenir l'eau, cette accumulation serait responsable de la spongiose (Evrard et al., 2021a, Evrard et al., 2021b).

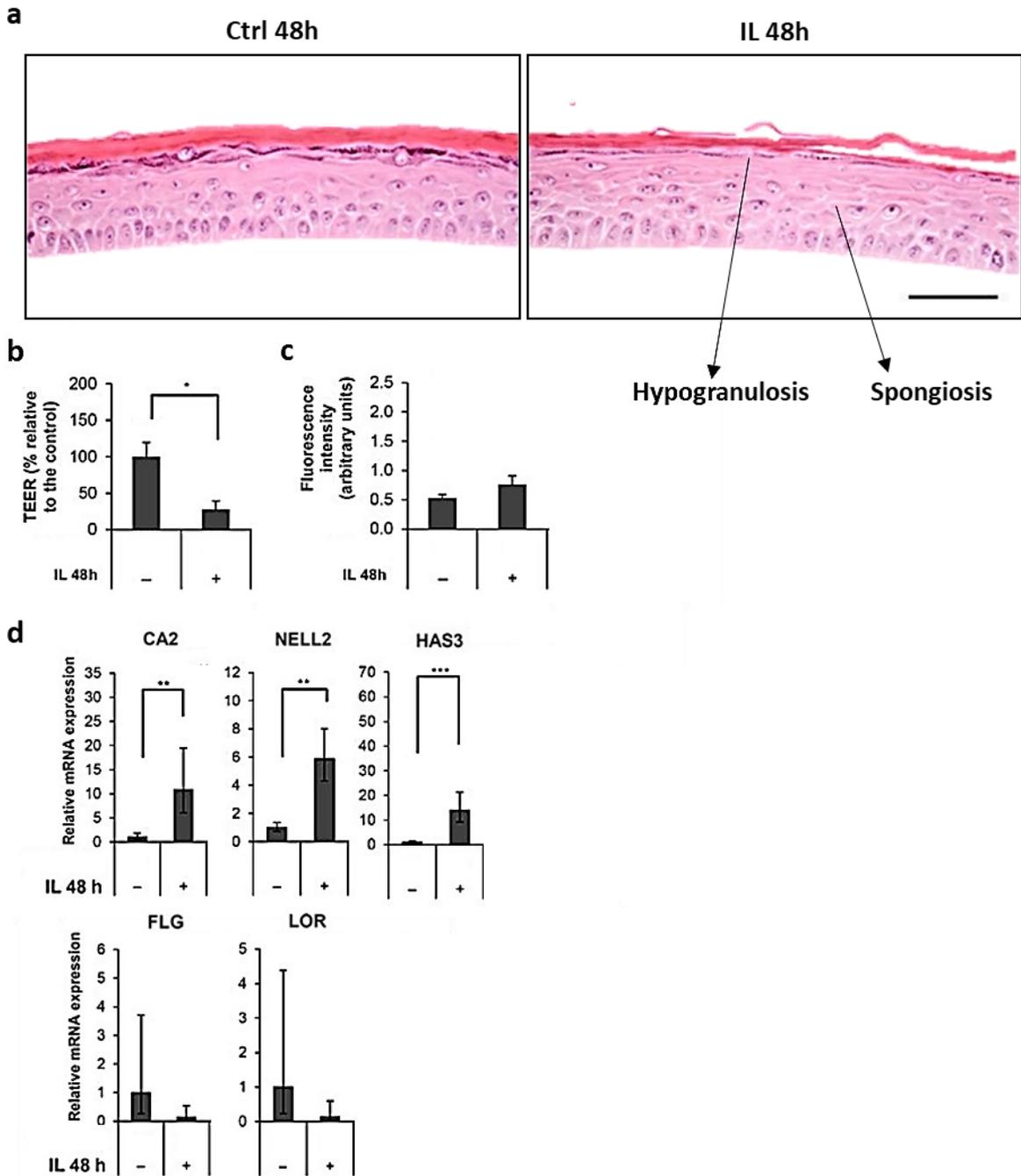


Figure 24 : IL-4 et IL-13 modifient le phénotype des épidermes, altèrent la barrière épidermique et la transcription de gènes. Les épidermes ont été stimulés 48 heures avec les IL-4, IL-13 et IL-25. (a) Les sections histologiques des RHE stimulés aux interleukines montrent une hypogranulose et une spongiose. (b) La résistance électrique transépithéliale (TEER) est diminuée et (c) la perméabilité à la Lucifer Yellow est augmentée par les interleukines. (d) L'expression relative en ARNm de CA, NELL2, HAS3 augmente et l'expression relative en ARNm de FLG et LOR diminue avec les interleukines (De Vuyst et al., 2016).

Pour étudier l'impact d'IL-4, IL-13 et IL-25 sur l'expression de nombreux gènes dans des épidermes humains reconstruits, une analyse transcriptomique par *microarray* a été réalisée. Parmi les résultats obtenus, un gène a particulièrement retenu notre attention. En effet, IL-4, IL-13 et IL-25 augmentent dans les kératinocytes épidermiques l'expression génique d'IL-2R γ , une des sous-unités du récepteur de type I des IL-4, qui normalement n'est exprimée que dans les cellules hématopoïétiques. Cette découverte éclaire le rôle éventuel de ce récepteur dans les épidermes ainsi qu'au niveau de la barrière épidermique chez les patients atteints de DA (Park et al., 2021).

OBJECTIFS

La DA est la maladie inflammatoire de la peau la plus commune dont l'incidence augmente au cours des années. Cette maladie dont de nombreuses questions restent en suspens est très hétérogène au niveau clinique (Bieber, 2022). Bien qu'il y ait des progrès sur la conception de nouvelles thérapies, la réponse aux traitements est différente en fonction du patient. C'est pourquoi il est important d'avoir une compréhension plus complète de la physiopathologie de cette maladie afin de développer de nouvelles thérapies.

Il est connu que les IL-4 et IL-13 jouent un rôle important dans le développement de la DA. Nous nous sommes donc intéressés principalement aux **rôles de ces interleukines et de leurs récepteurs dans la modification du phénotype des kératinocytes et dans l'altération de la barrière épidermique**. L'étude a été réalisée dans des RHE, modèles constitués uniquement de kératinocytes différenciés et d'une barrière efficace. IL-4 et IL-13 sont capables d'activer le récepteur de type II, exprimé de façon constitutive à la surface des kératinocytes. Ces interleukines induisent également l'expression d'IL-13R α 2, récepteur antagoniste de l'IL-13. Récemment, une étude a constaté une possible expression d'IL-2R γ dans des kératinocytes stimulés aux IL-4, IL-13 et IL-25 (Park et al., 2021). Cette sous-unité de récepteur est connue pour être exprimée uniquement dans les cellules hématopoïétiques et son expression dans les kératinocytes remet donc en question son rôle dans la peau lors d'une réponse inflammatoire de type Th2.

Le premier objectif ayant mené à cette thèse a été **d'étudier l'induction de l'expression d'IL-2R γ par les kératinocytes via l'activation du récepteur de type II par IL-4 et IL-13** en inhibant les voies de signalisation par des inhibiteurs de JAK et par une production de kératinocytes déficients pour le gène IL13RA1. L'expression en ARNm d'IL-2R γ dans des kératinocytes a également été analysée *in vivo* par l'analyse par hybridation *in situ* d'épidermes de patients atteints de DA.

Puisqu'IL-2R γ est capable de former le récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ activable par l'IL-4, le second objectif de ce travail a été **d'étudier le rôle éventuel de ce récepteur dans la modification du phénotype des kératinocytes et dans l'efficacité de la barrière épidermique**. Cette étude a été réalisée sur des épidermes reconstruits à partir de kératinocytes déficients pour le gène IL2RG.

Ce travail élargit la connaissance et la compréhension des rôles des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans les kératinocytes épidermiques. Le modèle utilisé permet d'améliorer notre compréhension des mécanismes des anticorps anti-IL-4R α , des anticorps anti-IL-13 ou des inhibiteurs de JAK lors de traitements contre la DA.

RESULTATS

Puisque la DA est une maladie inflammatoire fortement hétérogène au niveau clinique, les patients répondent différemment aux traitements existants. Beaucoup d'études ont, de ce fait, été générées afin de mieux comprendre la physiopathologie de la DA, entre autres via un modèle d'épidermes reconstruits stimulés aux IL-4 et IL-13 (De Vuyst et al., 2016, do Nascimento Pedrosa et al., 2017, Hubaux et al., 2018, Park et al., 2021). Grâce à ce modèle, il a été démontré que les IL-4 et IL-13 sont capables de modifier le phénotype des épidermes et d'altérer la barrière épidermique, probablement par l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur commun de type II IL-4R α /IL-13R α 1. Bien que le récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ se trouve normalement exprimé en surface des cellules hématopoïétiques, ce récepteur semble être induit dans les kératinocytes exposés aux IL-4 et IL-13. Par ailleurs, le récepteur IL-13R α 2, considéré comme un récepteur antagoniste, est également exprimé par des kératinocytes exposés aux IL-4 et IL-13 (LaPorte et al., 2008, Park et al., 2021, Ulzii et al., 2019). Ce travail de recherche s'est donc focalisé sur **l'expression et le(s) rôle(s) des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans les kératinocytes épidermiques.**

Dans un premier temps, l'expression des trois récepteurs a été analysée dans des kératinocytes primaires cultivés en épiderme reconstruit (RHE) stimulés par les IL-4 et IL-13. Aucune modification de l'expression des sous-unités formant le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 par les interleukines n'a été observée. En revanche, les expressions d'IL-2R γ et d'IL-13R α 2 sont induites dans les RHE exposés aux mêmes interleukines. L'ARNm d'IL-2R γ est également détecté dans les kératinocytes de peaux de DA mais pas dans les peaux saines.

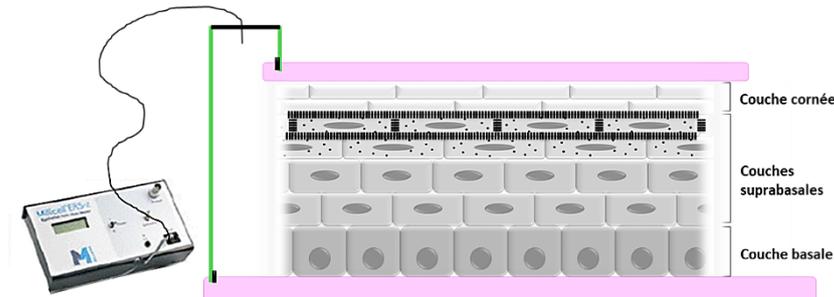
Comme le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 est le seul récepteur des IL-4 et IL-13 exprimé de manière constitutive dans les kératinocytes, l'activation de celui-ci est probablement responsable de l'induction des deux autres. Cette induction par le récepteur de type II a donc été étudiée dans des RHE, soit par le blocage des voies de signalisation d'IL-4 et IL-13 par des inhibiteurs de JAK, soit par l'édition du gène qui code pour IL-13R α 1.

Les inhibiteurs de JAK, le tofacitinib, l'upadacitinib, le ruxolitinib et le deucravacitinib, sont ajoutés au milieu de culture des RHE après 11 jours de reconstruction. Après une incubation de 15 heures les RHE ont été traités 48 heures aux IL-4 et IL-13. Les quatre inhibiteurs sont connus pour avoir des affinités différentes pour les différentes JAK.

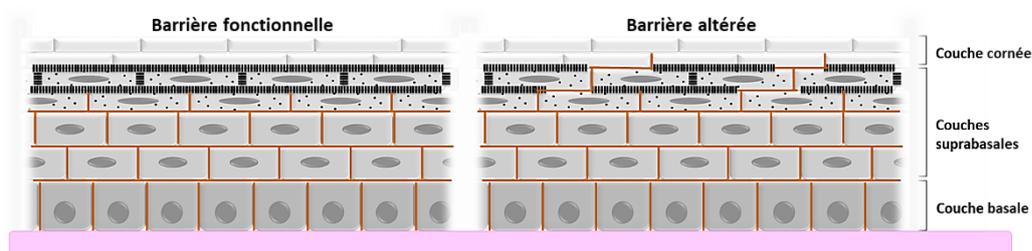
L'édition de gènes, est réalisée dans des kératinocytes immortalisés N/TERT provenant d'un patient mâle et a été mise au point dans notre laboratoire par Céline Evrard (Evrard et al., 2021a). Puisque le gène IL13RA1 est localisé sur le chromosome X, un seul allèle doit être délété. Les épidermes reconstruits à partir de kératinocytes IL13RA1⁻⁰ sont exposés 48 heures aux IL-4 et IL-13 et sont comparés à ceux reconstruits à partir de kératinocytes IL13RA1⁺⁰.

Les résultats obtenus confirment que l'activation du récepteur de type II est responsable d'une induction de l'expression des deux autres récepteurs aux IL-4 et IL-13. De plus, l'activation du récepteur de type II par IL-4 et IL-13 régule l'expression de marqueurs de DA tels que CA2, NELL2, FLG et LOR et altère la barrière épidermique. L'efficacité de la barrière a été analysée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et par la perméabilité à la biotine (**Figure 25**). Une fois le traitement terminé, du milieu de culture est ajouté au-dessus du RHE afin de générer un courant électrique grâce à deux électrodes, une placée au-dessus et l'autre placée en-dessous du tissu pour en mesurer la résistance. Plus la résistance est grande, plus la barrière est efficace. Un RHE ayant une résistance proche ou supérieure à 7.000Ω possède une barrière efficace. Après la mesure de TEER, du milieu contenant de la biotine est placé en-dessous du RHE. Après 30 minutes d'incubation, les RHE sont fixés et la biotine est reconnue par de la streptavidine couplée à une peroxydase de raifort (HRP) qui catalyse l'oxydation du diaminobenzidine (DAB) en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former un précipité brun. Si la barrière est efficace, la biotine qui remonte à travers le RHE est incapable de passer les jonctions serrées de la couche granuleuse. Suite à l'altération des jonctions, et donc de la barrière, la biotine remonte jusque dans la couche cornée.

Test de résistance électrique transépithéliale



Test de perméabilité à la biotine



III Jonctions serrés — Biotine • Granules de kératohyaline

Figure 25 : Représentation schématique des tests de résistance électrique transépithéliale (TEER) et de perméabilité à la biotine. (a) Des électrodes sont placées dans du milieu de culture au-dessus et en-dessous du RHE pour faire passer un courant électrique à travers le tissu. La TEER est mesurée par un voltmètre (Millicell® ERS-2 Voltohmmeter). (b) La biotine est mise dans le milieu de culture en-dessous du RHE. Celle-ci va diffuser à travers le tissu jusqu'aux jonctions serrées de la couche granuleuse. Après altération de la barrière, la biotine est capable de traverser la couche granuleuse et se retrouve dans la couche cornée.

Une augmentation de l'expression de CA2 et NELL2, une diminution de l'expression de FLG et LOR et une altération de la barrière sont observées dans les RHE traités aux IL-4 et IL-13 alors que ces altérations ne sont pas présentes, ou peu, après une inhibition des voies de signalisation par les inhibiteurs de JAK ou après l'édition du gène IL13RA1.

Puisque l'induction de l'expression de la sous-unité IL-2R γ a pu être confirmée dans les kératinocytes d'épidermes reconstruits, la fonction de celle-ci a été analysée par l'édition d'IL2RG, également présent sur le chromosome X. Les épidermes reconstruits à partir de kératinocytes IL2RG^{-/0} ont été exposés 48 heures aux IL-4 et IL-13, afin de reproduire les conditions qui induisent l'expression du récepteur de type I. Ces RHE reçoivent une stimulation supplémentaire aux IL-4 de 48 heures pour activer le dit récepteur. Ils sont comparés aux épidermes reconstruits à partir de kératinocytes IL2RG^{+/0}. Les résultats suggèrent qu'IL-2R γ joue un rôle dans la perte de l'efficacité de la barrière épidermique puisque celle-ci n'est pas altérée dans les RHE IL2RG^{-/0} après une stimulation aux ILs, contrairement à ce qu'on peut observer dans les RHE non édités. Par ailleurs, l'expression relative des transcrits codant pour IL-13R α 2 devient plus importante dans les épidermes édités que dans les non édités, ce qui suggère qu'IL-2R γ pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression d'IL-13R α 2. IL-13R α 2 est un récepteur antagoniste d'IL-13 même si des études ont démontré qu'il est également capable d'activer des voies de signalisation. Le rôle d'IL-13R α 2 dans les kératinocytes et la barrière épidermique doit être investiguer davantage (détail dans la discussion).

Publication en soumission

Keratinocytes activated by IL-4/IL-13 express IL-2R γ with consequences on epidermal barrier function

Audrey Progneaux¹, Céline Evrard¹, Valérie De Glas¹, Alix Fontaine¹, Céline Dotreppe¹, Evelyne De Vuyst¹, Arjen F. Nikkels², Vicente García-González³, Laure Dumoutier⁴, Catherine Lambert de Rouvroit¹, and Yves Poumay¹

¹Research Unit of Molecular Physiology (URPhyM), NAMur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, Namur, Belgium.

²Department of Dermatology, CHU of Sart Tilman, University of Liège, Liège, Belgium.

³Almirall S.A., Barcelona, Spain

⁴Experimental Medicine Unit, De Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

STATEMENT ON ETHICS

This study complies with all standard ethical requirements

KEYWORDS

Atopic Dermatitis, Barrier Function, Interleukins, Keratinocyte Biology, Signal Transduction

ABBREVIATION

AD, atopic dermatitis; CA2, carbonic anhydrase 2; FLG, filaggrin; IL, interleukin; JAK-STAT, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling; LCA, leukocyte common antigen; LOR, loricrin; NELL2, neural epidermal growth factor-like 2; RHE, reconstructed human epidermis; TEER, transepithelial electrical resistance.

ABSTRACT

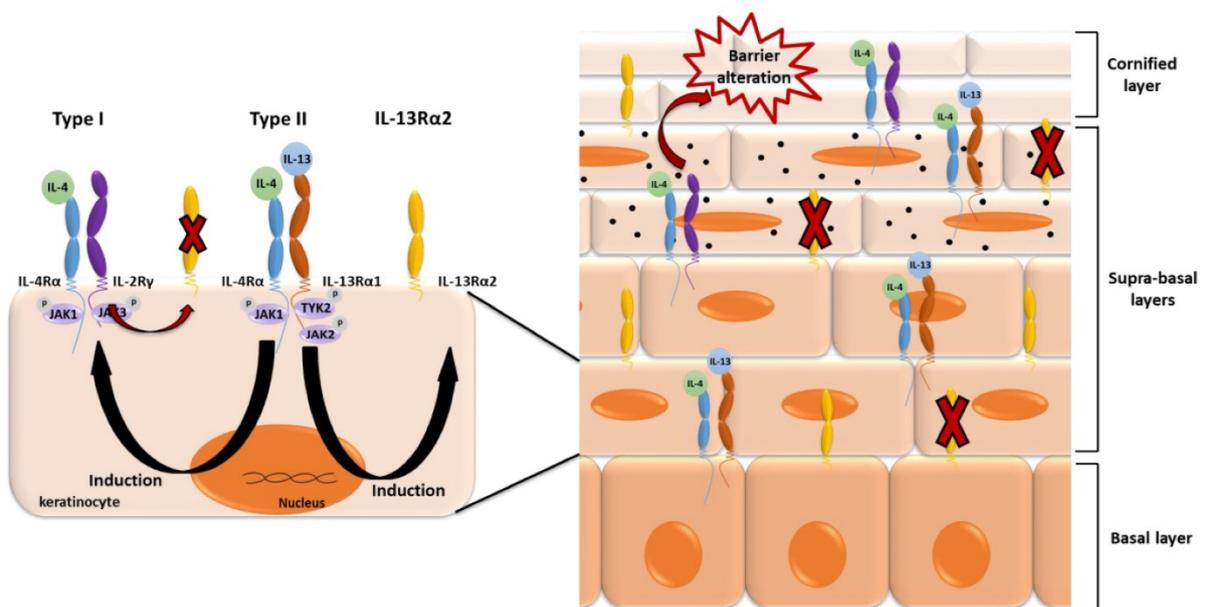
Background: Atopic dermatitis (AD) is a Th2-type inflammatory disease characterized by an alteration of epidermal barrier following the release of IL-4 and IL-13. These cytokines activate type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptors in the keratinocyte. While IL-2R γ , that form type I receptor of IL-4, is only expressed in hematopoietic cells, recent studies suggest its induction in keratinocytes, which questions about its role in these cells.

Objective: We study expression of IL-2R γ in keratinocytes and its role in alteration of keratinocyte function and epidermal barrier.

Methods: IL-2R γ expression in keratinocytes is studied using both reconstructed human epidermis (RHE) exposed to IL-4/IL-13 and AD skin. IL-2R γ induction by type II receptor is analyzed using JAK inhibitors and RHE knockout (KO) for IL13RA1. IL-2R γ function is investigated in RHE KO for IL2RG.

Results: In RHE, IL-4/IL-13 induce expression of IL-2R γ at the mRNA and protein levels. Its mRNA expression is also visualized in keratinocytes of lesional AD skin. IL-2R γ expression is low in RHE treated with JAK inhibitors and absent in RHE KO for IL13RA1. IL-4/IL-13 alter epidermal barrier, but this alteration is absent in RHE KO for IL2RG. A more important induction of IL-13R α 2 is reported in RHE KO for IL2RG than in not edited RHE.

Conclusion: These results demonstrate IL-2R γ induction in keratinocytes through activation of type II receptor. IL-2R γ is involved in the alteration of the epidermal barrier and in the regulation of IL-13R α 2 expression. Observation of IL-2R γ expression by keratinocytes inside AD lesional skin suggests a role for this subunit receptor in the disease.



INTRODUCTION

Atopic dermatitis (AD) is a common inflammatory skin disease that affects the epidermal barrier through dysregulation of the cutaneous immune response. Th2 immune response results in the production and local release of cytokines and causes of further epidermal barrier alterations. Interleukin (IL)-4 and IL-13 released in AD skin bind to receptors on keratinocytes, impeding the correct efficiency and maintenance of the barrier (1-5).

On keratinocytes, IL-4 and IL-13 bind to type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor, activating the JAK/STAT, MAPK and PI3K/AKT pathways (5-8). It is assumed that type I IL-2R γ /IL-4R α receptor, which only binds IL-4, is solely expressed by hematopoietic cells. The IL-13R α 2 subunit, binding IL-13 only but with higher affinity, is considered as decoy receptor, competing with IL-4R α /IL-13R α 1 receptor to bond IL-13 (5, 9-12).

Targeted therapies of AD include blocking antibodies directed against receptors or their ligands, or small molecules blocking downstream signaling pathways such as JAK inhibitors. Recently, treatment of moderate-to-severe AD relies on dupilumab, targeting IL-4R α , but therapies targeting IL-13 are also efficient, preventing binding to both IL-13R α 1 and IL-13R α 2 by tralokinumab or the dimerization between IL-4R α and IL-13R α 1 by lebrikizumab. The protection of epidermal barrier with these strategies is a strong indication that they interfere with IL-4 and IL-13 receptors and downstream signaling in keratinocytes. Heterogeneity of AD, in terms of clinical presentation and responses to therapies, highlights the need for further investigation of the pathological mechanisms that involve IL-4 and IL-13 receptors in keratinocytes (13-18).

In vitro, keratinocytes are seeded on a polycarbonate filter and positioned at air-liquid interface to reconstruct an human epidermis (RHE) (19). RHE exposed to IL-4 and IL-13 acquire some histological characteristics of AD, such as hypogranulosis, spongiosis and increased barrier permeability. Simultaneously, exposure of RHE to IL-4 and IL-13 dysregulates gene expression in keratinocytes, as observed in AD skin. For instance, expression of carbonic anhydrase II (CA2) and neural epidermal growth factor-like 2 (NEL2) becomes elevated, whilst loricrin (LOR) and filaggrin (FLG) expression is reduced (20-22).

Since the RHE model lacks immune cells, it allows to dissect roles of cytokine receptor pathways in keratinocytes. Analysis of gene expression in RHE exposed to Th2 cytokines revealed significant upregulation of IL-2R γ mRNA (23), suggesting potential involvement of IL-2R γ subunit receptor in AD keratinocytes.

Here we further characterize the induction of IL-2R γ expression in RHE exposed to IL-4 and IL-13 and illustrate the presence in AD of IL-2R γ mRNA in epidermal keratinocytes.

Using JAK inhibitors and gene inactivation in RHE models, we report IL-2R γ induction through activation of IL-4R α /IL-13R α 1 receptor. Furthermore, we highlight the role of IL-2R γ subunit receptor in keratinocytes, responsible for barrier alterations in response to Th2 cytokines.

METHODS

Origin of cells and tissues, culture of epidermal keratinocytes, and treatments

Skin biopsies (University Hospital in Liège, Belgium) from patients with AD were collected and stored at -70°C in OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, California, USA). Healthy skin biopsies and normal keratinocytes were isolated from abdominoplasties (Clinique St Luc, Namur, Belgium) as described (24). All samples were obtained after written informed consent. Studies were approved by local Ethical Committees, in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. HEKa normal adult human keratinocytes were purchased from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). Immortalized N/TERT keratinocytes came from J.G. Rheinwald's laboratory (25). Cells authenticity was assessed at ATCC (Manassas, VA) (<http://www.atcc.org>) by comparison of an original frozen vial of cells (26) with current cultured N/TERT cells. Keratinocytes were cultured to confluence in Epilife medium (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with HKGS (Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA), penicillin 50 U/ml and streptomycin 50 μ g/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) or used to reconstruct human epidermis on polycarbonate filters during 11 days as described (19, 27). Keratinocytes or RHE were incubated with IL-4 (50 ng/ml) and IL-13 (50 ng/ml) (PreproTech, New Jersey, USA) for timings mentioned in the Results section. To mimic differentiation keratinocyte monolayers were cultured in medium with a 1.5 mM calcium ion concentration. RHE were pretreated overnight with JAK inhibitors tofacitinib (1 μ M), upadacitinib (0.2 μ M), ruxolitinib (1 μ M) and deucravacitinib (1 μ M) (Almirall, Barcelona, Spain).

CRISPR-Cas9 inactivation of IL13RA1 or IL2RG in keratinocytes

IL13RA1 (cytogenetic location Xq24) and IL2RG genes (cytogenetic location Xq13.1) were each inactivated in immortalized N/TERT keratinocytes using the CRISPR-Cas9 method as described (28). Oligonucleotide sequences and primers are respectively listed in **Supplementary table 1 and 2**

Supplementary Table 1 : sgRNA used for gene editing by CRISPR-Cas9			
IDT	crRNA	PAM	Strand
IL13RA1 ex2	ATGGACATGGAATCCACCCG	AGG	Forward
IL13RA1 ex2	CCATAGACTACAATTTGAGC	TGG	Reverse
IL13RA1 ex11	CATCTATGAGAAGCAAACCA	AGG	Forward
IL13RA1 ex11	TTCTATCAGCACTACAGAGT	CGG	Reverse
IL2RG ex2	TCGAGTACATGAATTGCACT	TGG	Forward
IL2RG ex2	TAATGCAGAGTGAGGTTGGT	AGG	Reverse
IL2RG ex8	GTCAGTGAGATTCCCCAAA	AGG	Forward
IL2RG ex8	TCCCTTAGACACACCACTCC	AGG	Reverse

Supplementary Table 2 : Primers used for amplification and sequencing of genomic DNA		
Eurogentec	Sequence	Strand
IL13RA1 exon2	ACTCAGCCACCTGTGACAAA	Forward
IL13RA1 exon11	TCTTCTCCAAAGCGCCATT	Reverse
IL2RG exon2	TATGCCCACTGACTCCCTCA	Forward
IL2RG exon8	GAGTATGAGACGCAGGTGGG	Reverse

Clones exhibiting a deletion in IL13RA1 were screened for large genomic deletions spanning exons 2 to 11 by PCR. The mutations were characterized by Sanger sequencing of PCR products through Mix2Seq Kit (Eurofins, Gembloux, Belgium). Clones IL13RA1^{UNΔ1/0} and IL13RA1^{UNΔ2/0} were identified with such deletions, characterized at the nucleotide level by sequencing PCR products, and respectively named clones IL13RA1^{-/0}(a) and IL13RA1^{-/0}(b) (Supplementary Figure S1).

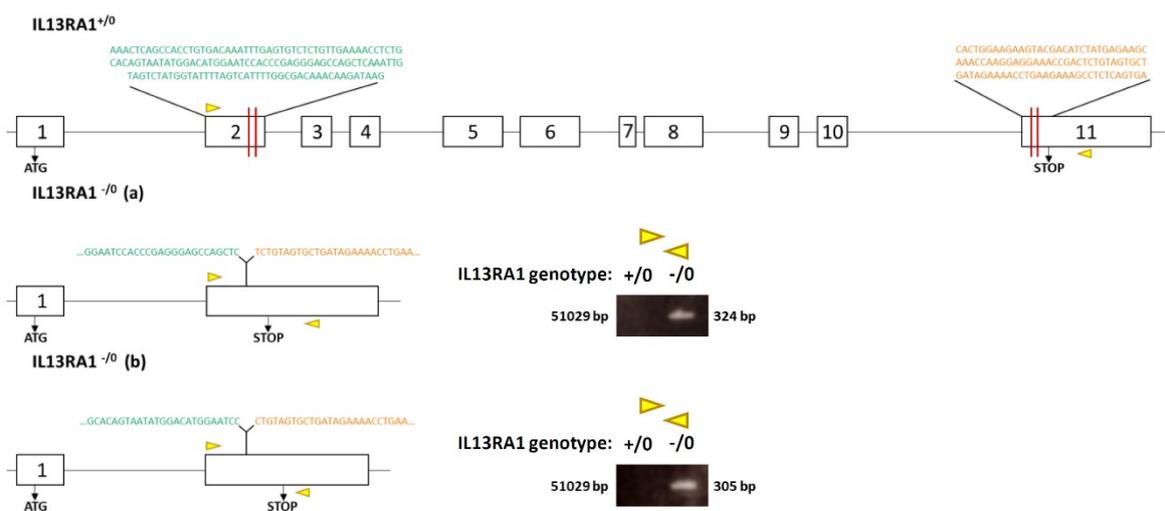


Figure S1: Deletions of IL13RA1 gene using Crispr/Cas9 method in N/TERT keratinocytes. IL13RA1 gene representation. Red bars represent sites targeted by crRNA. Yellow arrowheads represent primers used for PCR and sequencing.

Considering +1 as the genomic position corresponding to A in the AUG initiation codon, allele UN Δ 1 carries a deletion encompassing nucleotides +13470 to +64174, with a short open reading frame coding for 62 amino acid residues of IL-13R α 1 protein instead of the complete 428 residues sequence. Allele UN Δ 2 exhibits a deletion of nucleotides from +13452 to +64175, encoding 98 amino acid residues only.

Clones exhibiting a deletion in IL2RG were screened for large genomic deletions spanning exons 2 to 8 by PCR. Edition of DNA was characterized by sequencing, and three clones IL2RG^{UN Δ 1/0}, IL2RG^{UN Δ 2/0}, and IL2RG^{UN Δ 3/0} were determined and named IL2RG^{-/0}(a), IL2RG^{-/0}(b) and IL2RG^{-/0}(c) (**Supplementary Figure S2**).

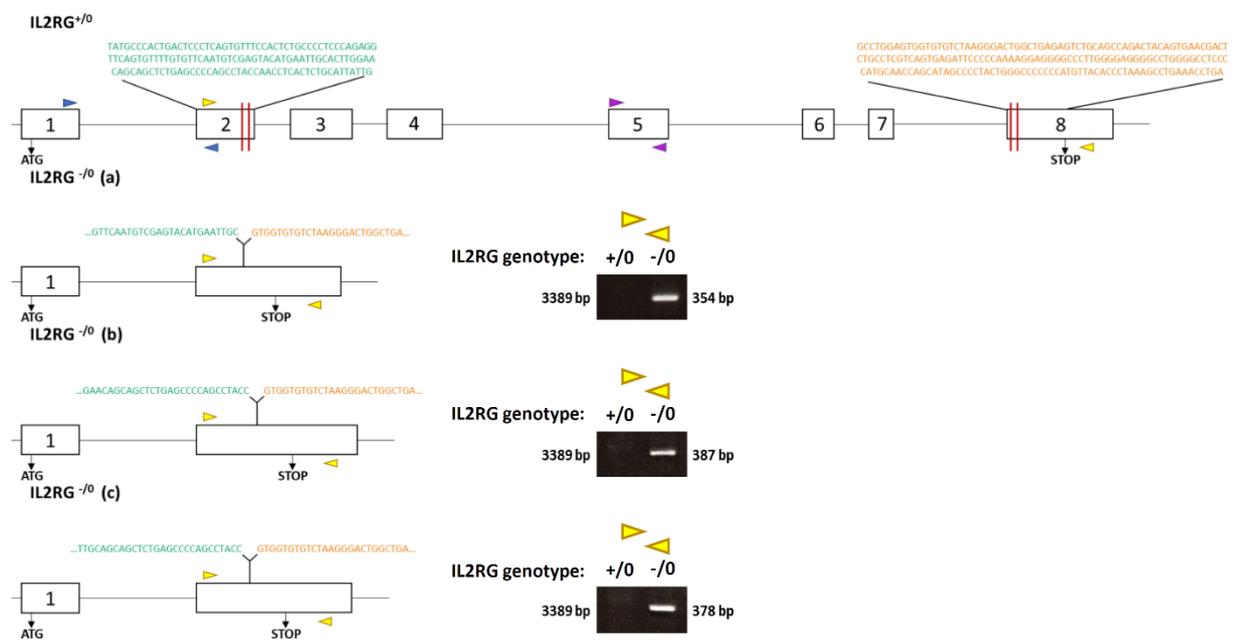


Figure S2: Deletions of IL2RG gene using Crispr/Cas9 method in N/TERT keratinocytes.

IL2RG gene representation. Red bars represent sites targeted by crRNA. Yellow arrowheads represent primers used for PCR and sequencing. Blue and purple arrowheads represent primers used for RT-qPCR.

Considering +1 as the genomic position that corresponds to A in AUG initiation codon, allele UN Δ 1 is IL2RG with a deletion between +591 and +3625 with a short open reading frame consisting of 127 amino acid residues of IL-2R γ protein instead of the normal 370 amino acid sequence. Allele UN Δ 2 exhibits a deletion between +624 and +3625 and encodes 138 amino acid residues, whereas UN Δ 3 carries two deletions, one between +592 and +600, and the other between +624 and +3625, coding for a 135 amino acid sequence.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SD and graphs are performed using GraphPad Prism 5 software. Statistics are calculated using software “SigmaPlot 14.0” using one-way ANOVA repeated measures. Values statistically significant are labelled */# where $P < 0.05$, **/## where $P < 0.005$, and ***/### where $P < 0.001$.

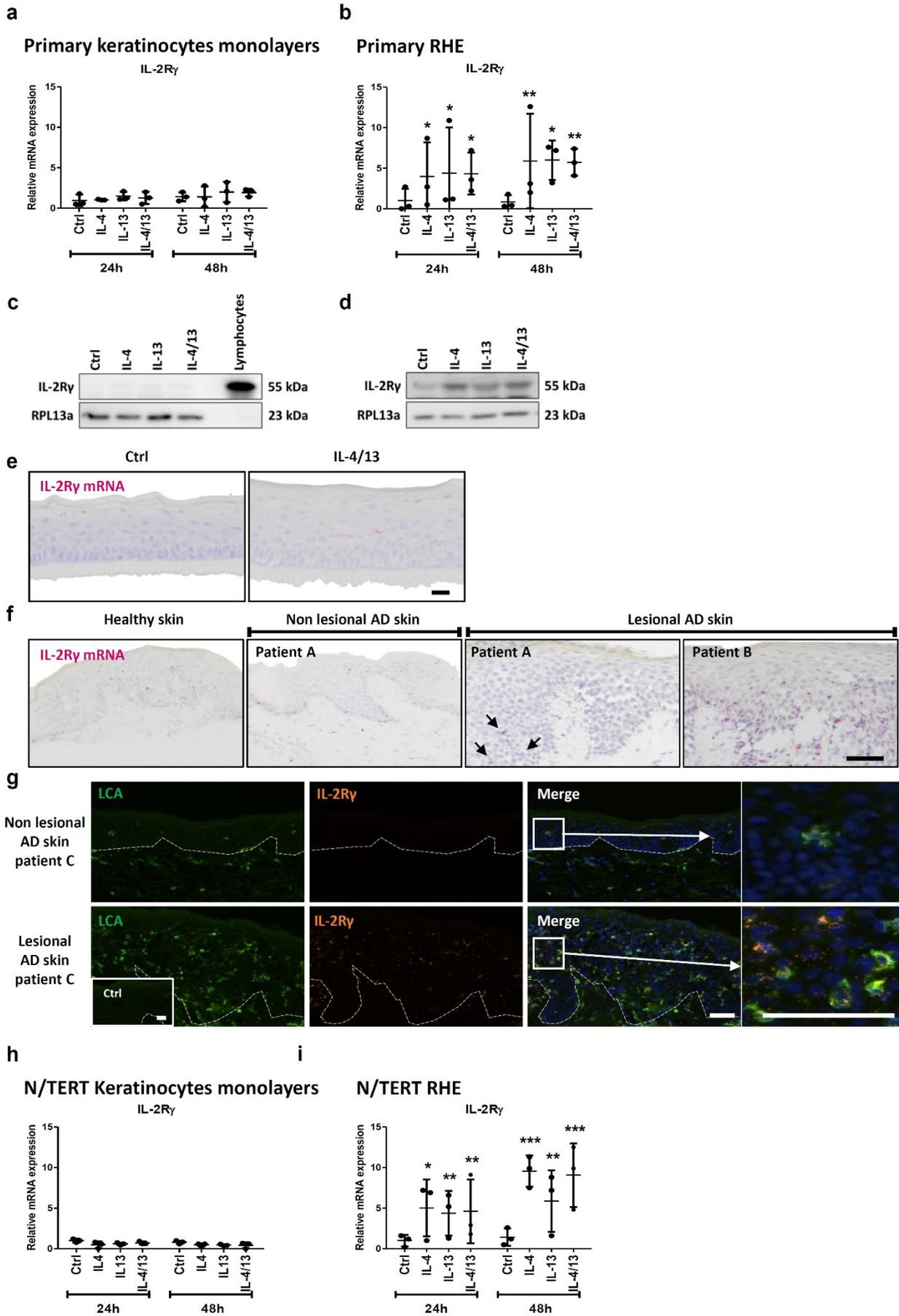
RESULTS

Expression of the IL-2R γ receptor subunit is upregulated in vitro in RHE exposed to IL-4 and/or IL-13 and in vivo in AD lesional epidermis

Expression of the IL-2R γ receptor subunit is almost undetected in normal keratinocytes cultured as monolayers or in RHE. However, some slight but significant induction of IL-2R γ expression occurs in RHE only, in response to exposure to IL-4 and/or IL-13 (**Figure 1a-d**).

Figure 1: IL-2R γ is expressed in some keratinocytes of living layers of RHE challenged by IL-4 and IL-13 and in lesional AD epidermis.

(**a-e, h-i**) keratinocytes monolayers (**a, c, h**) and RHE (**b, d, e, i**) using primary (**a-e**) or N/TERT (**h-i**) keratinocytes were exposed to IL-4 and/or IL-13 (50 ng/ml) for 24 (**a-b, e, h-i**) and 48 hours (**a-d, h-i**). (**a-b, h-i**) Level of IL-2R γ mRNA was assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to Ctrl 24h (mean \pm SD, $n=3$, one-way ANOVA, * indicates statistical significance of measurement compared with Ctrl, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$). (**c-d**) Level of IL-2R γ protein was assessed through Western blotting. Lymphocytes are used as positive control. RPL13a was used as loading control ($n=2$ (**c**); $n=3$ (**d**)). (**e-f**) IL-2R γ mRNA was localized through in situ hybridization and hemalun counterstaining in RHE embedded in paraffin (**e**) and in healthy or AD skin frozen in OCT (**f**). (**g**) IL-2R γ mRNA was localized through fluorescent in situ hybridization (orange) in AD skin. LCA was labeled by immunofluorescence (green) and nuclei stained using RNAscope Multiplex FL V2 DAPI (323108) (blue). Insert shows control without primary antibody. Dashed lines represent limit between epidermis and dermis. Bars = 20 μ m (**e**) or 50 μ m (**f-g**). Ctrl, control; IL, interleukins; AD, atopic dermatitis; LCA, Leukocyte Common Antigen; RHE, reconstructed human epidermis.



In consequence, IL-4R α /IL-2R γ receptor for IL-4 could organize and possibly function in epidermal keratinocytes challenged by Th2 interleukins. Since expression of IL-2R γ remains absent from keratinocyte monolayers expressing early but not late differentiation markers (24, 29), data suggest that expression of IL-2R γ might essentially occur in keratinocytes undergoing late differentiation. Induction of IL-2R γ expression is investigated in keratinocyte monolayers cultured in 1.5 mM calcium ion concentration to initiate differentiation as characterized by increased expression of markers like keratin 10, filaggrin and loricrin (**Supplementary Figure S3a**). IL-2R γ expression cannot be induced in differentiated keratinocytes by incubation with IL-4 and IL-13, whilst in epidermis reconstructed with same cells, exposure to IL-4 and IL-13 increases expression of IL-2R γ (**Supplementary Figure S3b**), strengthening data presented in **Figure 1**. These results confirm the requirement for reconstructing the epidermis to observe IL-2R γ expression.

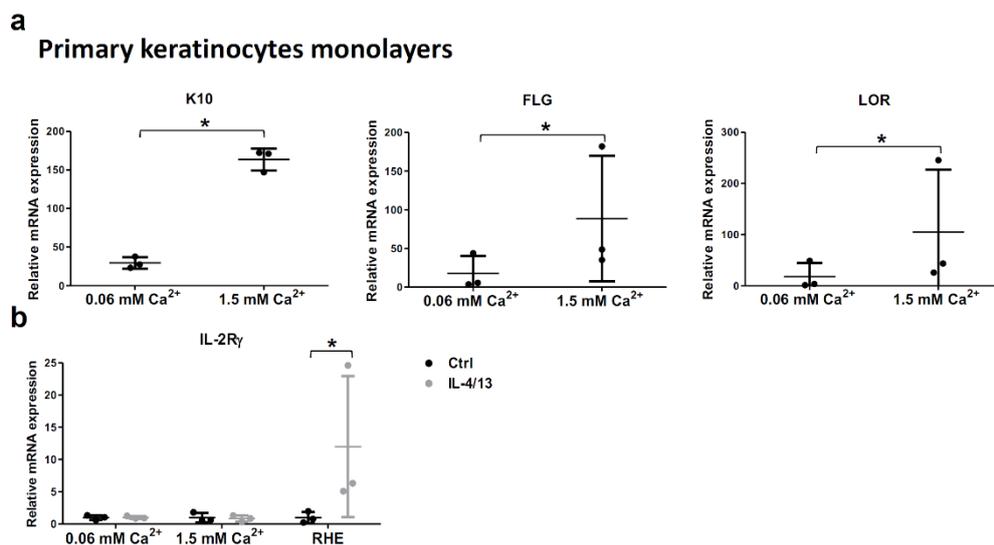


Figure S3: Unlike RHE, differentiated keratinocytes fail to induce IL-2R γ expression.

(a) keratinocytes are cultured in medium with a concentration of calcium ion (Ca²⁺) at 0.06 mM or 1.5 mM. (b) keratinocytes cultured in medium with a concentration of calcium ion (Ca²⁺) at 0.06 mM or 1.5 mM and RHE were exposed to IL-4 and IL-13 for 48 hours. (a-b) Levels of K10, FLG, LOR (a) and IL-2R γ (b) mRNA were assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to “0.06 mM Ca²⁺” (a) and “Ctrl” (mean \pm SD, n=3, one-way ANOVA, * indicates statistical significance of measurement *P<0.05).

Localization of IL-2R γ mRNA expression was investigated using *in situ* hybridization in RHE sections and found in living cell layers of RHE exposed to IL-4 and IL-13 (**Figure 1e**). In AD skin, IL-2R γ mRNA signal in epidermis is elevated in lesional areas, whilst scarcely observed in non-lesional areas and healthy skin (**Figure 1f**). To discriminate between immune cells and keratinocytes to localize IL-2R γ expression, leukocyte common antigen (LCA) was labeled by immunofluorescence (**Figure 1g**). Although double-positive cells for LCA and IL-

2R γ -encoding mRNA are observed in lesional AD skin, the observation of cells solely labeled for IL-2R γ -encoding mRNA strongly suggests that IL-2R γ expression happens in keratinocytes.

Enhanced IL-2R γ expression in RHE results from activation by IL-4 and IL-13 of type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor and downstream signaling.

IL-4R α /IL-13R α 1 receptor being the only receptor for IL-4 and IL-13 expressed in keratinocytes in healthy skin (30), downstream signaling was probed in RHE after 15 min exposure to both ligands. As expected, enhanced STAT3 and STAT6 phosphorylation is observed in such conditions. STAT6 activation is inhibited by JAK inhibitors, strongly by tofacitinib, upadacitinib, or ruxolitinib, and partly by deucravacitinib. STAT3 activation is inhibited by the four inhibitors (**Figure 2a**).

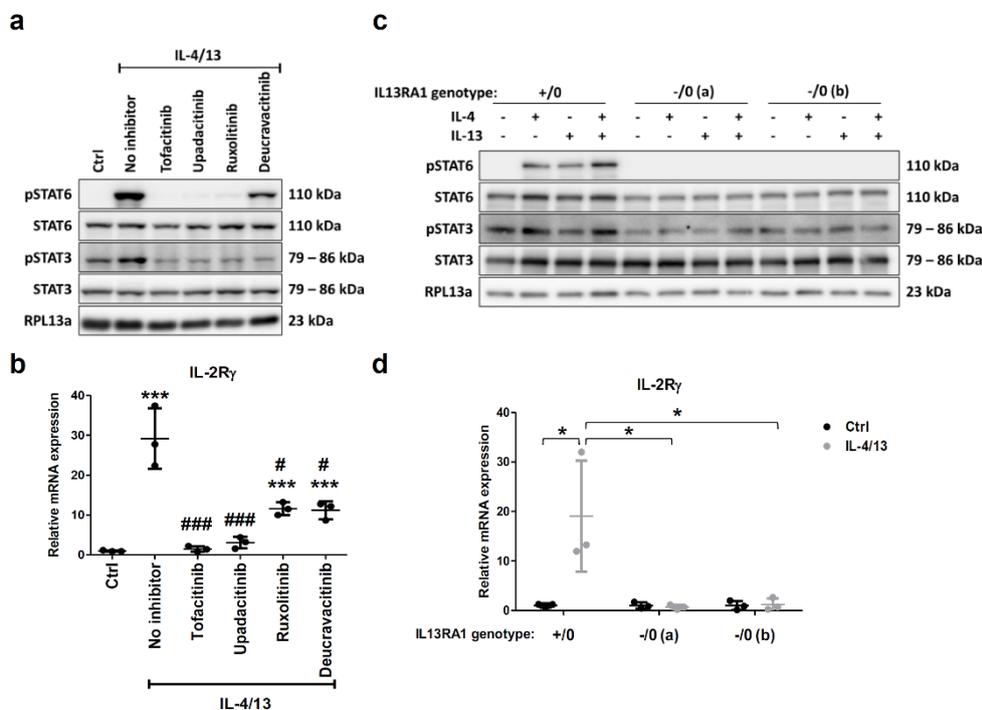


Figure 2: The IL-2R γ expression triggered by IL-4 and IL-13 is suppressed by JAK inhibitors or by deletion of IL13RA1 gene.

(a-b) RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 15 minutes (a) or 48 hours (b) after an overnight treatment, or not, with 1 μ M tofacitinib, 0.2 μ M upadacitinib, 1 μ M ruxolitinib or 1 μ M deucravacitinib. (c-d) IL13RA1^{+/0} and IL13RA1^{-/0} RHE were exposed to IL-4 and/or IL-13 (50 ng/ml) for 15 minutes (c) and 48 hours (d). (a-c) Total and phosphorylated forms of STAT6 and STAT3 were analyzed through Western blotting. RPL13a was used as loading control. Images are representatives of three independent experiments. (b-d) Levels of IL-2R γ mRNA were assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to Ctrl (mean \pm SD, n=3, one-way ANOVA, * and # indicate statistical significance of measurement compared with Ctrl and No inhibitor (b)). * indicates statistical significance of measurement (c), */#P<0.05, ***/###P<0.001). Ctrl, control; IL, interleukins; pSTAT, phosphorylated signal transducers and activators of transcription; RHE, reconstructed human epidermis.

Interestingly, all of them significantly prevent the expression of IL-2R γ induced by 48 h exposure to IL-4 and IL-13, indicating role of IL-4R α /IL-13R α 1 receptor and JAK signaling in this induction (**Figure 2b**). While tofacitinib and upadacitinib are found more potent than ruxolitinib and deucravacitinib at preventing the induction of IL-2R γ expression, the efficiency of all inhibitors was verified through analysis of AD markers. Tofacitinib and upadacitinib decrease the mRNA expression of CA2 and NELL2 whilst ruxolitinib solely alters CA2 expression. All JAK inhibitors prevent decreased expression of FLG and LOR usually observed in RHE exposed to IL-4 and IL-13 (**Supplementary Figure S4**).

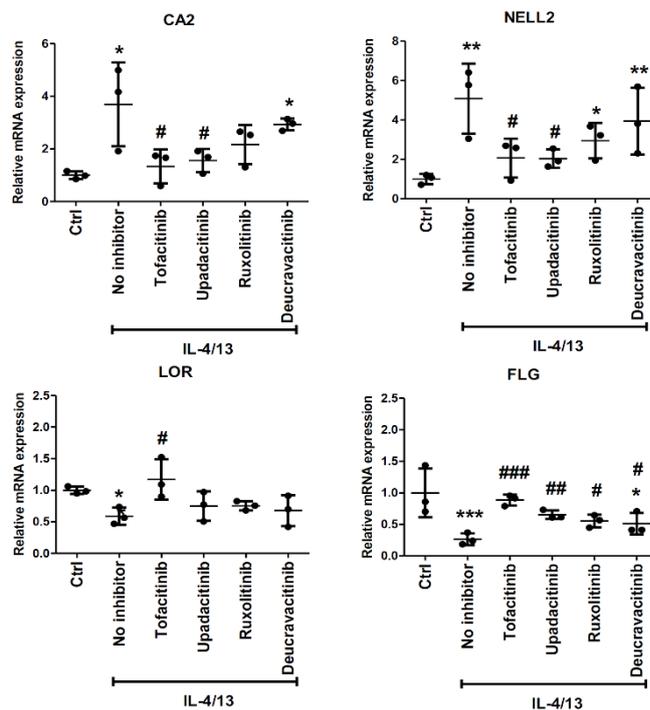


Figure S4: AD marker alteration is inhibited by JAK inhibitors targeting IL-4 and IL-13 signaling pathways.

RHE were exposed to IL-4 and IL-13 for 48 hours after an overnight treatment, or not, with 1 μ M tofacitinib, 0.2 μ M upadacitinib, 1 μ M ruxolitinib or 1 μ M deucravacitinib. Levels of CA2, NELL2, LOR and FLG mRNA were assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to Ctrl (mean \pm SD, n=3, one-way ANOVA, * and # indicate statistical significance of measurement compared with Ctrl and No inhibitor, respectively, */#P<0.05, **/##P<0.005, ***/###P<0.001). Ctrl, control; IL, interleukins; CA2, carbonic anhydrase II; NELL2, Neural EGFL Like 2; LOR, loricrin; FLG, filaggrin; RHE, reconstructed human epidermis.

The role played by IL-4R α /IL-13R α 1 receptor activation in the phenotype alteration of keratinocytes exposed to IL-4 and IL-13 was confirmed by rendering keratinocytes deficient for the IL-13R α 1 receptor subunit. For this purpose, we chose the N/TERT keratinocyte cell line which allows tissue reconstruction (25). Except morphological alterations such as spongiosis and hypogranulosis (**Supplementary Figure S5a**), responses to incubation with IL-4 and IL-13 of RHE made of N/TERT keratinocytes are very similar to those observed with

RHE made of primary keratinocytes (22). Indeed, RHE produced by N/TERT keratinocytes exhibit increased expression of CA2 and NELL2 and decreased expression of LOR and FLG when exposed to IL-4 and IL-13 (Supplementary Figure S5b).

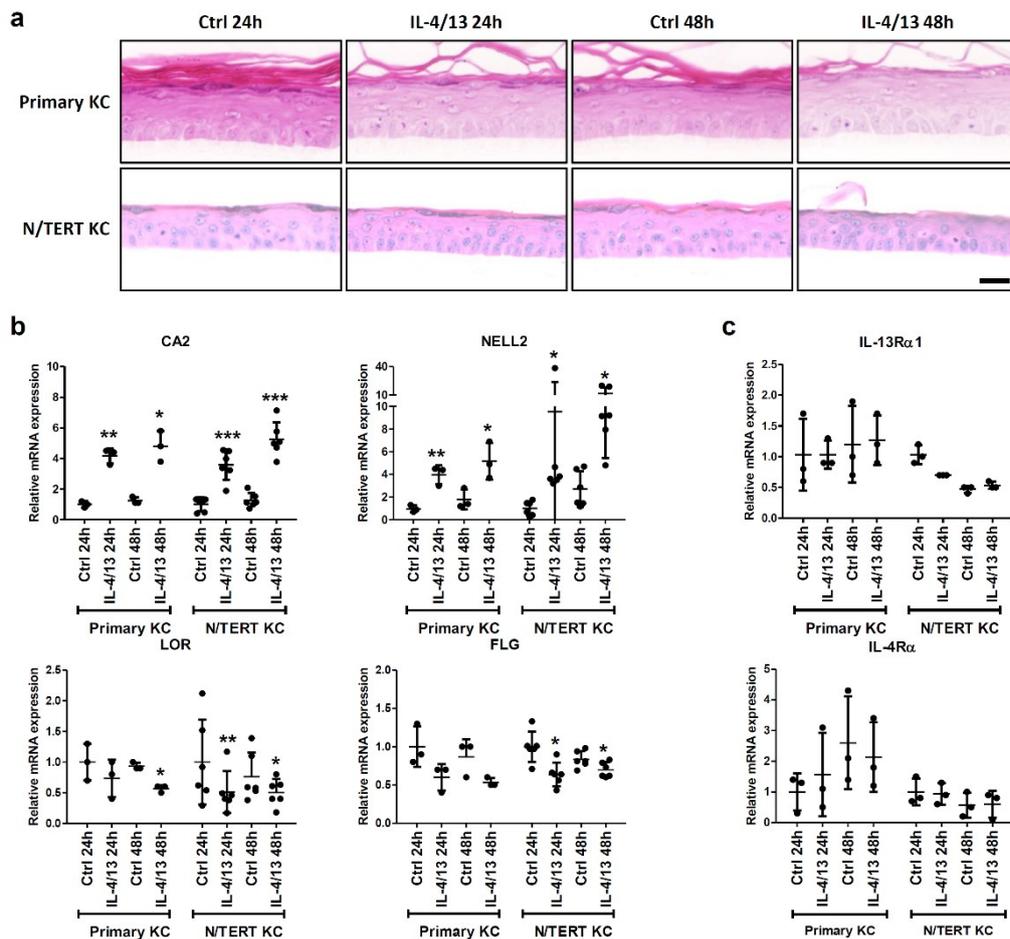


Figure S5: Epidermis reconstructed with immortalized N/TERT keratinocytes respond in a similar way to IL-4 and IL-13 as epidermis reconstructed with primary keratinocytes. RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 24 and 48 hours. (a) RHE were analyzed through Hemalun and Eosin staining. (b-c) Levels of CA2, NELL2, LOR and FLG mRNA (a) and IL-13Rα1 and IL-4Rα mRNA (c) were assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to Ctrl 24h (mean ±SD, n=3, one-way ANOVA, * indicates statistical significance of measurement compared with Ctrl, *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001). Ctrl, control; IL, interleukins; KC, keratinocytes; CA2, carbonic anhydrase II; NELL2, Neural EGFL Like 2; LOR, loricrin; FLG, filaggrin; RHE, reconstructed human epidermis.

They further exhibit enhanced expression of IL-2Rγ in RHE exposed to both interleukins, whereas this expression remains unaltered in monolayers (Figure 1h-i). To note, expression of IL-13Rα1 and IL-4Rα is never altered after exposure to IL-4 and IL-13 in RHE, produced with either primary keratinocytes or the N/TERT cell line (Supplementary Figure S5c). Immortalized N/TERT keratinocytes allow easier clonal selection of DNA-edited cells. The male genotype of N/TERT cells also facilitates inactivation of the IL13RA1 gene located on chromosome X. This was performed using CRISPR/Cas9 as we previously described (28).

When IL13RA1⁻⁰ RHE are incubated for 15 min with IL-4 and IL-13, either individually or combined, no activation of STAT6 or upregulation of STAT3 phosphorylation is observed, as opposed to RHE prepared with IL13RA1⁺⁰ N/TERT cells (**Figure 2c**). After 48 h of exposure to IL-4 and IL-13, no increase in IL-2R γ mRNA is detected in both IL13RA1⁻⁰ RHE, unlike in IL13RA1⁺⁰ RHE where upregulated IL-2R γ expression results from such treatment (**Figure 2d**).

In IL13RA1⁻⁰ RHE, the expression of CA2 and NELL2 is no longer triggered after exposure to IL-4 and IL-13, and FLG or LOR expression is unaltered (**Supplementary Figure S56b**). Barrier efficiency assessed by TEER measurement, whereas reduced in IL13RA1⁺⁰ RHE upon exposure to IL-4 and IL-13, is no more affected in IL13RA1⁻⁰ RHE (**Supplementary Figure S6c**). The efficiency of tight junctions in RHE was analyzed by testing the upward permeability to biotin. An efficient barrier is characterized by biotin migration up to keratinocytes in the granular layer, whereas an altered one allows biotin leakage into the cornified layer as described in previous studies (31, 32). In IL13RA1⁺⁰ RHE exposed to IL-4 and IL-13, biotin reaches the cornified layer, confirming barrier alterations. Conversely, IL13RA1⁻⁰ RHE do not exhibit increased permeability to biotin in those conditions (**Supplementary Figure S6d**).

Altogether, these data indicate crucial roles for type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor in keratinocytes exposed to IL-4 and IL-13, especially in terms of barrier properties and expression of AD markers, but they further reveal concomitant triggered expression of IL-2R γ receptor subunit.

Expression of the IL-2R γ receptor subunit contributes to barrier alterations in RHE exposed to IL-4 and IL-13.

As it happens that both IL-2R γ and IL-4R α can be expressed in keratinocytes of RHE, the two subunit receptors likely dimerize to form type I receptor in the presence of IL-4. It is known that IL-2R γ is a common subunit receptor of IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, and IL-21 (12). Therefore, we analyzed mRNA expression of the different subunits of these co-receptors in our model by RTqPCR, using primers with confirmed efficiency through mRNA analysis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Beside the increased expression of IL-2R γ by IL-4 and IL-13, solely some expression of IL-15R α is observed in reconstructed epidermis, and this expression increases when RHE are exposed 48 h to IL-4 and IL-13 (**Figure 3a**).

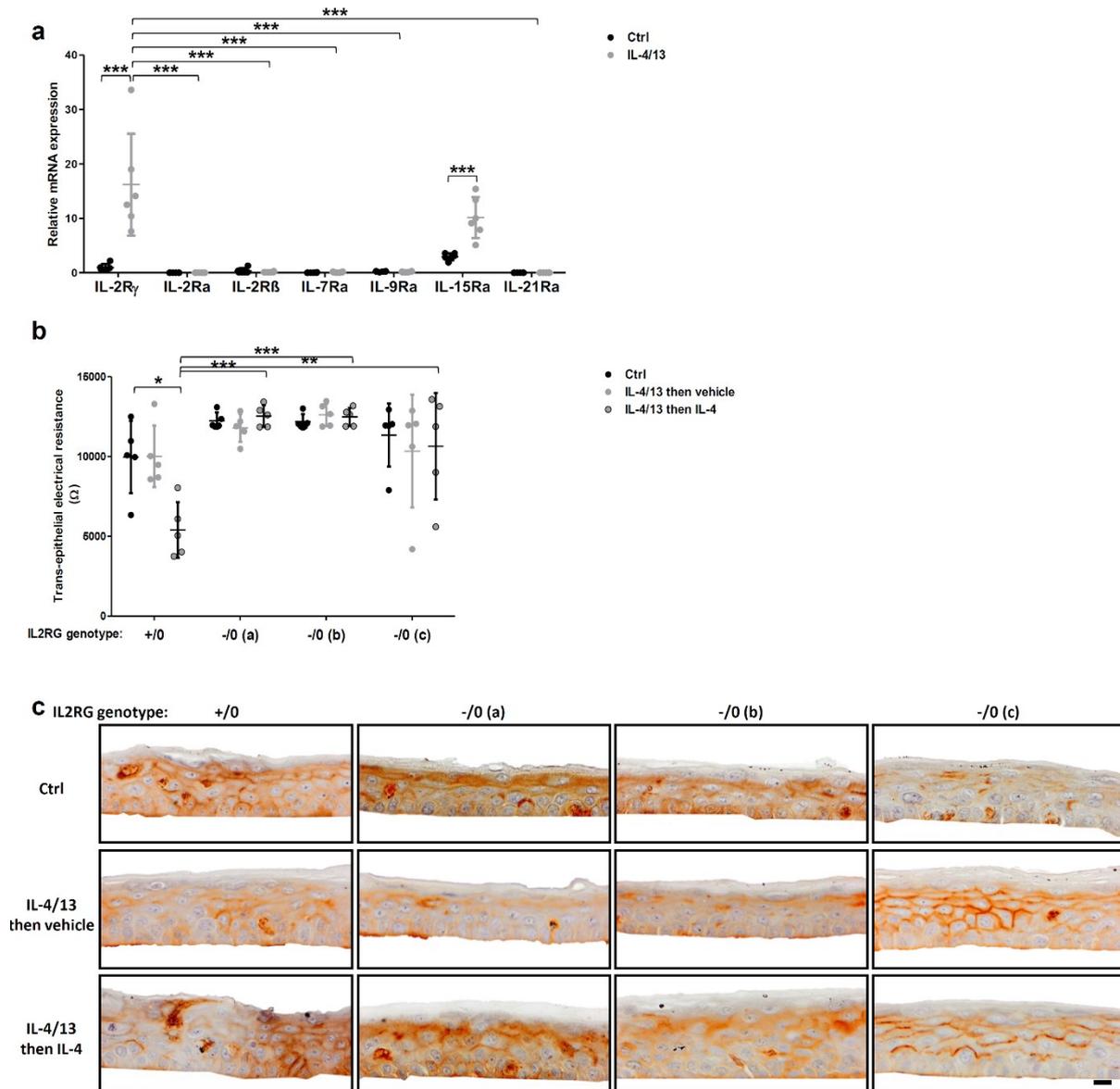


Figure 3: Inactivation of IL2RG gene prevents epidermal barrier alterations by IL-4 and IL-13.

(a) RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 48 hours (b-c) IL2RG^{+/-0} and IL2RG^{-/-0} RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 48 hours and then were exposed to IL-4 (50ng/ml) or vehicle for 48 hours. (a) Levels of IL-2R γ , IL-2R α , IL-2R β , IL-7R α , IL-9R α , IL-15R α and IL-21R α mRNA were assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to Ctrl (mean \pm SD, n=3, one-way ANOVA, * indicates statistical significance of measurement, ***P<0.001). (b) Barrier permeability was analyzed through trans-epithelial electrical resistance (mean \pm SD, n=3, one-way ANOVA, * indicates statistical significance of measurement, *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001). (c) Barrier permeability was analyzed through permeability to biotin. RHE were fixed through acetic formol and embedded in paraffin after 30 minutes incubation with biotin. Biotin was recognized by streptavidin-HRP (1/200) and slides are counter-stained by hemalun. Images are representatives of two independent experiments. Ctrl, control; IL, interleukins; RHE, reconstructed human epidermis.

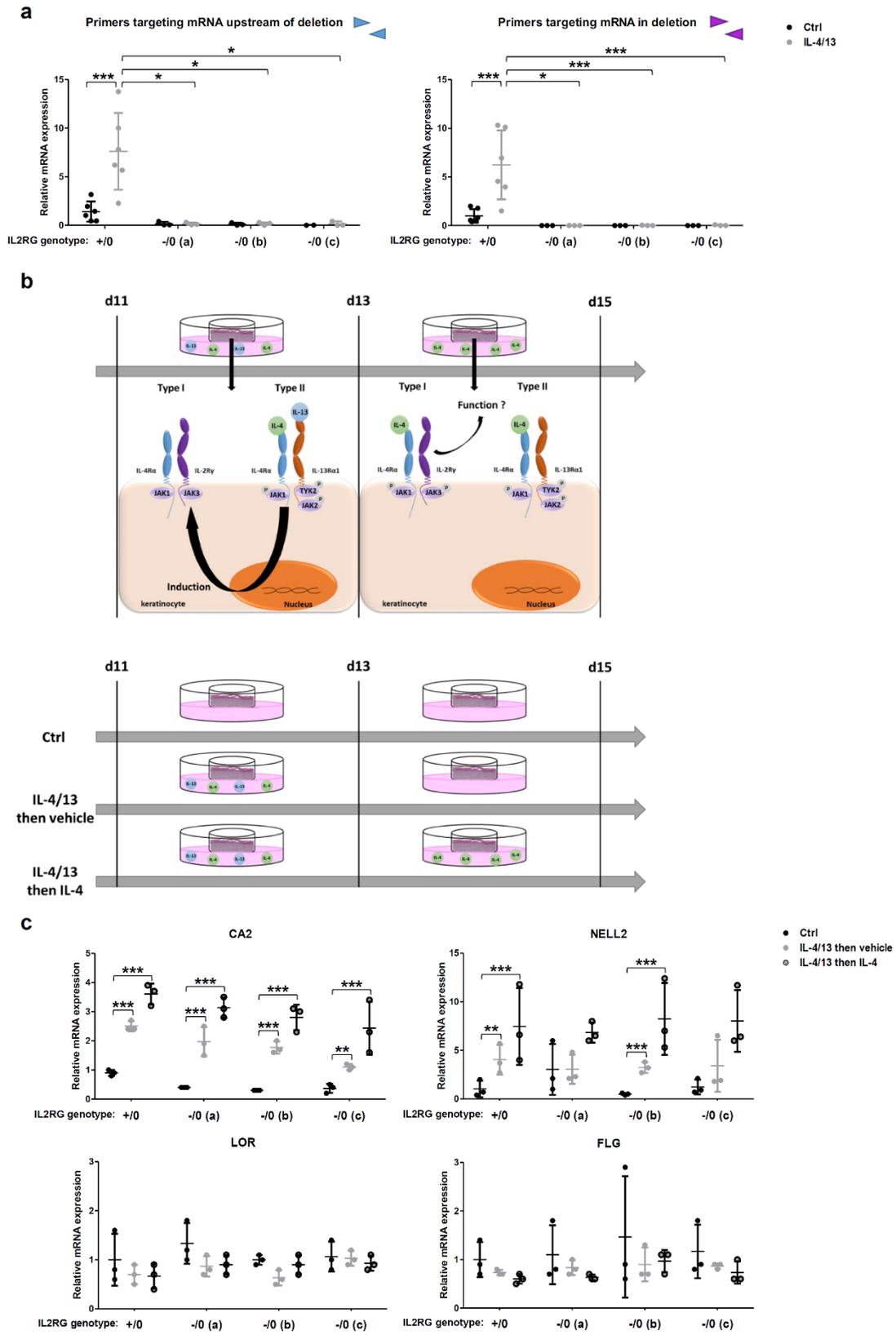
IL-15R α binds and presents IL-15 to the dimer IL-2R γ /IL-2R β to activate signaling pathways through activation of IL-2R γ /IL-2R β (33). However, although IL-15R α is expressed in keratinocytes, this subunit receptor cannot dimerize with IL-2R γ because IL-2R β and IL-15

are absent. In consequence, these data suggest that the expression of the IL-2R γ subunit in keratinocytes solely allows association with IL-4R α to form type I receptor for IL-4 binding.

Since IL-2R γ subunit is expressed in keratinocytes, we again used the CRISPR/Cas9 technology and N/TERT keratinocytes to study functionality of this subunit receptor and three different knock-out clones, IL2RG^{-/0}(a), IL2RG^{-/0}(b) and IL2RG^{-/0}(c), were identified. Transcripts encoding IL-2R γ were analyzed by RT-qPCR with two primer pairs, one targeting IL-2R γ mRNA in exon 5, and the other pair targeting in exon 1 and 2, upstream of the deletion. Both primer pairs illustrate increased expression in IL2RG^{+/0} RHE after exposure to IL-4 and IL-13. Conversely, this expression remains undetected in IL2RG^{-/0} RHE, proving inactivation of IL2RG gene (**Supplementary Figure S7a**).

Figure S7: Expression of AD markers is similar in IL2RG^{-/0} and IL2RG^{+/0} RHE.

(a) RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 48 hours. (b-c) RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 48 hours and then were exposed to IL-4 (50ng/ml) or vehicle for 48 hours. (a, c) Levels of IL-2R γ (a), CA2, NELL2, LOR and FLG (c) mRNA were assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to IL2RG^{+/0} Ctrl (mean \pm SD, n=3, one-way ANOVA, * indicates statistical significance of measurement, *P<0.05, ** P<0.005, ***P<0.001). (b) Schematic representation of treatment for IL2RG^{-/0} and IL2RG^{+/0} RHE. Ctrl, control; IL, interleukins; d, day; CA2, carbonic anhydrase II; NELL2, Neural EGFL Like 2; LOR, loricrin; FLG, filaggrin; RHE, reconstructed human epidermis.



To initially create conditions that trigger expression of IL-2R γ , IL2RG^{+/-0} RHE and IL2RG^{-/0} RHE are first exposed to IL-4 and IL-13 for 48 h. They are then incubated or not with IL-4 alone, for additional 48 h to activate the eventually newly formed IL-4R α /IL-2R γ receptor, while keeping IL-4R α /IL-13R α 1 receptor activated (**Supplementary Figure S7b**). The relative mRNA expression of CA2, and of NELL2, is upregulated in both IL2RG^{+/-0} and IL2RG^{-/0} RHE exposed to ILs. No alteration of LOR and FLG mRNA expression is observed in any condition (**Supplementary Figure S7c**). These data suggest that expression of IL-2R γ in RHE has limited consequences on gene expression.

As shown by TEER measurement and biotin permeability assays, IL2RG^{+/-0} RHE exposed to IL-4 and IL-13, followed by additional 48 h exposure to IL-4, exhibit altered barrier properties compared to untreated RHE or RHE exposed to IL-4 and IL-13, and then to vehicle. In contrast, no such alteration can be observed in any IL2RG^{-/0} RHE (**Figure 3b-c**). Altogether, these results suggest that IL-2R γ subunit receptor on keratinocytes might be involved in epidermal barrier alterations produced by IL-4 and IL-13.

IL-2R γ receptor subunit reduces induction by IL-4 and IL-13 of IL-13R α 2 expression in RHE

IL-13R α 2, considered as decoy receptor, becomes overexpressed in keratinocytes exposed to IL-4 and IL-13, as previously reported (5, 7, 9, 30). IL-13R α 2 expression by primary keratinocytes in RHE is increased when exposed to IL-4 and/or IL-13 (**Figure 4a**) and this regulation is blocked by JAK inhibition (**Figure 4b**), indicating that induction of IL-13R α 2 expression likely results from IL-4R α /IL-13R α 1 receptor activation. Again, these data are confirmed in RHE made of N/TERT keratinocytes (**Figure 4c**). Not surprisingly, mRNA expression of IL-13R α 2 does not occur in IL13RA1^{-/0} RHE exposed to ILs (**Figure 4d**). However, when keratinocyte expression of mRNA encoding IL-13R α 2 was investigated in IL2RG^{-/0} RHE first exposed to IL-4 and IL-13, then treated by IL-4 only, a strong induction is then observed, whereas only a weak expression of IL-13R α 2 is detected in IL2RG^{+/-0} RHE (**Figure 4e**). These results indicate that IL-2R γ subunit receptor expressed in RHE might exert inhibitory control on IL-13R α 2 expression by keratinocytes, drawing attention on consequences produced by IL-13R α 2 on the epidermal barrier in AD.

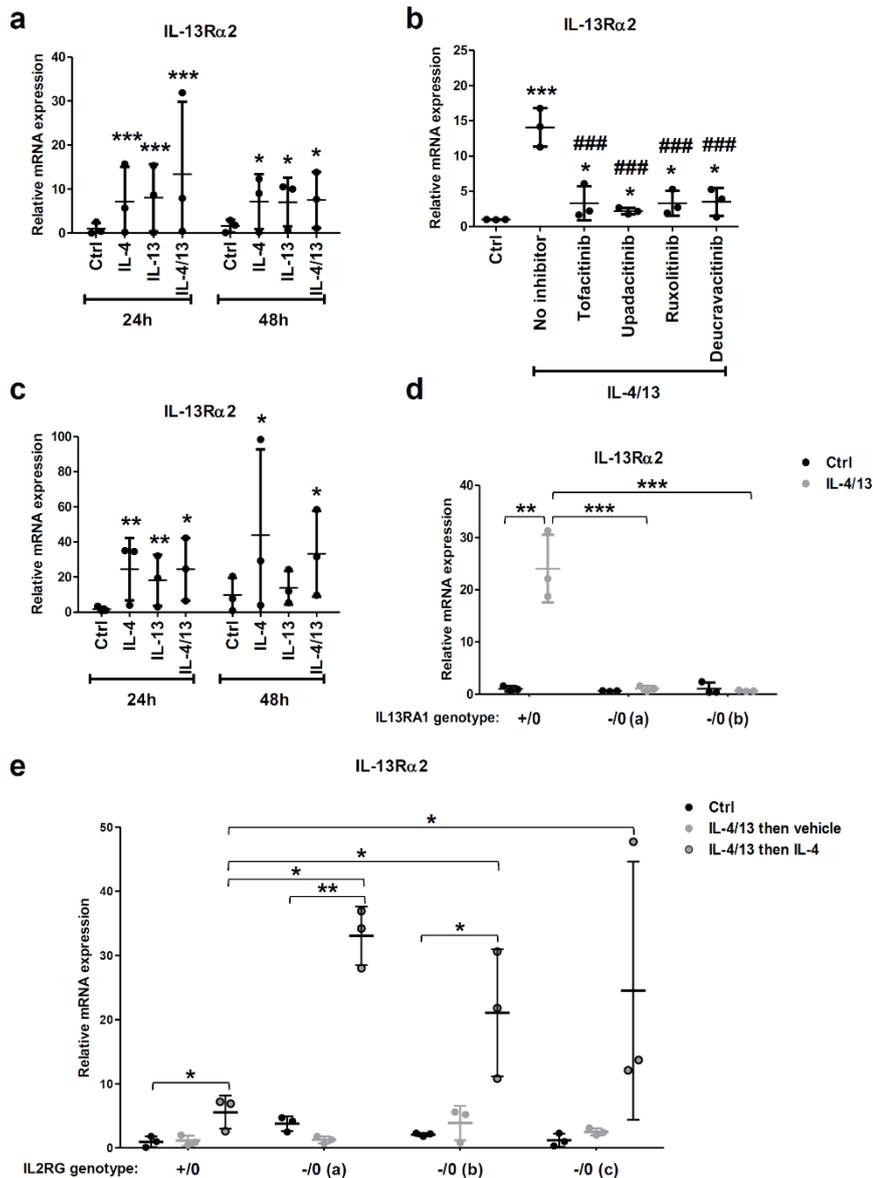


Figure 4: Induction of IL-13Rα2 expression by type II IL-4Rα/IL-13Rα1 receptor is partially inhibited by IL-2Rγ subunit receptor.

(a-d) RHE using primary (a-b) or N/TERT keratinocytes (c) and IL13RA1⁺⁰ or IL13RA1⁻⁰ RHE (d) were exposed to IL-4 and/or IL-13 (50 ng/ml) for 24 (a, c) and 48 hours (a-d) after an overnight treatment with 1μM tofacitinib, 0.2μM upadacitinib, 1μM ruxolitinib or 1μM deucravacitinib (b). (e) RHE were exposed to IL-4 and IL-13 (50 ng/ml) for 48 hours and then were exposed to IL-4 (50ng/ml) or vehicle for 48 hours. Level of IL-13Rα2 mRNA was assessed through RT-qPCR. RPLP0 was used as reference gene. Values are expressed relative to Ctrl 24h (a, c), Ctrl (b), IL13RA1⁺⁰ (d) or IL2RG⁺⁰ (e) Ctrl (mean ±SD, n=3, one-way ANOVA, * and # indicate statistical significance of measurement compared with Ctrl (a-c) and No inhibitor (b), respectively, * indicates statistical significance of measurement (d-e), *P<0.05, **P<0.005, ***/###P<0.001). Ctrl, control; IL, interleukins; RHE, reconstructed human epidermis.

DISCUSSION

Among cytokines produced during Th2 immune response in skin, IL-4 and IL-13 weaken epidermal barrier properties by inducing altered phenotype in keratinocytes. Experimentally, this alteration is reproduced in RHE exposed to both interleukins as such conditions enhance

expression of CA2 and NELL2 AD markers, and lower expression of differentiation markers and barrier components. As a result, IL-4 and IL-13 induce barrier weakness, spongiosis, and hypogranulosis in RHE. Because the RHE model holds no immune cells, consequences of IL-4 and IL-13 on keratinocytes and elaborated barrier are discriminated (20, 21, 33). IL-4 and IL-13 interact with RHE essentially through type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor since this is the only receptor for these ligands constitutively expressed on normal keratinocytes. IL-4 and IL-13 respectively also bind to IL-4R α /IL-2R γ or to decoy IL-13R α 2 receptors (10, 11, 34, 35). Recently, induced expression of IL-2R γ by keratinocytes in RHE exposed to IL-4 and IL-13 was interestingly reported (23). This study firstly depicts conditions required for expression of IL-2R γ by keratinocytes exposed to IL-4 and IL-13, then secondly investigates putative roles for IL-2R γ subunit receptor.

Despite no inducible expression of IL-2R γ was detected in keratinocyte monolayers, expression of this receptor subunit was initiated inside RHE exposed to IL-4 and IL-13 in some keratinocytes among all living layers. This concurs with recent studies which either indirectly demonstrated that IL-2R γ functions in keratinocytes *in vivo* (36) or had proven IL-2R γ expression and function at the surface of cultured keratinocytes (37). Epidermal expression of IL-2R γ also happens in skin lesions of AD patients, in accordance with previous report (38).

IL-2R γ expression in keratinocytes takes place through activation of type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor and downstream signaling. Indeed, JAK inhibitors interfere, although differentially, with this induction. Among them, individual characteristics might somehow explain different profiles of inhibition (tofacitinib broadly targets JAK1/2/3, upadacitinib rather targets JAK1, ruxolitinib targets JAK1/2, and deucravacitinib exhibits specificity to inhibit TYK2) (39-41). Nevertheless, they all inhibit IL-4/IL-13-induced STAT6 and STAT3 phosphorylation in RHE, hamper increased expression of AD-markers (CA2 and NELL2), or decreased expression of differentiation markers (LOR and FLG). To bring out the requirement for IL-4R α /IL-13R α 1 receptor in keratinocytes to respond to Th2 cytokines, N/TERT immortalized keratinocytes are used to inactivate IL13RA1 gene. Like primary RHE, tissues reconstructed with N/TERT keratinocytes (25, 42, 43) exhibit altered phenotype when exposed to IL-4 and IL-13 (22, 28). Conversely, IL13RA1⁻⁰ RHE created with cells deletant for IL-13R α 1 subunit fail to enhance STAT6 and STAT3 phosphorylation whenever exposed to IL-4 and IL-13, confirming the crucial role for type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor in keratinocytes. Accordingly, no alteration of phenotype can be brought by exposure to IL-4 and IL-13 in IL13RA1⁻⁰ RHE. Simultaneously, the expression of IL-2R γ receptor subunit is neither induced

in IL13RA1⁻⁰ RHE, supporting the requirement for activated IL-4R α /IL-13R α 1 receptor to induce IL-2R γ expression in keratinocytes.

To analyze the aftermath of IL-2R γ expression in keratinocytes on epidermal phenotype and barrier, IL2RG⁻⁰ N/TERT keratinocytes were also generated through deletions in IL2RG gene, thereby impeding any functional type I IL-4R α /IL-2R γ receptor that could be appearing in RHE. Indeed, we hypothesized that in presence of IL-4, IL-4R α might dimerize in keratinocytes with IL-2R γ to form the type I receptor of IL-4, but more investigation is still required to prove it.

Despite some AD-like phenotype appears in IL2RG⁻⁰ RHE exposed to IL-4 and IL-13, excluding any major role for IL-2R γ subunit receptor and downstream signaling in such alterations, barrier alterations were meanwhile absent following tissue exposure to IL-4 and IL-13. This unusual observation in RHE incubated with these interleukins suggests that IL-2R γ is nevertheless somehow involved in AD-like weakened barrier. In RHE, barrier alterations may result from multiple factors, including decreased expression of FLG and LOR, alteration in lipid composition of the cornified layer, or disruption of tight junctions (3, 44-46). In our IL2RG⁻⁰ model, since FLG and LOR expression being unaltered by IL-4, barrier alteration does not result from abnormal differentiation.

Of interest, the other receptor for IL-13, named IL-13R α 2, is expressed in keratinocytes within AD lesional skin (7, 11). Expression of this receptor by keratinocytes in vitro is also induced by IL-4 and IL-13 through binding to their type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor, and expression of IL-13R α 2 is just as well repressed by pretreatment of RHE with JAK inhibitors, and absent from IL13RA1⁻⁰ RHE. To our surprise though, induction of IL-13R α 2 expression by IL-4 and IL-13 is exacerbated in IL2RG⁻⁰ RHE, suggesting that IL-2R γ could somehow downregulate IL-13R α 2 expression. In the context of Th2-immune response, IL-13R α 2 is believed to inhibit consequences produced by IL-13, since this decoy receptor exhibits higher affinity to IL-13 than the IL-13R α 1 subunit. Because of its shorter cytoplasmic tail, IL-13R α 2 cannot activate signaling pathways like IL-13R α 1. In addition, when IL-13R α 2 subunit is present in high amount, this receptor is prone to inhibit IL-4 activation by its association to IL-4R α (5, 9-11, 47). In such context, one might hypothesize that barrier alterations by IL-4 and IL-13 is the consequence of type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor. IL-4 and IL-13 effects were normally inhibited by IL-13R α 2. Nevertheless, IL-2R γ in keratinocytes interacts with IL-13R α 2 expression, impeding its role to compete against IL-4 and IL-13-depending activation (**Supplementary Figure S8**).

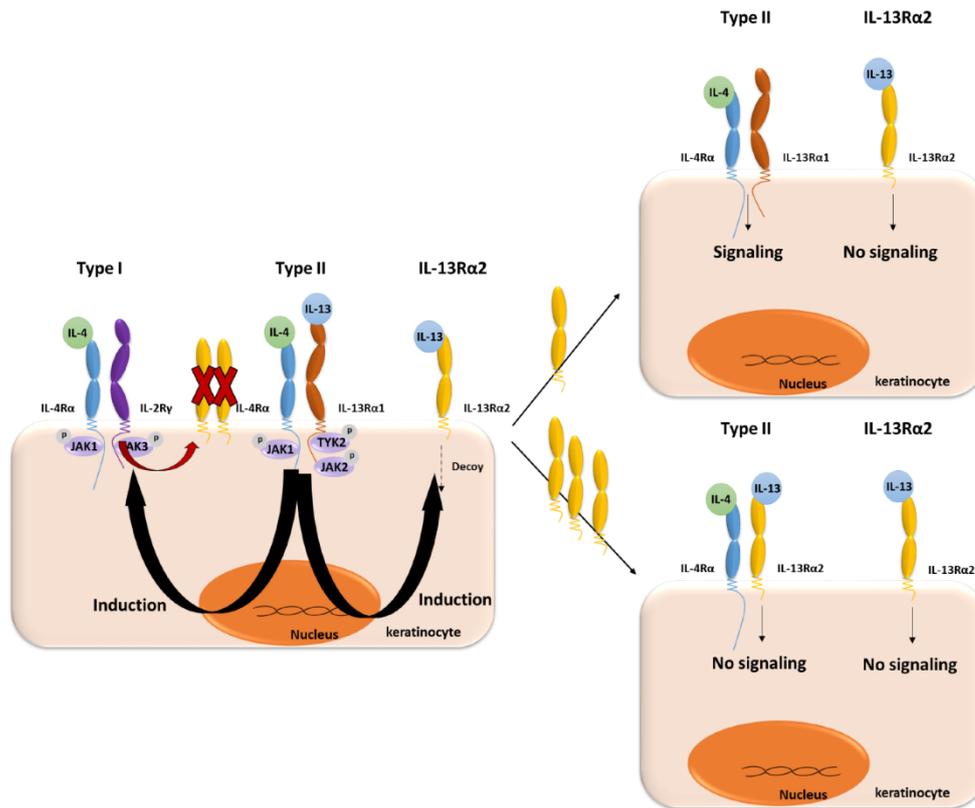


Figure S8: Schematic representation of inhibitory effect by IL-13Rα2 on IL-4 and IL-13 signaling

IL-2R γ subunit receptor partially inhibits IL-13R α 2 expression induced by IL-4 and IL-13-binding type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor. IL-13R α 2, a decoy receptor, impedes the binding of IL-13 on type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor by competition. A raised expression of IL-13R α 2 allows inhibition of IL-4 effects by binding IL-4R α .

Further studies are now awaited to characterize roles played by IL-13R α 2 receptor in normal and pathological epidermis.

Current treatments targeting IL-4 and IL-13 in AD patients have largely illustrated the crucial importance of these cytokines and of their epidermal signaling. Indeed, anti-IL-4R α dupilumab, and both anti-IL-13 tralokinumab and lebrikizumab have permitted an increased percentage of patients that reach 75% reduction in Eczema Area and Severity Index (EASI) (14, 15, 48). This study expands knowledge about IL-4 and IL-13 receptors in epidermal keratinocytes and reveals that the regulated expression of their subunit components must be considered when assessing treatments targeting their functions. Additionally, roles potentially taken by alternative receptors for IL-4 and IL-13 might explain differences observed when treating with different biologics. Similarly, choosing particular JAK inhibitors to treat AD (17) must consider their differential effects and most specific targets. In vitro models described herein certainly offer tools for preclinical assessment of new therapies.

In summary, this research reveals that expression of IL-2R γ subunit receptor in keratinocytes is induced through activation of type II IL-4R α /IL-13R α 1 receptor. IL-2R γ contributes to Th2-induced alteration of the epidermal barrier and interferes with expression of decoy IL-13R α 2 receptor.

ACKNOWLEDGEMENTS

Audrey Progneaux is holding FSR fellowship from the University of Namur. The authors thank Drs Bernadette Bienfait and Jean-Sébastien Blairvacq (Clinique St-Luc, Bouge) for providing normal skin samples, Valéry Bielarz for technical help, and Damien Detraux for checking language.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors state no conflict of interest

REFERENCES

1. 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.
2. De Vuyst E, Salmon M, Evrard C, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:119.
3. Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1337-43.
4. Teraki Y, Sakurai A, Izaki S. IL-13/IL-22-coproducing T cells, a novel subset, are increased in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(4):971-4.
5. Shankar A, McAlees JW, Lewkowich IP. Modulation of IL-4/IL-13 cytokine signaling in the context of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;150(2):266-76.
6. 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.
7. David M, Ford D, Bertoglio J, Maizel AL, Pierre J. Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene.* 2001;20(46):6660-8.
8. Zhang Y, He S, Mei R, Kang Y, Duan J, Wei R, et al. miR29a suppresses IL13-induced cell invasion by inhibiting YY1 in the AKT pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. *Oncol Rep.* 2018;39(6):2613-23.
9. Andrews AL, Holloway JW, Puddicombe SM, Holgate ST, Davies DE. Kinetic analysis of the interleukin-13 receptor complex. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46073-8.
10. Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(4):858-65.

11. Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Tsuji G, Furue K, Hashimoto-Hachiya A, et al. Scratching Counteracts IL-13 Signaling by Upregulating the Decoy Receptor IL-13Ralpha2 in Keratinocytes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13).
12. Waickman AT, Park JY, Park JH. The common gamma-chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(2):253-69.
13. Bakker DS, van der Wal MM, Heeb LEM, Giovannone B, Asamoah M, Delemarre EM, et al. Early and Long-Term Effects of Dupilumab Treatment on Circulating T-Cell Functions in Patients with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2021;141(8):1943-53 e13.
14. Beck LA, Thaci D, Deleuran M, Blauvelt A, Bissonnette R, de Bruin-Weller M, et al. Dupilumab Provides Favorable Safety and Sustained Efficacy for up to 3 Years in an Open-Label Study of Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis. *Am J Clin Dermatol.* 2020;21(4):567-77.
15. Wollenberg A, Blauvelt A, Guttman-Yassky E, Worm M, Lynde C, Lacour JP, et al. Tralokinumab for moderate-to-severe atopic dermatitis: results from two 52-week, randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled phase III trials (ECZTRA 1 and ECZTRA 2). *Br J Dermatol.* 2021;184(3):437-49.
16. Goncalves F, Freitas E, Torres T. Selective IL-13 inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *Drugs Context.* 2021;10.
17. Chovatiya R, Paller AS. JAK inhibitors in the treatment of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(4):927-40.
18. Sanchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Ortega-Martell JA, Zubeldia IA. New and Potential Treatments for Atopic Dermatitis: Biologicals and Small Molecules. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(3):18.
19. 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(11):871-5.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Minner F, Herphelin F, Poumay Y. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol.* 2010;585:71-82.

25. 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.
26. 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(INK-4A). *Biogerontology.* 2010;11(2):167-81.
27. 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.
28. Evrard C, Faway E, De Vuyst E, Svensek 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 Innov.* 2021;1(4):100054.
29. 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.
30. LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell.* 2008;132(2):259-72.
31. Yuki T, Hachiya A, Kusaka A, Sriwiriyanont P, Visscher MO, Morita K, et al. Characterization of tight junctions and their disruption by UVB in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2011;131(3):744-52.
32. Niehues H, Schalkwijk J, van Vlijmen-Willems I, 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 e13.
33. Silverberg JI, Kantor R. The Role of Interleukins 4 and/or 13 in the Pathophysiology and Treatment of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin.* 2017;35(3):327-34.
34. Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(6 Pt 1):1063-70.
35. Ul-Haq Z, Naz S, Mesaik MA. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;32:3-15.
36. Kamiya S, Ikegami I, Yanagi M, Takaki H, Kamekura R, Sato T, et al. Functional Interplay between IL-9 and Peptide YY Contributes to Chronic Skin Inflammation. *J Invest Dermatol.* 2022.
37. Nowak K, Linzner D, Thrasher AJ, Lambert PF, Di WL, Burns SO. Absence of gamma-Chain in Keratinocytes Alters Chemokine Secretion, Resulting in Reduced Immune Cell Recruitment. *J Invest Dermatol.* 2017;137(10):2120-30.
38. Plager DA, Leontovich AA, Henke SA, Davis MD, McEvoy MT, Sciallis GF, 2nd, et al. Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp Dermatol.* 2007;16(1):28-36.
39. Furumoto Y, Gadina M. The arrival of JAK inhibitors: advancing the treatment of immune and hematologic disorders. *BioDrugs.* 2013;27(5):431-8.

40. Parmentier JM, Voss J, Graff C, Schwartz A, Argiriadi M, Friedman M, et al. In vitro and in vivo characterization of the JAK1 selectivity of upadacitinib (ABT-494). *BMC Rheumatol*. 2018;2:23.
41. Danese S, Peyrin-Biroulet L. Selective Tyrosine Kinase 2 Inhibition for Treatment of Inflammatory Bowel Disease: New Hope on the Rise. *Inflamm Bowel Dis*. 2021;27(12):2023-30.
42. 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(2):100018.
43. 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.
44. Berdyshev E, Goleva E, Bronova I, Dyjack N, Rios C, Jung J, et al. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI Insight*. 2018;3(4).
45. 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(5):1161-9.
46. Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, et al. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci*. 2015;77(1):28-36.
47. Tabata Y, Khurana Hershey GK. IL-13 receptor isoforms: breaking through the complexity. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7(5):338-45.
48. Simpson EL, Flohr C, Eichenfield LF, Bieber T, Sofen H, Taieb A, et al. Efficacy and safety of lebrikizumab (an anti-IL-13 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical corticosteroids: A randomized, placebo-controlled phase II trial (TREBLE). *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(5):863-71 e11.

SUPPLEMENTARY METHODS

RNA extraction and RT-qPCR

RNA extraction of keratinocytes cultured as monolayers and RHE was performed using “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgium) and “ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System (Promega, Wisconsin, USA) respectively, according to the manufacturer’s recommendations. The purity and concentration of RNA were measured by NanoDrop 1,000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Reverse transcription was performed using “SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase Kit” (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). cDNA was amplified using the SYBRGreen method (Eurogentec, Liège, Belgium) and specific primers (300 nM) (Eurogentec, Liège, Belgium) listed in **Supplementary Table 3**.

Supplementary Table 3 : Primers used for RT-qPCR			
Interest gene	Forward	Reverse	Company
RPLP0	ATCAACGGGTACAA ACGAGTC	CCTTCTTGGCTGA TCCATCTG	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
IL-2Rγ ex1-2	ATTCTGACGCCAA TGGGAA	AGGGAGTCAGTGG GCATAGT	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-2Rγ ex5	GCAGAAACGCTAC ACGTTTCG	GTGGATTGGGTGG CTCCAT	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-2Rα	AATGCAAAGTCCAA TGCAGCC	TGTATCCCTGGAC GCACTGA	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-2Rβ	TATGAGTTTCAGGT GCGGGTC	GAGCCACGGAATG GTGTCC	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-7Rα	CTCTGTGCTCTGT TGGTCAT	ATCTGGCAGTCCA GGAAACT	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-9Rα	TGGAGGATGATGTG GTAGAG	AGTCAGCAGGAG AAAGATGG	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-15Rα	GTCTCTCCTGGCAT GCTACC	GCTGGTTTCCCCG AGTTTCA	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-21Rα	CCCGGTCATCTTTC AGACCC	TGCACCCACCCAT TTCTTGA	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-13Rα1	ACCCGAGGGAGCC AGCTCA	GTGGGGTCCCAGT GTAGCACC	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-13Rα2	ATACCTTTGGGACC TATTCC	ACTTGTAACCGG TACTGAC	Eurogentec, Liège, Belgium
CA2	AACAATGGTCATGC TTCAACG	ACAGGTAGTTCAC TTGGGGTC	Eurogentec, Liège, Belgium
NELL2	TAAGGGTATAATGC AAGATGTCCAATT	TCTAGACCCGTGA CTCGTTATTT	Eurogentec, Liège, Belgium
LOR	TCATGATGCTACCC GAGGTTTG	GTCTTGATCTACG TCGGCCTCT	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
FLG	GGGCACTGAAAGG CAAAAAG	CACCATAATCATA ATCTGCACTACCA	Sigma-Aldrich, Missouri,USA

cDNA of IL-4R α and the reference gene RPLP0 were amplified using the TaqMan method and specific primers/probes provided from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA): IL-4R α (HS 00420895) and RPLP0 (HS 00965056-m1). Fluorescence of SYBRgreen or probes was monitored through LightCycler 96 (Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgium). Relative mRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method.

Protein extraction and Western blot

Proteins were extracted in lysis buffer (62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 2% SDS, 8.7% Glycerol and 0.2% DTT). Briefly, for keratinocyte monolayers, lysate was boiled 5 minutes at 100°C. For RHE, lysate was boiled 5 minutes at 100°C and vortexed to separate the epidermis from the polycarbonate filter. Filter was removed and lysate boiled for 2 minutes at 100°C. Samples were loaded on polyacrylamide gel and transferred on a PVDF membrane (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). PVDF membranes were incubated overnight with primary antibodies diluted in TBS-5% BSA and then for 60 minutes with a secondary antibody diluted in TBS-5% BSA. Revelation was performed through ImageQuant Las4000mini system (GE Healthcare, Little Chalfont, England) after incubating membrane in BM Chemiluminescence blotting substrate (Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgium). Antibodies are listed in **Supplementary Table 4**.

Supplementary Table 4 : Antibodies used for western blotting			
Antibody	Dilution	Company	reference
RPLP13a	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#2765
IL-2Rγ	1/500	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	HPA046641
STAT6	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9362
pSTAT6	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9361
STAT3	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9139
pSTAT3	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#9131
Rabbit-HRP	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#7074
Mouse-HRP	1/1000	Cell signaling, Leiden, Netherlands	#7076

In situ hybridization

RNAscope kit (ACDBio, Newark, California, USA) was used in accordance with the manufacturer's instructions.

Paraffin slides, preheated at 60°C for 60 minutes, were dewaxed using two toluol baths and two 100% ethanol baths. Once slides were dried, endogen peroxidases were saturated using 3% H₂O₂ for 10 minutes. Target retrieval was performed for 15 minutes at 100°C. Slides were

incubated into 100% ethanol baths 3 minutes. A drop of protease⁺ was placed on the sample for 30 minutes at 40°C.

Fresh tissue sections, previously frozen at -20°C for 60 minutes, were fixed using 4% paraformaldehyde. Tissues were dehydrated using a 50% ethanol bath, a 70% ethanol bath and two 100% ethanol baths. Endogen peroxidases were saturated with 3% H₂O₂ for 10 minutes. For chromogenic assay, a drop of protease IV was placed on the sample for 30 minutes at 40°C. For fluorescence assay, a drop of protease III (1/15) was placed on the sample for 30 minutes at 40°C.

A drop of IL-2R γ (412191), HS-PPIB (313901) (positive control (Shokry et al., 2015)) or DapB (310043) (negative control (Shokry et al., 2015)) probes were placed on the sample for 2 hours at 40°C.

For chromogenic assay, signal was amplified through six AMP, AMP1 (30 minutes at 40°C), AMP2 (15 minutes at 40°C), AMP3 (30 minutes at 40°C), AMP4 (15 minutes at 40°C), AMP5 (45 minutes at RT), and AMP6 (15 minutes at RT). Signal was revealed through Fast Red 1/60 10 minutes at RT. Slides were counter-stained using hemalun and dehydrated through two toluol baths before being mounted using DPX (VWR International, Leuven, Belgium).

For fluorescence assay, signal was amplified through three AMP, AMP1 (30 minutes at 40°C), AMP2 (30 minutes at 40°C), and AMP3 (30 minutes at 40°C) and one HRP C1 (15 minutes at 40°C). Signal was revealed through TSA Plus Cyanine 3 (PN NEL744001KT; 1/1500) (30 minutes at 40°C). Samples are blocked 30 minutes with PBS-0.2%BSA-0.02% triton and are incubated overnight at 4°C with mouse anti-LCA antibody (1/100; Agilent Technologies, California, USA, M0701). Samples are incubated 60 minutes with AlexaFluorTM 488 goat anti-mouse (1/200; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, A-11001) and nucleus are stained 30 seconds by RNAscope Multiplex FL V2 DAPI (323108). Slides are mounted using mowiol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

Measurement of trans-epithelial electrical resistance (TEER)

TEER was measured using Millicell® ERS-2 Voltohmmeter (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA).

Permeability to biotin

Biotin diffusion from the culture medium to the surface of RHE was quantified as follows. RHE were washed with 500 μ l of PBS-1mM CaCl₂ and incubated for 30 minutes at 37°C in the same solution containing 2mg/ml of biotin (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin; ThermoScientific, Rockford, IL). After three washes with 500 μ l of PBS-1mM CaCl₂-100nM glycine, RHE were fixed using acetic formalin and embedded in paraffin. Sections were

dewaxed and rehydrated. After endogen peroxidase saturation with 3% of H₂O₂ (VWR International, Leuven, Belgium) for 10 minutes and a blocking step for 15 minutes in PBS-1mM CaCl₂ -0.2%BSA, sections were incubated for 1 hour in a drop of 0.5% Streptavidin-peroxidase (Vector Laboratories SA-5001, Burlingame, USA) and revealed using DAB (diaminobenzidine) substrate kit according to manufacturer recommendation (Vector Laboratories SA-5001, Burlingame, USA). Slides were counterstained using hemalun and dehydrated through two toluol baths before being mounted using DPX (VWR International, Leuven, Belgium).

DISCUSSION

La recherche qui se trouve à la base de cette thèse est subdivisée en deux parties : l'étude de l'expression d'IL-2R γ par les kératinocytes épidermiques, suivie de l'étude du rôle d'IL-2R γ dans la modification du phénotype des kératinocytes et notamment les conséquences produites sur la barrière épidermique.

La première partie a en effet démontré l'induction de l'expression de la sous-unité IL-2R γ par l'activation par IL-4 et IL-13 du récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 dans quelques kératinocytes présents dans toutes les couches vivantes des épidermes humains. Cette expression est également observée dans les kératinocytes d'épidermes de patients atteints de DA. L'analyse de la formation d'un récepteur fonctionnel de type I aux IL-4 par l'étude de la dimérisation de la sous-unité IL-2R γ avec la sous-unité IL-4R α et par l'analyse de l'activation de voies de signalisation sera discutée plus en détail dans cette section.

La seconde partie de ma thèse a collecté des données qui suggèrent qu'IL-2R γ joue un rôle dans l'altération de la barrière épidermique et l'inhibition de l'expression d'IL-13R α 2. L'efficacité de la barrière a été analysée par des tests de résistance électrique transépithéliale (TEER) et de perméabilité à la biotine, l'un permettant d'étudier la barrière dans la direction *outside-in* et l'autre dans la direction *inside-out*.

IL-13R α 2 est un récepteur de l'IL-13 dont le niveau d'expression par les kératinocytes est induit par l'activation du récepteur de type II. IL-13R α 2 est connu comme étant un récepteur antagoniste car IL-13 se lie à ce récepteur avec une plus grande affinité qu'à IL-13R α 1 sans activer des voies de signalisation (Donaldson et al., 1998, Kawakami et al., 2001a, Rahaman et al., 2002). Certains articles ont toutefois rapporté qu'IL-13R α 2 peut activer les voies de signalisation de MAPK et de PI3K/Akt (Bartolome et al., 2015, Fichtner-Feigl et al., 2008, Fujisawa et al., 2009). Le rôle exact d'IL-13R α 2 dans les épidermes reste donc encore à étudier. Ceci sera discuté plus en détail dans le point 4.

1. Les modèles utilisés et leurs limites.

Dans un premier temps, l'expression des récepteurs a été analysée dans des kératinocytes cultivés en monocouche selon le protocole décrit par Minner et son équipe (Minner et al., 2010). Les kératinocytes sont cultivés dans un milieu complet contenant notamment des facteurs de croissance pour aider à la prolifération des kératinocytes. Après avoir atteint 50% de confluence, les kératinocytes sont cultivés dans un milieu dépourvu de facteurs de croissance. En effet, à ce stade de confluence, les kératinocytes sont capables de produire leurs propres facteurs de croissance pour activer l'EGFR et ainsi induire une croissance autocrine. Malgré la présence d'un contrôle négatif à chaque expérience, il est préférable de passer par une culture

autocrine dans les études utilisant des kératinocytes afin de minimiser l'impact des facteurs protéiques ajoutés au milieu de culture sur le phénotype de ces cellules. Le modèle de cellules cultivées en monocouche est facile à manipuler, engendre des résultats rapidement et permet d'étudier un type cellulaire sans interférence avec d'autres cellules. Néanmoins, des limites sont à noter telles que l'absence de stratification et de barrière épidermique efficace, comme celle observée au niveau d'un épiderme normal *in vivo*. Le modèle d'épiderme humain reconstruit permet de pallier ces limites.

La reconstruction d'épiderme sur un filtre en polycarbonate a été mise au point dans notre laboratoire (Frankart et al., 2012b, Poumay et al., 2004). Les épidermes reconstruits miment la situation observée *in vivo* en termes d'architecture avec les quatre couches (basale, épineuse, granuleuse et cornée), de différenciation et de barrière épidermique. Grâce à ce modèle, des modèles de maladie dermatologique ont été mis au point dans notre laboratoire afin d'étudier notamment la dermatite atopique (De Vuyst et al., 2018, do Nascimento Pedrosa et al., 2017). En effet, la barrière épidermique et la régulation de l'expression des marqueurs de DA sont altérées au niveau des RHE stimulés 48 heures aux IL-4, IL-13 et IL-25, des cytokines qui jouent un rôle important dans cette pathologie. L'augmentation relative en ARNm d'IL-13R α 2 et d'IL-2R γ a également été observée dans ces RHE stimulés par une incubation en présence de ces ILs, ce qui a été confirmé durant ma recherche (De Vuyst et al., 2018, do Nascimento Pedrosa et al., 2017, Hubaux et al., 2018, Park et al., 2021).

Bien que le modèle de RHE soit un bon modèle pour étudier l'impact de la modification des kératinocytes sur la barrière épidermique, il reste néanmoins incomplet. En effet, l'absence de derme empêche l'étude de l'interaction entre celui-ci et l'épiderme. Par ailleurs, une réponse inflammatoire manque dans notre modèle de RHE car les cellules immunitaires sont absentes. Comme indiqué dans le paragraphe précédent, il est toutefois possible de mimer une réponse inflammatoire en ajoutant au milieu de culture des cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité, même si la réponse immunitaire reste incomplète (De Vuyst et al., 2016). Il est important de noter que cette caractéristique est à la fois une force et une limite en fonction du sujet d'étude. Par exemple, dans ma recherche, les effets observés sont uniquement le résultat de l'impact des cytokines sur les kératinocytes épidermiques avec des conséquences sur la barrière épidermique.

Au cours de la recherche menant à cette thèse, le génome des kératinocytes a été édité par la méthode CRISPR/Cas9, expliquée en détail dans la thèse de Céline Evrard, pour créer des clones déficients. Brièvement, les kératinocytes sont transfectés par électroporation par des ribonucléoprotéines (RNP) constituées de la Cas9 et d'ARN guide (ARNg), complexe qui

contient un crARN qui reconnaît la séquence cible et un TracrARN qui reconnaît la Cas9. La Cas9 migre dans le noyau pour induire une cassure double-brin au site cible. La Cas9 est activée uniquement après reconnaissance du *protospacer adjacent motif* (PAM), séquence de NGG qui suit la séquence cible. Comme les cellules ne possèdent pas de séquence modèle pour une réparation par recombinaison homologue, la réparation de l'ADN se fait plutôt par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Les extrémités des brins d'ADN coupés se liguent entre elles en engendrant une délétion ou une insertion de quelques nucléotides, ce qui induit un décalage du cadre de lecture avec généralement introduction d'un STOP prématuré. Cette technique est donc souvent utilisée pour obtenir un knock-out (KO) d'un gène d'intérêt.

Après électroporation du RNP dans les kératinocytes, ces cellules sont cultivées à la suite d'une dilution-limite afin d'obtenir des populations monoclonales de kératinocytes. Plusieurs passages doivent donc être réalisés dans le but d'obtenir une densité de cellules suffisante. L'augmentation du nombre de passages induit la sénescence des kératinocytes primaires (Mound et al., 2017) qui se manifeste à plus ou moins 10 passages. Une des méthodes pour éviter une sénescence répllicative est l'utilisation de kératinocytes immortalisés tels que les kératinocytes N/TERT. Les kératinocytes N/TERT, décrits dans les années 2000 (Dickson et al., 2000), sont des kératinocytes de prépuce immortalisés par transfection par le gène qui code pour la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) afin de maintenir une longueur stable des télomères, structures des extrémités chromosomiques qui protègent de la sénescence. Ces kératinocytes N/TERT qui expriment de façon accrue la hTERT et qui présentent une perte spontanée de l'expression de p16^{INK4a}, protéine importante dans la régulation du cycle cellulaire, deviennent capables de se diviser de manière illimitée sans devenir sénescents (Moran et al., 2021, Smits et al., 2017). Les kératinocytes N/TERT sont capables de reconstruire un épiderme (RHE N/TERT) avec le même protocole utilisé lors de la reconstruction d'épidermes à partir de kératinocytes primaires (RHE primaire) (**Publication supplementary Figure S5a**). Les RHE N/TERT possèdent les quatre couches de l'épiderme au niveau desquelles les marqueurs de différenciation se trouvent exprimés aux endroits habituels, c'est-à-dire la kératine 10 dans les couches suprabasales et la filaggrine, la loricrine et l'involucrine dans la couche épineuse. Bien que la couche cornée soit plus mince, elle est bien présente et semble efficace avec une faible perméabilité à la biotine et à la Lucifer Yellow. Céline Evrard a néanmoins montré que la TEER des RHE N/TERT est légèrement plus faible que celle des RHE primaires après 11 jours de reconstruction à un niveau de $\pm 4000 \Omega$. J'ai cependant observé que la valeur de la TEER des RHE N/TERT est similaire à celle des RHE primaires après 13 jours de reconstruction (Evrard et al., 2021a, Smits et al., 2017) (**Publication**

supplementary Figure S6c). Moran et ses collègues ont comparé les kératinocytes primaires et N/TERT, tous deux cultivés en monocouche et ils ont observé que les kératinocytes N/TERT se différencient plus rapidement que les kératinocytes primaires. En outre, l'induction de l'expression de protéines de jonctions serrées telles que la claudine 1 et l'occludine par les kératinocytes N/TERT et donc le transport de ces protéines à la surface de la cellule sont retardés (Moran et al., 2021). Comme ces jonctions sont des structures importantes pour la formation de la barrière épidermique, un retard dans l'organisation des jonctions peut expliquer un retard dans la formation de la barrière épidermique lors de la différenciation. De ce fait, les RHE N/TERT atteignent des valeurs de TEER similaires à celles des RHE primaires ($\pm 8000 \Omega$) mais plus tardivement. Les RHE N/TERT réagissent aux cytokines de type Th2 de la même manière que les RHE primaires (Evrard et al., 2021a, Smits et al., 2017). L'expression de CA2 et de NELL2 est augmentée dans les RHE N/TERT stimulés aux IL-4 et IL-13 alors que l'expression de la filaggrine et de la loricrine est diminuée (Smits et al., 2017) (**Publication supplementary Figure S5b**). De plus, les récepteurs aux IL-4 et IL-13 sont exprimés dans les RHE N/TERT de manière constitutive (récepteur de type II) ou de manière inductible par IL-4 et IL-13 (récepteur de type I et IL-13R α 2) (**Publication supplementary Figure S5c ; Figure 1i ; Figure 4c**). Vu ce contexte, nous avons choisi d'utiliser les kératinocytes N/TERT afin d'obtenir des clones KO pour les gènes qui codent pour IL-13R α 1, IL-2R γ , ou encore plus récemment IL-13R α 2. Les RHE IL13RA2^{-/-} sont actuellement analysés par Julia de Toledo Bagatin, une doctorante de l'Université de São Paulo au Brésil qui effectue un stage de recherche dans notre laboratoire durant 6 mois. Son étude sera expliquée plus en détail dans le point 4 de cette section.

Pour obtenir des kératinocytes KO pour IL2RG ou pour IL13RA1, deux sites sont ciblés au début et à la fin du gène par des RNP (ARNg + Cas9). L'avantage des RNP est que le produit est rapidement dégradé par la cellule et la Cas9 ne coupe donc le gène qu'une seule fois, contrairement aux plasmides qui restent dans le noyau plusieurs jours ou aux lentivirus qui peuvent induire l'intégration aléatoire du gène de la Cas9 et des ARNg dans le génome. Cette dégradation rapide de la Cas9 permet donc de diminuer le risque d'*off-targets* (Smits et al., 2022, Vakulskas and Behlke, 2019). Par ailleurs, une étude a montré que le risque d'*off-targets* diminue avec la concentration en ARNg (Kim et al., 2015). Pour notre recherche, quatre ARNg différents ont été utilisés pour cibler le gène d'intérêt, chacun à une concentration 4 fois inférieure. Néanmoins, le nombre de séquences qui peuvent être potentiellement des *off-targets* est augmenté.

Lors de l'édition d'un gène, il existe la possibilité de délétér des régions non codantes de l'ADN tels que des miARN, des lncARN ou des promoteurs d'autres gènes, ce qui pourrait avoir un impact sur la cellule. L'analyse du gène IL2RG sur le site « Ensembl » (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147168;r=X:71107404-71112108) montre qu'aucune région non codante, connue pour avoir une importance biologique, n'est délétée. En revanche, dans le gène IL13RA1 (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000131724;r=X:118727133-118794535) se localise également un pseudogène (TMEM30B Pseudogene 1) et un snoARN (small nucleol ARN). Un pseudogène est un gène inactif qui peut être transcrit, mais pour lequel la traduction en une protéine est impossible. Le pseudogène joue un rôle positif ou négatif dans les cancers par exemple en régulant l'expression de gènes par compétition avec les miARN, par dégradation de l'ARNm ou de la protéine ou par génération de siARN (Jia et al., 2022, Shi et al., 2016). Les snoARN forment des snoRNP avec des protéines dont certaines d'entre elles vont protéger cet ARN de la dégradation. Les snoRNP sont constitués également de méthyltransférases ou de pseudo-uridine synthases afin de modifier les ARN ribosomiques (ARNr) pour respectivement protéger l'ARNr de la dégradation, et stabiliser la structure de l'ARNr. Toutefois, le rôle des snoARN doit être étudié plus en profondeur (Streit and Schleiff, 2021, Wajahat et al., 2021). Rien n'est actuellement répertorié dans la littérature à propos du TMEM30B Pseudogene 1 et le snoARN, ce qui ne veut pas dire que ces gènes non codants n'ont aucun effet sur la biologie de la cellule. Le TMEM30B Pseudogene 1 est localisé entre l'exon 8 et l'exon 9. Le snoARN, quant à lui, se trouve entre l'exon 1 et l'exon 2 c'est-à-dire avant la délétion qui est réalisée entre l'exon 2 et l'exon 11. De ce fait, le snoARN reste encore présent dans nos clones KO pour IL13RA1.

Le risque d'*off-targets* restant donc toujours présent, il demeure important d'étudier plusieurs clones différents pour identifier les conséquences d'un KO précis sur la cellule. Le risque d'*off-targets* peut également être analysé par comparaison de séquençage à haut débit de l'ARN entre les RHE KO et les RHE non édités exposés chacun aux ILs. Après analyse d'une possible perte totale de l'expression d'un gène dans les RHE KO, il faudrait vérifier si ce gène peut être ciblé par l'ARN guide. Une troisième façon de s'assurer que le phénotype des RHE KO est dû à l'absence de l'expression de la protéine d'intérêt est de surexprimer cette protéine par transfection des kératinocytes KO par le gène qui a été délété. Si le phénotype obtenu est bien la conséquence d'une délétion du gène d'intérêt, la transfection par ce gène devrait restaurer un phénotype qui ressemble à celui des épidermes non édités.

En conclusion, deux modèles sont utilisés lors de ma recherche dans le cadre de ma thèse, les kératinocytes cultivés en monocouche et les épidermes humains reconstruits à partir de kératinocytes primaires ou de kératinocytes immortalisés N/TERT. Les kératinocytes N/TERT sont utilisés pour générer des clones déficients pour IL13RA1, IL13RA2 et IL2RG.

2. Etude de l'expression d'IL-2R γ par les kératinocytes

Les expressions génique et protéique d'IL-2R γ sont induites au niveau des kératinocytes épidermiques exposés aux IL-4 et IL-13. Grâce à nos expériences d'hybridation *in situ*, nous avons pu voir que l'ARNm codant la sous-unité IL-2R γ est détecté dans toutes les couches vivantes de l'épiderme. De ce fait, la localisation tissulaire de la protéine a été analysée par immunoperoxydase (**Annexe figure 1**). L'expression protéique d'IL-2R γ est induite par les ILs dans quelques kératinocytes des couches vivantes de l'épiderme. Néanmoins, l'expression observée par cette méthode reste relativement faible. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'étude de l'expression protéique par *Western blot* (**Publication Figure 1d**). Comme cette observation n'a été réalisée qu'une seule fois, il serait donc nécessaire de la réitérer. Malheureusement, l'anticorps anti-IL-2R γ utilisé n'est plus produit par la firme. D'autres anticorps ont été testés mais aucun d'eux ne semble spécifique pour la protéine IL-2R γ avec nos protocoles de *Western blot* et d'immunomarquage.

L'expression d'IL-2R γ n'est pas induite par IL-4 et IL-13 dans les kératinocytes cultivés en monocouche à confluence (**Publication Figure 1a-c**) ou après la confluence avec une concentration plus élevée en ions calcium pour mimer la différenciation et un début de stratification (**Publication supplementary Figure S3**). En revanche, l'expression de cette sous-unité de récepteur est induite dans les RHE, ce qui suggère que son expression ne peut se faire que lorsque les kératinocytes forment un épiderme. De ce fait, l'environnement 3D semble important pour observer une expression d'IL-2R γ par les kératinocytes. La protéine IL-2R γ semble être localisée dans toutes les couches vivantes de l'épiderme (**Annexe Figure 1**) réfutant l'hypothèse qu'une couche particulière de l'épiderme est importante pour induire l'expression d'IL-2R γ dans des kératinocytes.

L'expression de transcrits codant la sous-unité IL-2R γ n'a pas seulement été observée *in vitro* dans des RHE mais également *in vivo* dans des biopsies d'épidermes lésionnels de patients atteints de DA (**Publication Figure 1g**). Plusieurs équipes ont également montré l'augmentation de l'expression d'IL-2R γ dans des peaux lésionnelles de patients atteints de DA par *microarray* (GSE146352, GSE5667) (Lee et al., 2020, Plager et al., 2007). Néanmoins, l'ARNm de toutes les cellules présentes dans la peau est mélangé lorsque les transcrits sont

extraits et donc l'expression d'IL-2R γ détectée dans ces préparations peut être due à la présence de cellules hématopoïétiques. Les *single cell RNA sequencing* (sgRNA seq), quant à eux, permettent d'étudier l'expression génique dans chaque cellule du tissu. Le sgRNA seq réalisé par Reynolds et l'équipe de Fiona Watt montre une expression de transcrits codant IL-2R γ dans des kératinocytes de personnes saines. L'ARNm d'IL-2R γ est exprimé par une proportion plus importante de kératinocytes de patients atteints de DA (https://developmentcellatlas.ncl.ac.uk/datasets/hca_skin_portal/) (Reynolds et al., 2021). Globalement, l'expression reste toutefois faible et est uniquement localisée dans quelques kératinocytes, ce qui est en accord avec nos résultats obtenus dans les RHE et les peaux de patients atteints de DA. A noter aussi qu'une faible expression d'IL-13R α 2 est aussi observée dans les kératinocytes de patients atteints de DA.

L'équipe de Nowak a également démontré, par cytométrie de flux, l'expression d'IL-2R γ (nommée γ c dans l'article) et de ses corécepteurs qui forment les récepteurs aux IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 en surface de kératinocytes alors que le récepteur à l'IL-2 n'y est pas exprimé (Nowak et al., 2017). Comme ce qui a été observé dans cette thèse, IL-2R γ est faiblement exprimée contrairement à IL-4R α . Ces résultats fournissent une indication supplémentaire d'une expression d'IL-2R γ par les kératinocytes. Selon le protocole de Nowak, l'analyse de l'expression en surface de la sous-unité IL-2R γ sera réalisée sur notre modèle de RHE par Ornella Calà, doctorante au laboratoire de Laure Dumoutier, à l'Institut de Duve de l'UCL. En effet, après stimulation aux IL-4 et IL-13, les RHE seront dissociés par de la trypsine pour obtenir une suspension cellulaire pour permettre une analyse en cytométrie de flux.

Pour conclure, une expression d'IL-2R γ relativement faible est induite par quelques kératinocytes de toutes les couches vivantes d'un épiderme reconstruit lors d'une stimulation aux IL-4 et IL-13. La même expression est observée dans les kératinocytes de patients atteints de DA. L'expression d'IL-2R γ est induite par l'activation des voies de signalisation par le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1. Toutefois, il est nécessaire d'étudier la localisation d'IL-2R γ en surface des kératinocytes, ce qui fait l'objet de perspectives de ma recherche de thèse.

3. Etude de la formation du récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ fonctionnel

Au cours de cette recherche, nous avons montré qu'une expression d'IL-2R γ dans des kératinocytes devient possible quand l'épiderme qu'ils composent se trouve stimulé par une incubation avec IL-4 et IL-13. Dans ces conditions, l'expression d'IL-2R γ , et possiblement la formation d'un récepteur de type I aux IL-4, semble jouer un rôle sur l'affaiblissant de la

barrière épidermique et sur la régulation de l'expression d'IL-13R α 2. Il est donc nécessaire d'analyser la dimérisation d'IL-2R γ avec IL-4R α pour vérifier la formation du récepteur de type I. Une analyse par *Western blot* de l'expression d'une des deux sous-unités après une immunoprécipitation de l'autre sous-unité pourraient fournir des informations sur cette dimérisation. Cependant, ces études n'ont pas pu être réalisées dans ce travail car les anticorps dirigés contre IL-2R γ que le laboratoire a pu acquérir ont montré des limites lors de leur utilisation. De plus, une co-immunoprécipitation avec des RHE est difficile à réaliser. En effet, l'utilisation d'un tampon de lyse contenant une concentration élevée de dodécylsulfate de sodium (SDS) est nécessaire pour dissocier les protéines produites au sein des épidermes et ainsi obtenir un lysat avec une concentration protéique suffisante. Cependant, pour réaliser correctement une co-immunoprécipitation, il est conseillé d'utiliser un tampon de lyse doux pour garder intacte les structures natives de la protéine cible et de ses partenaires. La dimérisation d'IL-2R γ avec IL-4R α peut être analysée par transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Cette technique consiste à faire exprimer une molécule fluorescente donneuse sur une sous-unité du récepteur et une molécule fluorescente accepteuse sur l'autre sous-unité. Si les deux molécules sont à une distance de moins de 10 nm de distance suite à la dimérisation des deux sous-unités, le fluorochrome donneur excite le fluorochrome accepteur par transfert de son énergie (Gahbauer and Bockmann, 2016). Comme les sous-unités du récepteur doivent être exprimées de manière physiologique, les séquences qui codent pour les fluorochromes peuvent être intégrées au génome juste après la séquence cible des sous-unités.

Nous avons voulu évaluer si la sous-unité IL-2R γ est capable de former un récepteur fonctionnel avec IL-4R α par l'étude de l'activation des voies de signalisation. Les épidermes, reconstruits à partir de kératinocytes primaires, ont été stimulés aux IL-4 et IL-13 pour que les kératinocytes expriment les récepteurs de type I et de type II. Ces épidermes ont ensuite été stimulés aux IL-4 ou IL-13 afin d'activer les récepteurs (**Annexe Figure 2a**). Les interleukines activent STAT6, STAT3 et JNK et diminuent le taux de phosphorylation d'ERK quel que soit le traitement. Il est donc difficile de savoir quel récepteur régule quelle voie de signalisation. De ce fait, l'activation de ces voies a été étudiée dans les épidermes déficients pour l'expression d'IL-2R γ . Dans les épidermes non édités, IL-4 et IL-13, indépendamment, augmentent le taux de phosphorylation de STAT6 alors que cette augmentation est moindre dans les RHE IL2RG^{-/-} (**résultats non montrés**). Néanmoins, les résultats sont assez variables d'une expérience à l'autre puisque STAT6 est déjà activée par la première stimulation avec IL-4 et IL-13 ce qui empêche d'observer un signal ON/OFF.

Hong et son équipe ont prouvé que les kératinocytes d'épidermes de patients atteints de DA expriment le récepteur à l'IL-9. IL-9R α dimérise avec IL-2R γ pour activer les voies de signalisation de STAT1, STAT3, STAT5, ERK et Akt (Hong et al., 2015). De plus, une étude *in vivo* de modèles murins de psoriasis a démontré une fonctionnalité du récepteur à l'IL-9 dans les kératinocytes (Kamiya et al., 2022). La stimulation d'épidermes reconstruits par des cytokines de type Th1 telles que l'IFN γ permet l'induction de l'expression d'IL-9R α par les kératinocytes (Niehues et al., 2017). L'étude de l'activation du récepteur à l'IL-9 pourrait nous aider à savoir si la sous-unité IL-2R γ est exprimée en surface des kératinocytes et si elle est capable d'y former un récepteur fonctionnel. L'expression d'IL-9R α et d'IL-2R γ est induite dans les RHE par la co-stimulation d'IL-4 et d'IFN γ (**résultats non montrés**). L'activation de STAT1 a donc été étudiée dans les RHE IL2RG⁺⁰ et IL2RG⁻⁰ stimulés à l'IL-9 après une première stimulation aux IL-4 et IFN γ (**résultats non montrés**). Bien que l'IFN γ induit une activation de STAT1, une seconde stimulation à l'IL-9 induit une augmentation de cette activation dans les RHE non édités. Néanmoins, en absence de l'expression d'IL-2R γ , l'augmentation de l'activation de STAT1 n'est pas signalée. Ceci est vrai pour deux expériences indépendantes, mais dans une troisième expérience, IL-9 n'a pas semblé induire une augmentation du taux de phosphorylation de STAT1, que ce soit dans les épidermes KO ou non. Au vu du nombre élevé de Cq déterminé par RT-qPCR lors de l'analyse de l'expression en ARNm d'IL-9R α et d'IL-2R γ , le récepteur à l'IL-9 serait exprimé uniquement par quelques kératinocytes dans l'épiderme, alors que le récepteur à l'IFN γ est exprimé de manière plus importante dans l'épiderme, au niveau de la couche basale (van den Oord et al., 1995). De ce fait, le signal de pSTAT1 par le récepteur à l'IFN γ serait capable de masquer celui induit par le récepteur à l'IL-9.

Nowak et son équipe, qui ont constaté une expression d'IL-2R γ et de ses corécepteurs en surface des kératinocytes (**voir point 2 de cette section**), a également prouvé que ces récepteurs sont fonctionnels (Nowak et al., 2017). Comme l'ARNm d'IL-7R α semble être exprimé fortement dans les kératinocytes sans avoir besoin de stimulation, l'expression d'IL-7R α et l'activation de STAT1 par IL-7 (Barata et al., 2019) sont étudiées dans notre modèle pour investiguer la fonctionnalité d'IL-2R γ . Cette étude est réalisée pour les mêmes raisons que l'étude de l'activation du récepteur à l'IL-9. Comme IL-7R α semble ne pas avoir besoin de stimulation pour être exprimée, STAT1 ne sera pas activée avant la stimulation d'IL-7 et un signal ON/OFF pourra donc être observé. Cela permettra d'avoir une réponse plus claire sur la fonctionnalité d'IL-2R γ .

Les voies de signalisation activées par les récepteurs aux IL-4 et IL-13 font intervenir les protéines JAK. Théoriquement, le récepteur de type I active JAK1/JAK3 et le récepteur de type II active JAK1/JAK2/TYK2 (Shankar et al., 2022). Comme montré dans l'article soumis, on dispose dans notre laboratoire de quatre inhibiteurs de JAK avec des sélectivités différentes pour les JAK ; le tofacitinib (JAK3>JAK2>JAK1), l'upadacitinib (JAK1>JAK2), le ruxolitinib (JAK2>JAK1) et le deucravacitinib (TYK2) (Danese and Peyrin-Biroulet, 2021, Furumoto and Gadina, 2013, Parmentier et al., 2018). Une autre solution pour analyser l'activation du récepteur de type I est donc de jouer sur la spécificité des inhibiteurs de JAK (**Figure 26**). Dans un premier temps, les RHE sont stimulés aux IL-4 et IL-13 pour qu'ils expriment éventuellement le récepteur de type I aux IL-4 en plus du récepteur de type II. Ensuite, ces épidermes sont traités aux inhibiteurs de JAK afin d'inhiber spécifiquement le récepteur de type II. Théoriquement, l'activation de STAT6 par IL-4 devrait passer par l'activation du récepteur de type I puisque le récepteur de type II est inhibé. Différentes concentrations d'inhibiteurs de JAK, tels que le ruxolitinib et le deucravacitinib, sont testées afin de trouver la concentration la plus adéquate pour inhiber spécifiquement l'activation des voies de signalisation par le récepteur de type II. Cette étude est en cours, menée par Céline Dotreppe, dans le cadre de son mémoire de Master en Sciences Biomédicales.

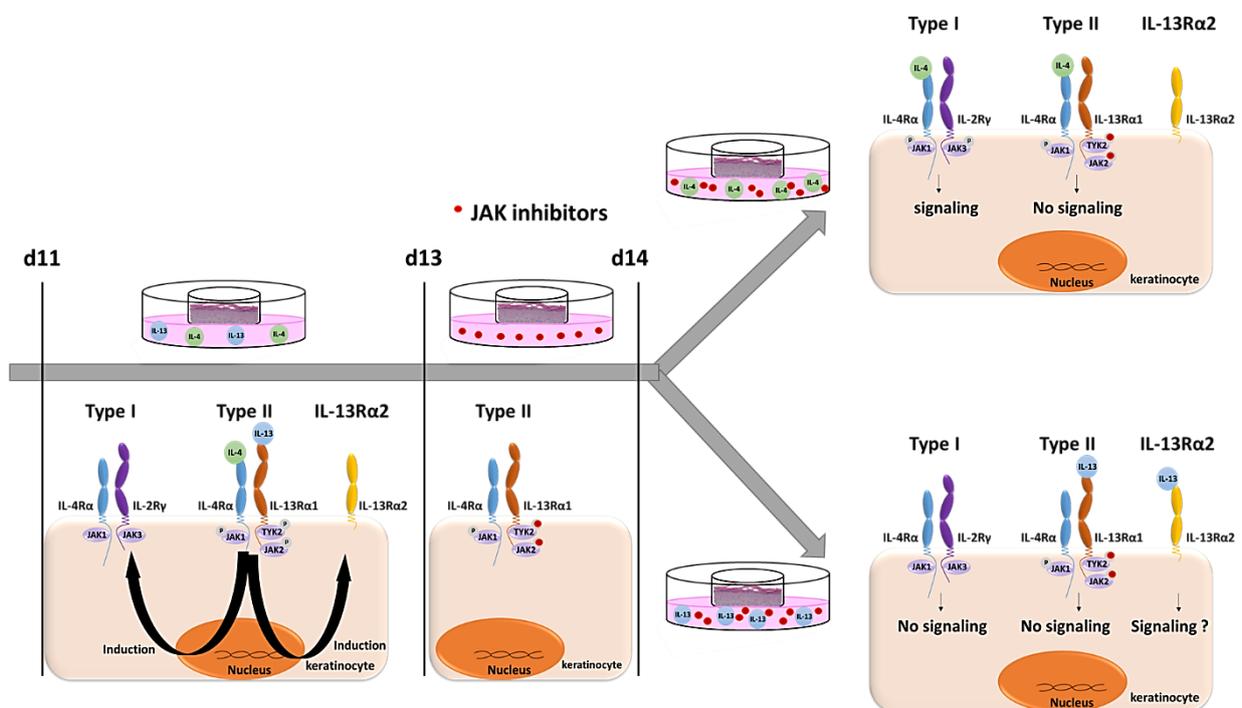


Figure 26: représentation schématique du protocole dans le but d'analyser l'activation du récepteur de type I. Les RHE sont stimulés 48 heures aux IL-4 et IL-13 pour exprimer les récepteurs de type I, de type II et IL-13Rα2. Ces épidermes sont ensuite stimulés 15 minutes aux IL-4 ou IL-13 après un traitement de 24 heures aux inhibiteurs de JAK pour inhiber TYK2 et JAK2.

En conclusion, pour étudier la formation d'un récepteur fonctionnel, il est nécessaire d'analyser soit la dimérisation d'IL-4R α avec IL-2R γ soit l'activation des voies de signalisation par le récepteur de type I. L'étude de l'activation des voies de signalisation est compliquée car IL-4 active autant les récepteurs de type I et de type II et l'activation du récepteur de type II est nécessaire pour l'induction de l'expression du récepteur de type I. Pour pallier cette difficulté, l'activation du récepteur à IL-9 a été analysée dans des épidermes IL2RG⁺⁰ et IL2RG⁻⁰ alors que celle du récepteur à IL-7 est en cours d'investigation. Ces deux récepteurs partagent la sous-unité IL-2R γ pour être fonctionnels. D'ailleurs, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré directement ou indirectement qu'IL-2R γ est capable de former un récepteur fonctionnel à la surface de kératinocytes épidermiques (Hong et al., 2015, Kamiya et al., 2022, Nowak et al., 2017).

4. Etude du rôle d'IL-2R γ dans l'altération de la barrière épidermique.

Les résultats obtenus lors de ce travail indiquent qu'une première stimulation des épidermes par IL-4 et IL-13 provoque une altération de la barrière épidermique par l'activation du récepteur de type II. Après cette stimulation, une restauration de l'efficacité de la barrière ainsi qu'une perte de l'expression d'IL-2R γ sont induites dans un milieu dépourvu d'ILs (**résultats non montrés**) alors que l'altération de la barrière épidermique est maintenue après une seconde stimulation aux IL-4. IL-2R γ serait, en partie au moins, responsable de ce maintien de l'altération de la barrière épidermique. La manière dont la barrière est altérée n'est pas connue. Cette étude est reprise dans les perspectives de ma thèse. Quelques hypothèses sont avancées dans cette discussion.

La barrière épidermique peut être altérée en conséquence d'une dérégulation de l'expression de marqueurs de différenciation tels que la filaggrine et la loricine. La filaggrine est une protéine qui joue un rôle dans de nombreux processus biologiques des kératinocytes. Cette protéine confère aux cornéocytes un cytosquelette extrêmement robuste et se dégrade en métabolites d'acides aminés qui diminuent le pH et augmentent l'hydratation de la peau. La filaggrine jouant un rôle important dans ces processus, elle semble essentielle dans l'efficacité de la barrière (Cau et al., 2018, Kawasaki et al., 2012). La loricine, quant à elle, est importante pour la formation de l'enveloppe cornée (Eckhart et al., 2013). Comme observé dans les RHE rendus déficients pour la FLG par l'expression forcée de shARN, une perte de la FLG induit une altération de la barrière avec une augmentation de la perméabilité à la Lucifer Yellow (Pendaries et al., 2014). D'autres études ont démontré que la quantité de NMF diminue chez les souris FLG^{-/-}, ce qui mène à une sécheresse cutanée et à une altération de la barrière

épidermique (Kawasaki et al., 2012). Au cours de ma recherche, le niveau d'expression de la filaggrine diminue par une stimulation de 48 heures par IL-4 et IL-13 dans les RHE N/TERT et les RHE primaires qui ont une barrière altérée. Même si une tendance peut être indiquée, après un traitement supplémentaire de 48 heures à l'IL-4, l'expression de la filaggrine n'est plus diminuée significativement par rapport aux RHE contrôles, alors que l'altération de la barrière est toujours présente (**Publication supplementary Figure S5b ; supplementary Figure S7c, Figure 3b-c**). La même observation est faite pour l'expression de la loricrine. Mes données suggèrent que la filaggrine et la loricrine ne sont pas les seules protéines responsables de la perte de l'efficacité de la barrière épidermique. En effet, d'autres éléments tissulaires peuvent entrer en compte, tels que l'altération de l'expression et/ou l'organisation des lipides dans la couche cornée et la désorganisation des jonctions serrées.

La couche cornée est un modèle de briques/mortier dans lequel le mortier correspond aux lipides, sécrétés par les corps lamellaires et modifiés dans la couche cornée. Ces lipides sont principalement du cholestérol, des acides gras libres et des céramides composés d'une base sphingoïde et d'une longue chaîne d'acides gras. Bien que la composition des lipides dans les RHE N/TERT diffère un peu par rapport aux RHE primaires, la densité et l'organisation restent similaires (van Drongelen et al., 2014). Dans la couche cornée d'épidermes de patients atteints de DA, la concentration en céramides est diminuée en conséquence de la diminution de l'expression de sphingomyélinases (SMase) et de glucocérobrosidases (GCCase) (Brauweiler et al., 2014, Hatano et al., 2005). De plus, ces céramides sont construits à base de chaînes d'acides gras plus petites, ce qui induit une altération dans l'organisation des lipides et donc diminue l'efficacité de la barrière épidermique (Berdyshev et al., 2018). Cette altération peut être due à une diminution de l'expression de l'élongase (ELOVL3), une enzyme responsable de la formation de longues chaînes d'acides gras (Westerberg et al., 2004). IL-4 et IL-13 sont responsables de la diminution de l'expression de la SMase, de la GCCase et de la ELOVL3 (Berdyshev et al., 2018, Brauweiler et al., 2014, Hatano et al., 2005). L'altération de la barrière épidermique par IL-4 et IL-13 dans notre modèle peut donc être la conséquence d'une altération de la composition et de l'organisation en lipides de la couche cornée.

Les jonctions serrées sont des structures composées de plusieurs protéines localisées principalement dans la couche granuleuse. Ces structures forment une barrière pour empêcher le passage de fluide, d'ions et de grosses molécules vers l'extérieur de l'organisme. L'expression de ces protéines telles que la claudine 1, l'occludine et ZO1 est diminuée dans les épidermes de patients atteints de DA qui montrent une altération de la barrière épidermique (Bergmann et al., 2020, De Benedetto et al., 2011, Yuki et al., 2016). Les épidermes reconstruits

et les peaux équivalentes contiennent également des jonctions serrées dont la localisation épidermique est similaire à celle dans la peau humaine (Brandner et al., 2002, Yuki et al., 2016). En effet, la claudine 1 est localisée dans toutes les couches vivantes de l'épiderme, alors que l'occludine et ZO1 sont localisées à la surface des kératinocytes de la couche granuleuse. L'altération des jonctions serrées via une entérotoxine induit dans des peaux équivalentes une altération de la barrière épidermique, celle-ci mise en évidence par une augmentation de la perméabilité à la Lucifer Yellow (Yuki et al., 2013). Des études ont montré que les IL-4 et IL-13 ne diminuent pas l'expression des jonctions serrées telles que la claudine 1 et l'occludine (Honzke et al., 2016). Cependant ces interleukines pourraient modifier la localisation des jonctions serrées en surface des cellules, ce qui induirait une altération de leur fonction et par conséquent une altération de la barrière épidermique. Schmidt et son équipe ont analysé l'impact d'IL-13 sur la claudine 4 et 8 et ZO1 dans des cellules humaines épithéliales de trachées. Une agrégation intracellulaire des trois protéines a été observée, responsable probablement d'une altération de la barrière d'épithélium de la trachée (Schmidt et al., 2019). Ces résultats confortent donc notre hypothèse selon laquelle la modification de la localisation des jonctions serrées par IL-4 et IL-13 pourrait être responsable de l'altération de la barrière épidermique. Ceci pourrait être étudiée par immunomarquage des différentes protéines des jonctions.

Nos données suggèrent que l'expression d'IL-13R α 2 est régulée par IL-2R γ puisqu'en l'absence d'IL-2R γ , suite à l'édition de son gène, l'induction de l'expression d'IL-13R α 2 par IL-4 et IL-13 est plus importante. Nous avons également prouvé que l'expression d'IL-13R α 2 est induite par l'activation du récepteur de type II par IL-4 et IL-13. Ce dernier résultat concorde avec ceux obtenus dans la littérature qui montrent également une augmentation de l'expression d'IL-13R α 2 par IL-4 et IL-13 dans des cultures en monocouche de kératinocytes primaires ou des cellules HaCaT (kératinocytes immortalisés) (David et al., 2001, Sivaprasad et al., 2010, Ulzii et al., 2019). IL-13R α 2 est aussi exprimé dans les kératinocytes d'épidermes de patients atteints de DA (Reynolds et al., 2021, Ulzii et al., 2019, Xiao et al., 2021). Comme expliqué dans l'introduction de cette thèse, la fonction d'IL-13R α 2 est fortement controversée dans la littérature. Certaines études démontrent qu'après stimulation par l'IL-13, IL-13R α 2 est capable d'activer des voies de signalisation telles que les voies des MAPK et de PI3K/Akt pour induire la fibrose et le cancer (Bartolome et al., 2015, Donaldson et al., 1998, Fichtner-Feigl et al., 2008, Fujisawa et al., 2009, He et al., 2013, Shankar et al., 2022). D'autres études ont prouvé qu'IL-13R α 2 n'est pas capable d'activer des voies de signalisation car il possède une courte queue cytoplasmique sur laquelle les domaines de liaison aux JAK sont absents. IL-13R α 2

jouerait par ses propriétés particulières le rôle de récepteur antagoniste qui inhibe les voies de signalisation activées par IL-13 en détournant le ligand de son autre récepteur (Shankar et al., 2022). IL-13R α 2 est également capable d'inhiber les voies de signalisation activées par IL-4 (Andrews et al., 2006b, Rahaman et al., 2002).

Bien que le rôle d'IL-13R α 2 ait été peu étudié dans les kératinocytes, il a été montré qu'une perte de l'expression d'IL-13R α 2 par des siARN résulte en une augmentation de l'activation de STAT6 par IL-13, confirmant ainsi le rôle inhibiteur d'IL-13R α 2 (Sivaprasad et al., 2010). Au contraire, d'autres études ont suggéré que ce récepteur est capable d'activer des voies de signalisation. En effet, en l'absence d'IL-13R α 2 par l'expression de shARN, IL-13 n'est plus capable de réguler l'expression de médiateurs inflammatoires dans des kératinocytes primaires (Xiao et al., 2021). Le rôle exact d'IL-13R α 2 dans les kératinocytes et ses conséquences sur la barrière épidermique doivent donc être étudiés plus en détail. Des kératinocytes N/TERT déficients pour l'expression d'IL-13R α 2 viennent d'être générés dans notre laboratoire par le système CRISPR/Cas9 avec le même protocole utilisé pour l'édition des gènes des deux autres récepteurs. Les épidermes KO pour IL13RA2 sont analysés par Julia de Toledo Bagatin. Elle analyse si la sous-unité IL-13R α 2 représente plutôt un récepteur antagoniste en inhibant les voies de signalisation activées par IL-13 ou IL-4 ou, au contraire, s'il est capable d'activer des voies de signalisation par sa liaison avec IL-13. Elle analyse également le rôle de ce récepteur dans la régulation de l'expression de marqueurs de DA tels que CA2, NELL2, FLG et LOR. Son impact sur l'altération du phénotype des épidermes et de la barrière épidermique est également investigué.

En résumé, IL-2R γ semble jouer un rôle dans l'altération de la barrière épidermique et la régulation de l'expression d'IL-13R α 2. Par la suite, il est donc nécessaire d'analyser la manière dont IL-2R γ altère la barrière épidermique par l'étude soit de la localisation des jonctions serrées soit de la composition et de l'organisation des lipides dans la couche cornée. Le rôle d'IL-13R α 2 dont l'expression est régulée par IL-2R γ doit également être investigué plus en profondeur.

IL-2R γ pourrait donc jouer un rôle dans la DA par l'altération du phénotype des kératinocytes et de la barrière épidermique. Les nouveaux traitements sur le marché contre la DA ciblent IL-4R α (dupilumab), IL-13 (tralokinumab) ou les JAK (abrocitinib, baricitinib, upadacitinib). Par des méta-analyses, les résultats des essais cliniques dans l'étude de l'efficacité du dupilumab, du tralokinumab, du baricitinib, de l'abrocitinib et de l'upadacitinib contre la DA ont été combinés (Agboola et al., 2022, Silverberg et al., 2022). Ces méta-analyses indiquent que le pourcentage de patients qui atteignent l'EASI75 et IGA0/1 est plus petit dans

le groupe traité au tralokinumab ou au baricitinib que dans le groupe traité au dupilumab alors que ce pourcentage est plus élevé dans le groupe traité à l'abrocitinib et à l'upadacitinib (**voir Table 3 et 4 dans introduction**). Les résultats de ma recherche apportent des connaissances plus approfondies sur l'expression et le rôle des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans les kératinocytes épidermiques ainsi que sur l'activation des voies de signalisation par IL-4 et IL-13. Cette étude permet donc d'améliorer notre compréhension sur le mode d'action des différents anticorps ou inhibiteurs JAK prescrits lors d'un traitement contre la DA dans les épidermes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion (**Figure 27**), lors d'une exposition aux IL-4 et IL-13 des kératinocytes insérés dans un épiderme, l'activation des voies de signalisation par le récepteur de type II IL-4R α /IL-13R α 1 exprimé de manière constitutive par les kératinocytes induit l'expression d'IL-2R γ et d'IL-13R α 2. De façon intéressante, l'expression d'IL-2R γ a été observé au niveau des kératinocytes lésionnels de patients atteints de DA. Puisque l'expression de cette sous-unité de récepteur n'est pas induite dans des kératinocytes d'une culture en monocouche exposés aux IL-4 et IL-13, nous en avons déduit qu'il est nécessaire d'analyser un épiderme reconstruit en trois dimensions pour investiguer la fonction d'IL-2R γ au niveau des kératinocytes et son éventuelle dimérisation avec IL-4R α pour former le récepteur de type I.

L'activation du récepteur de type II des kératinocytes par IL-4 et IL-13 provoque également l'altération de la barrière épidermique et modifie l'expression de marqueurs de DA et de marqueurs de différenciation.

En plus de l'activation préalable des récepteurs de type II IL-4R α /IL-13R α 1, une stimulation par l'IL-4 après une première exposition aux IL-4 et IL-13 devient susceptible d'activer les récepteurs de type I IL-4R α /IL-2R γ , dont la dimérisation et l'expression en surface des kératinocytes doit être étudiée. En empêchant l'expression d'IL-2R γ , nous avons observé que cette sous-unité semble requise non seulement pour produire l'altération de la barrière épidermique, mais aussi pour réguler l'expression d'IL-13R α 2. Or, considéré comme un récepteur antagoniste, IL-13R α 2 est capable d'inhiber les voies de signalisation d'IL-13, mais également d'IL-4 lorsque la concentration d'IL-13R α 2 est élevée.

Alors que, dans notre modèle, l'expression des transcrits qui codent pour la filaggrine n'est pas diminuée, la barrière épidermique est toutefois altérée. Nos résultats démontrent donc qu'une baisse de l'expression de la filaggrine n'est pas le seul paramètre responsable de l'altération de la barrière. Dans notre modèle d'épiderme reconstruit, la modification de la localisation des protéines des jonctions serrées ainsi que l'altération de la composition en lipides et de leurs organisations dans la couche cornée peuvent être aussi deux éléments qui induisent une perte de l'efficacité de la barrière épidermique.

En rassemblant les données obtenues lors de ma recherche avec celles de la littérature, nous proposons l'hypothèse suivante à propos du lien entre les trois récepteurs des IL-4 et IL-13. Premièrement, l'activation du récepteur de type II par IL-4 et IL-13 altère la formation de la barrière épidermique par les kératinocytes. Toutefois, l'induction de l'expression d'IL-13R α 2 dans ces conditions active une boucle de rétroaction négative qui diminue les possibilités d'activation du récepteur de type II. Une restauration de la barrière épidermique reste donc

possible. En revanche, lorsqu'IL-2R γ est suffisamment exprimée dans les kératinocytes épidermiques, sa fonction réduit l'expression d'IL-13R α 2, réduisant par là-même la protection éventuelle conférée par ce récepteur antagoniste. L'altération de la barrière épidermique s'en trouve maintenue. Mais pour valider cette hypothèse, l'étude du rôle d'IL-13R α 2 sur le phénotype des kératinocytes et l'efficacité de la barrière épidermique demeure requise.

Les traitements actuels contre la DA ciblent les voies de signalisation dépendant des récepteurs aux IL-4 et IL-13, soit en utilisant des anticorps dirigés contre la sous-unité IL-4R α (dupilumab) ou IL-13 (tralokinumab), soit en bloquant l'activation des voies de signalisation par des inhibiteurs de JAK (abrocitinib, baricitinib, upadacitinib et ruxolitinib). Ces différents traitements présentent une efficacité contre les symptômes de la DA, mais de nombreuses différences entre les résultats apportés par les différents traitements restent à comprendre et à prendre en considération. Puisque la présente étude sur les récepteurs des IL-4 et IL-13 au niveau des kératinocytes épidermiques étend nos connaissances sur la fonctionnalité et le rôle de ces récepteurs dans ces cellules, nous pensons avoir ainsi contribué à terme à l'amélioration de la prise en charge de la DA en augmentant notre compréhension des mécanismes utiles à son traitement.

Les résultats obtenus durant la recherche qui a conduit à la présente thèse ont ouvert de nombreuses perspectives mentionnées précédemment. Certaines perspectives sont en cours d'investigation, par deux étudiants du Master en Sciences Biomédicales dans le cadre de leur mémoire, Nicolas Van Dooren et Céline Dotreppe et par une doctorante de l'Université de São Paulo au Brésil, Julia De Toledo Bagatin.

Durant ma recherche, les RHE ont été analysés majoritairement après une exposition combinée d'IL-4 et d'IL-13. Le rôle spécifique de chacune de ces interleukines sur le phénotype des kératinocytes et de leurs épidermes est dès lors étudié. Dans le but d'investiguer les voies de signalisation activées soit par IL-4 soit par IL-13, l'activation des différentes JAK est inhibée par des inhibiteurs de JAK (tofacitinib, ruxolitinib, upadacitinib, deucravacitinib) dont la concentration est la plus faible possible pour augmenter leur spécificité. Les épidermes peuvent être préalablement traités aux IL-4 et IL-13 pour induire l'expression du récepteur de type I IL-4R α /IL-2R γ et d'IL-13R α 2. Cette étude permet également d'approfondir nos connaissances sur le rôle des différentes JAK dans la régulation de l'expression de gène des kératinocytes, dans l'altération de la barrière épidermique et dans la modification du phénotype des épidermes après une stimulation aux IL-4 et IL-13.

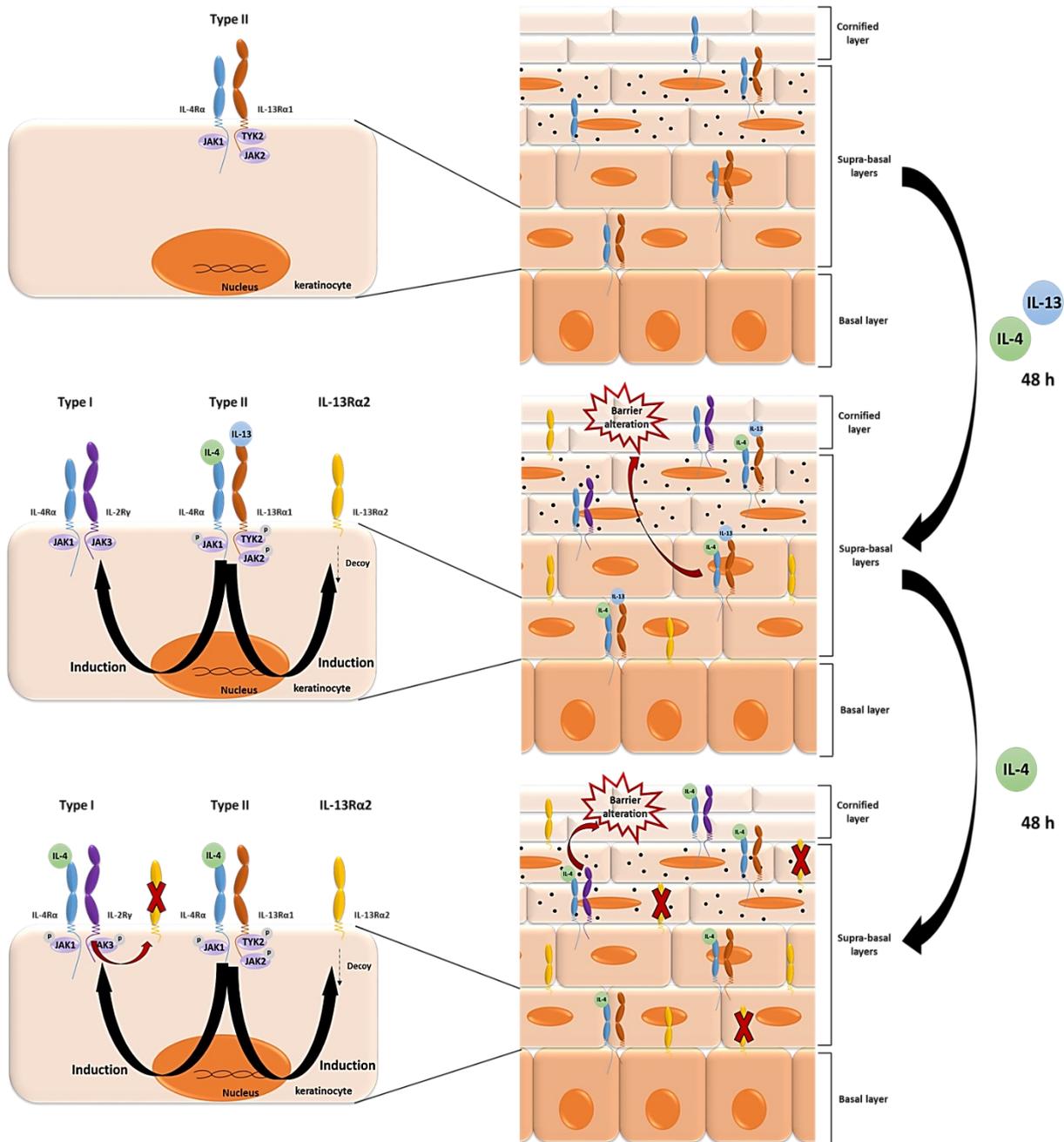


Figure 27: Représentation schématique des effets des IL-4 et IL-13 sur les kératinocytes d'épidermes reconstruits. Le récepteur de type II aux IL-4 et IL-13 est activé dans les épidermes stimulés 48 heures aux IL-4 et IL-13 pour induire l'expression d'IL-13Rα2 et d'IL-2Rγ. Cette dernière est probablement capable de dimériser avec IL-4Rα pour former le récepteur de type I aux IL-4. L'activation du récepteur de type I induit l'altération de la barrière épidermique. Une seconde stimulation de 48 heures aux IL-4 permet l'activation du récepteur de type I et de type II. IL-2Rγ joue un rôle dans le maintien de l'altération de la barrière épidermique et dans l'inhibition de l'expression d'IL-13Rα2.

ANNEXES

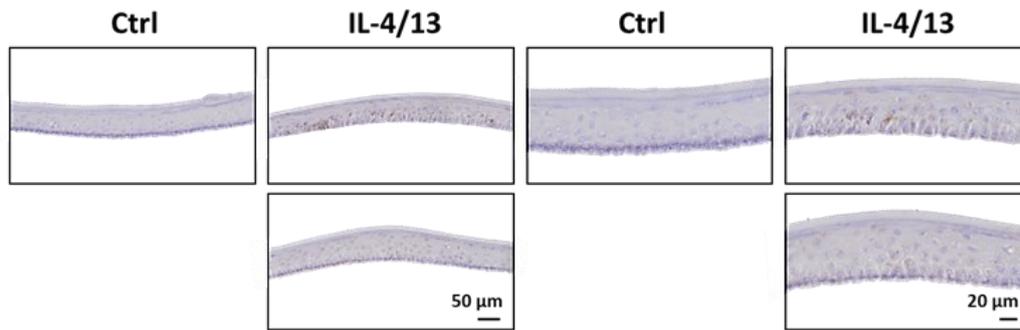


Figure 1 : La protéine IL-2R γ est exprimée dans certains kératinocytes des couches vivantes de l'épiderme
 Les épidermes humains reconstruits à partir de cellules primaires ont été exposés aux IL-4 et IL-13 (50 ng/ml) durant 48 heures. La protéine IL-2R γ est détectée par immunoperoxydase et les lames ont été contre-colorées à l'hémalum. L'image est représentative d'une seule expérience. Ctrl, control.

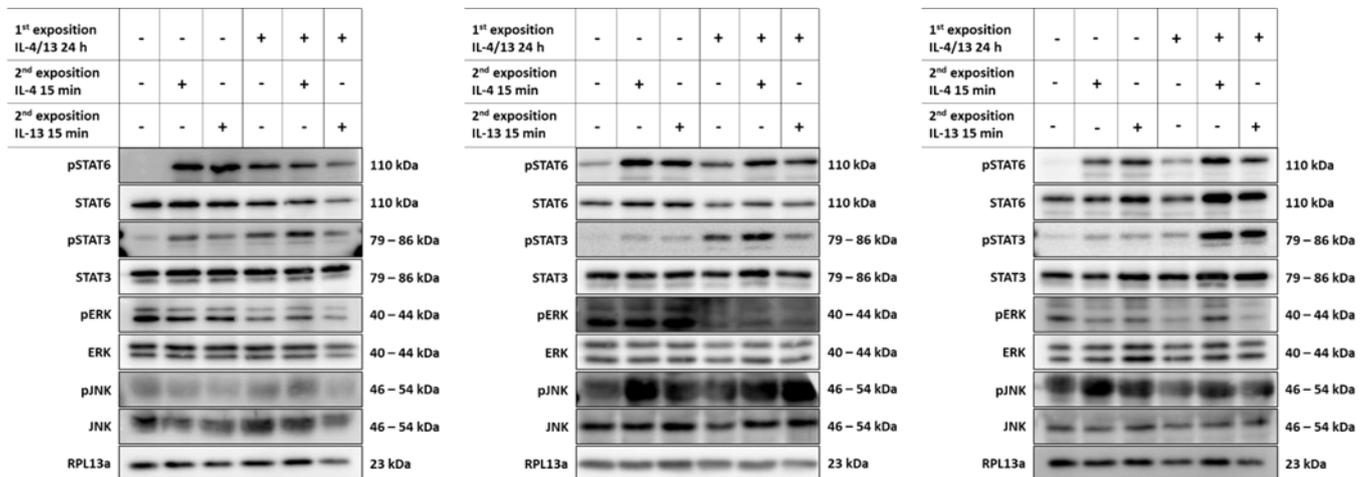


Figure 2 : Régulation de l'activation des voies de signalisation de STAT6, STAT3, ERK et JNK par IL-4 et IL-13.
 Les épidermes reconstruits à partir de kératinocytes primaires ont été exposés aux IL-4 et IL-13 (50 µg/ml) pendant 24 heures afin d'induire le récepteur de type I. Ces épidermes ont ensuite été exposés 15 minutes aux IL-4 ou IL-13 (50 µg/ml) pour activer les différents récepteurs. Les formes totales et phosphorylées de STAT6 et de STAT3 ont été analysées par *Western blot*. RPL13a a été utilisé comme contrôle de charge. Les différents *Western blot* ont été réalisés sur 3 expériences indépendantes. Ctrl, control.

REFERENCES

- Akaiwa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, Terada N, Suto H, Koga T, et al. Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine* 2001;13(2):75-84.
- Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2011;22(21):4068-78.
- Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Leung DY, et al. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* 2007;179(2):984-92.
- Alberola G, Schroder JM, Froment C, Simon M. The Amino-Terminal Part of Human FLG2 Is a Component of Cornified Envelopes. *J Invest Dermatol* 2019;139(6):1395-7.
- Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* 2013;92(6-7):229-36.
- Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol* 2013;93(3):261-7.
- Andrews AL, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. *J Immunol* 2006a;176(12):7456-61.
- Andrews AL, Holloway JW, Puddicombe SM, Holgate ST, Davies DE. Kinetic analysis of the interleukin-13 receptor complex. *J Biol Chem* 2002;277(48):46073-8.
- Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006b;118(4):858-65.
- Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015;517(7534):293-301.
- Avlas S, Shani G, Rhone N, Itan M, Dolitzky A, Hazut I, et al. Epithelial cell-expressed type II IL-4 receptor mediates eosinophilic esophagitis. *Allergy* 2022.
- Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J* 2014;462(1):1-13.
- Baker LB. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin)* 2019;6(3):211-59.
- Bakker DS, Nierkens S, Knol EF, Giovannone B, Delemarre EM, van der Schaft J, et al. Confirmation of multiple endotypes in atopic dermatitis based on serum biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2021a;147(1):189-98.
- Bakker DS, van der Wal MM, Heeb LEM, Giovannone B, Asamoah M, Delemarre EM, et al. Early and Long-Term Effects of Dupilumab Treatment on Circulating T-Cell Functions in Patients with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2021b;141(8):1943-53 e13.
- Barata JT, Durum SK, Seddon B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nature Immunology* 2019;20(12):1584-93.
- Bartolome RA, Garcia-Palmero I, Torres S, Lopez-Lucendo M, Balyasnikova IV, Casal JI. IL13 Receptor alpha2 Signaling Requires a Scaffold Protein, FAM120A, to Activate the FAK and PI3K Pathways in Colon Cancer Metastasis. *Cancer Res* 2015;75(12):2434-44.
- 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.
- Bataillon M, Lelievre D, Chapuis A, Thillou F, Autourde JB, Durand S, et al. Characterization of a New Reconstructed Full Thickness Skin Model, T-Skin, and its Application for Investigations of Anti-Aging Compounds. *Int J Mol Sci* 2019;20(9).

- Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, Barry NP, Murata S, Crumrine D, et al. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J Biol Chem* 2002;277(49):47399-406.
- Berdyshev E, Goleva E, Bronova I, Dyjack N, Rios C, Jung J, et al. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI Insight* 2018;3(4).
- Bergmann S, von Buenau B, Vidal YSS, Haftek M, Wladykowski E, Houdek P, et al. Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently. *Sci Rep* 2020;10(1):2024.
- Bhatt AP, Damania B. AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV. *Front Immunol* 2012;3:401.
- Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 2013;54:1-16.
- Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010;22(2):125-37.
- Bieber T. Atopic dermatitis: an expanding therapeutic pipeline for a complex disease. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21(1):21-40.
- Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, et al. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389(10086):2287-303.
- Blume-Peytavi U, Tan J, Tennstedt D, Boralevi F, Fabbrocini G, Torrelo A, et al. Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30 Suppl 4:3-56.
- Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2011;242(1):233-46.
- Brady SP. Parakeratosis. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(1):77-84.
- Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, et al. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 2002;81(5):253-63.
- Brauweiler AM, Bin L, Kim BE, Oyoshi MK, Geha RS, Goleva E, et al. Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal alpha-toxin-induced keratinocyte death. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(2):421-7 e1-2.
- Brauweiler AM, Goleva E, Leung DYM. Th2 cytokines increase Staphylococcus aureus alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *J Invest Dermatol* 2014;134(8):2114-21.
- Brettmann EA, de Guzman Strong C. Recent evolution of the human skin barrier. *Exp Dermatol* 2018;27(8):859-66.
- Brihan I, Fekete GL, Turda C, Tica O, Venter AC, Ianosi S, et al. Clinicopathological correlation of transient acantholytic dermatosis: A case report. *Exp Ther Med* 2022;23(2):173.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3(3):238-50.
- Broughton SE, Hercus TR, Lopez AF, Parker MW. Cytokine receptor activation at the cell surface. *Curr Opin Struct Biol* 2012;22(3):350-9.
- 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 L, Chen L, Li H, Wei Z, Xie S, Zhang M, et al. Differential antigen expression between human eccrine sweat glands and hair follicles/pilosebaceous units. *J Mol Histol* 2019;50(4):335-42.

- Cau L, Mechin MC, Simon M. Peptidylarginine deiminases and deiminated proteins at the epidermal barrier. *Exp Dermatol* 2018;27(8):852-8.
- Chambers ES, Vukmanovic-Stejić M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* 2020;160(2):116-25.
- Chan LS. Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci* 1997;2:d343-52.
- Chen H, Common JE, Haines RL, Balakrishnan A, Brown SJ, Goh CS, et al. Wide spectrum of filaggrin-null mutations in atopic dermatitis highlights differences between Singaporean Chinese and European populations. *Br J Dermatol* 2011;165(1):106-14.
- Chen W, Sivaprasad U, Gibson AM, Ericksen MB, Cunningham CM, Bass SA, et al. IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132(4):951-8 e1-6.
- Chen W, Sivaprasad U, Tabata Y, Gibson AM, Stier MT, Finkelman FD, et al. IL-13R alpha 2 membrane and soluble isoforms differ in humans and mice. *J Immunol* 2009;183(12):7870-6.
- Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998;17(1-4):1-52.
- Chopra R, Vakharia PP, Sacotte R, Patel N, Immaneni S, White T, et al. Relationship between EASI and SCORAD severity assessments for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140(6):1708-10 e1.
- Chu H. development and structure of skin. *dermatology in general medicine* 2012. p. 57-72.
- Clausen ML, Agner T. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. *Curr Probl Dermatol* 2016;49:38-46.
- Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* 2003;4(2):107-29.
- Collin M, Milne P. Langerhans cell origin and regulation. *Curr Opin Hematol* 2016;23(1):28-35.
- 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.
- Daines MO, Hershey GK. A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha-2 and their rapid mobilization by interferon-gamma. *J Biol Chem* 2002;277(12):10387-93.
- Dal Peraro M, van der Goot FG. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(2):77-92.
- Danese S, Peyrin-Biroulet L. Selective Tyrosine Kinase 2 Inhibition for Treatment of Inflammatory Bowel Disease: New Hope on the Rise. *Inflamm Bowel Dis* 2021;27(12):2023-30.
- 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.
- David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 2017;1027:21-37.
- David M, Ford D, Bertoglio J, Maizel AL, Pierre J. Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene* 2001;20(46):6660-8.
- De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol* 2009;129(1):14-30.

- De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):773-86 e1-7.
- 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 E, 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(4):179-83.
- De Vuyst E, Salmon M, Evrard C, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:119.
- Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell* 2007;18(9):3607-19.
- 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.
- 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.
- Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, Neben TY, Finnerty H, Henderson SL, et al. The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 1998;161(5):2317-24.
- Drucker AM, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Eczema and subsequent suicide: a matched case-control study. *BMJ Open* 2018;8(11):e023776.
- Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(12):3471-80.
- Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergol Int* 2018;67(1):3-11.
- Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 2007;29(1):3-14.
- Elias PM. Stratum corneum acidification: how and why? *Exp Dermatol* 2015;24(3):179-80.
- Elias PM, Steinhoff M. "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008;128(5):1067-70.
- Elmariah SB, Lerner EA. The missing link between itch and inflammation in atopic dermatitis. *Cell* 2013;155(2):267-9.
- Evora AS, Adams MJ, Johnson SA, Zhang Z. Corneocytes: Relationship between Structural and Biomechanical Properties. *Skin Pharmacol Physiol* 2021;34(3):146-61.
- Evrard C, Faway E, De Vuyst E, Svensek 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 Innov* 2021a;1(4):100054.
- Evrard C, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Epidermal Hyaluronan in Barrier Alteration-Related Disease. *Cells* 2021b;10(11).
- 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.
- Feingold KR. Lamellar bodies: the key to cutaneous barrier function. *J Invest Dermatol* 2012;132(8):1951-3.

- Ferreira S, Guttman-Yassky E, Torres T. Selective JAK1 Inhibitors for the Treatment of Atopic Dermatitis: Focus on Upadacitinib and Abrocitinib. *Am J Clin Dermatol* 2020;21(6):783-98.
- Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, Geissler EK, Schlitt HJ, Strober W. IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 2008;135(6):2003-13, 13 e1-7.
- Formentini A, Braun P, Fricke H, Link KH, Henne-Bruns D, Kornmann M. Expression of interleukin-4 and interleukin-13 and their receptors in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2012;27(10):1369-76.
- Forsdyke DR. Lymphocyte repertoire selection and intracellular self/non-self-discrimination: historical overview. *Immunol Cell Biol* 2015;93(3):297-304.
- 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.
- Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK. A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2009;69(22):8678-85.
- Fujisawa T, Joshi BH, Puri RK. IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13Ralpha2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer. *Int J Cancer* 2012;131(2):344-56.
- Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci* 2013;72(1):3-8.
- Furumoto Y, Gadina M. The arrival of JAK inhibitors: advancing the treatment of immune and hematologic disorders. *BioDrugs* 2013;27(5):431-8.
- Gahbauer S, Bockmann RA. Membrane-Mediated Oligomerization of G Protein Coupled Receptors and Its Implications for GPCR Function. *Front Physiol* 2016;7:494.
- Galli SJ, Gaudenzio N, Tsai M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu Rev Immunol* 2020;38:49-77.
- Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 2012;12(7):503-16.
- Gavrilova T. Immune Dysregulation in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Dermatitis* 2018;29(2):57-62.
- Girolomoni G, de Bruin-Weller M, Aoki V, Kabashima K, Deleuran M, Puig L, et al. Nomenclature and clinical phenotypes of atopic dermatitis. *Ther Adv Chronic Dis* 2021;12:20406223211002979.
- 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.
- Graber P, Gretener D, Herren S, Aubry JP, Elson G, Poudrier J, et al. The distribution of IL-13 receptor alpha1 expression on B cells, T cells and monocytes and its regulation by IL-13 and IL-4. *Eur J Immunol* 1998;28(12):4286-98.
- Gruber R, Janecke AR, Fauth C, Utermann G, Fritsch PO, Schmuth M. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet* 2007;15(2):179-84.
- Guerrero-Aspizua S, Carretero M, Conti CJ, Del Rio M. The importance of immunity in the development of reliable animal models for psoriasis and atopic dermatitis. *Immunol Cell Biol* 2020;98(8):626-38.

- Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2012;2(3):1819-52.
- 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.
- Guttman-Yassky E, Blauvelt A, Eichenfield LF, Paller AS, Armstrong AW, Drew J, et al. Efficacy and Safety of Lebrikizumab, a High-Affinity Interleukin 13 Inhibitor, in Adults With Moderate to Severe Atopic Dermatitis: A Phase 2b Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 2020;156(4):411-20.
- Guttman-Yassky E, Teixeira HD, Simpson EL, Papp KA, Pangan AL, Blauvelt A, et al. Once-daily upadacitinib versus placebo in adolescents and adults with moderate-to-severe atopic dermatitis (Measure Up 1 and Measure Up 2): results from two replicate double-blind, randomised controlled phase 3 trials. *Lancet* 2021;397(10290):2151-68.
- Hadi HA, Tarmizi AI, Khalid KA, Gajdacs M, Aslam A, Jamshed S. The Epidemiology and Global Burden of Atopic Dermatitis: A Narrative Review. *Life (Basel)* 2021;11(9).
- Halvorsen JA, Lien L, Dalgard F, Bjertness E, Stern RS. Suicidal ideation, mental health problems, and social function in adolescents with eczema: a population-based study. *J Invest Dermatol* 2014;134(7):1847-54.
- Hamilton JD, Harel S, Swanson BN, Brian W, Chen Z, Rice MS, et al. Dupilumab suppresses type 2 inflammatory biomarkers across multiple atopic, allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2021;51(7):915-31.
- Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma. *Cell* 2021;184(6):1469-85.
- Hanel KH, Cornelissen C, Luscher B, Baron JM. Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci* 2013;14(4):6720-45.
- Hanifin JM, Baghoomian W, Grinich E, Leshem YA, Jacobson M, Simpson EL. The Eczema Area and Severity Index-A Practical Guide. *Dermatitis* 2022;33(3):187-92.
- Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M, Yi T, Williams BR. Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 1998;273(51):33893-6.
- 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.
- He CH, Lee CG, Dela Cruz CS, Lee CM, Zhou Y, Ahangari F, et al. Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor alpha2. *Cell Rep* 2013;4(4):830-41.
- He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021;6(1):425.
- Hennies HC, Poumay Y. Skin Disease Models In Vitro and Inflammatory Mechanisms: Predictability for Drug Development. *Handb Exp Pharmacol* 2021;265:187-218.
- Henry J, Hsu CY, Haftek M, Nachat R, de Koning HD, Gardinal-Galera I, et al. Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *FASEB J* 2011;25(5):1567-76.
- Hong CH, Chang KL, Wang HJ, Yu HS, Lee CH. IL-9 induces IL-8 production via STIM1 activation and ERK phosphorylation in epidermal keratinocytes: A plausible mechanism of IL-9R in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2015;78(3):206-14.
- 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 ss-Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. *J Invest Dermatol* 2016;136(3):631-9.

- Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):157-67.
- Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):402.
- Huang XL, Wang YJ, Yan JW, Wan YN, Chen B, Li BZ, et al. Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. *Inflamm Res* 2015;64(3-4):151-9.
- 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.
- Hussein YM, Ahmad AS, Ibrahim MM, Elsherbeny HM, Shalaby SM, El-Shal AS, et al. Interleukin 13 receptors as biochemical markers in atopic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21(2):101-7.
- Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol* 1998;7(1):1-10.
- Iwaszko M, Bialy S, Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells* 2021;10(11).
- Jensen JM, Folster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, et al. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2004;122(6):1423-31.
- Jia L, Zhang Y, Pu F, Yang C, Yang S, Yu J, et al. Pseudogene AK4P1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression through relieving miR-375-mediated YAP1 degradation. *Aging (Albany NY)* 2022;14(4):1983-2003.
- Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol* 2018;9:888.
- Kamiya S, Ikegami I, Yanagi M, Takaki H, Kamekura R, Sato T, et al. Functional Interplay between IL-9 and Peptide YY Contributes to Chronic Skin Inflammation. *J Invest Dermatol* 2022.
- 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.
- Kamsteeg M, Zeeuwen PL, de Jongh GJ, Rodijk-Olthuis D, Zeeuwen-Franssen ME, van Erp PE, et al. Increased expression of carbonic anhydrase II (CA II) in lesional skin of atopic dermatitis: regulation by Th2 cytokines. *J Invest Dermatol* 2007;127(7):1786-9.
- Kapoor MS, GuhaSarkar S, Banerjee R. Stratum corneum modulation by chemical enhancers and lipid nanostructures: implications for transdermal drug delivery. *Ther Deliv* 2017;8(8):701-18.
- Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 2001a;97(9):2673-9.
- Kawakami K, Takeshita F, Puri RK. Identification of distinct roles for a dileucine and a tyrosine internalization motif in the interleukin (IL)-13 binding component IL-13 receptor alpha 2 chain. *J Biol Chem* 2001b;276(27):25114-20.
- Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, et al. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(6):1538-46 e6.
- Kezic S, Novak N, Jakasa I, Jungersted JM, Simon M, Brandner JM, et al. Skin barrier in atopic dermatitis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014;19(3):542-56.
- Khoo SK, Zhang G, Backer V, Porsbjerg C, Nepper-Christensen S, Creegan R, et al. Associations of a novel IL4RA polymorphism, Ala57Thr, in Greenlander Inuit. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(3):627-34.

- Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods* 2015;12(3):237-43, 1 p following 43.
- Kim MN, Lee KE, Hong JY, Heo WI, Kim KW, Kim KE, et al. Involvement of the MAPK and PI3K pathways in chitinase 3-like 1-regulated hyperoxia-induced airway epithelial cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421(4):790-6.
- Kim Y, Lim KM. Skin barrier dysfunction and filaggrin. *Arch Pharm Res* 2021;44(1):36-48.
- Kioi M, Kawakami K, Puri RK. Mechanism of action of interleukin-13 antagonist (IL-13E13K) in cells expressing various types of IL-4R. *Cell Immunol* 2004;229(1):41-51.
- Kirschner N, Brandner JM. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1257:158-66.
- Koch PJ, Roop DR. The role of keratins in epidermal development and homeostasis--going beyond the obvious. *J Invest Dermatol* 2004;123(5):x-xi.
- Kolarsick AJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 2011;3(4):203-13.
- Kurgonaite K, Gandhi H, Kurth T, Pautot S, Schwille P, Weidemann T, et al. Essential role of endocytosis for interleukin-4-receptor-mediated JAK/STAT signalling. *J Cell Sci* 2015;128(20):3781-95.
- Kwak EJ, Hong JY, Kim MN, Kim SY, Kim SH, Park CO, et al. Chitinase 3-like 1 drives allergic skin inflammation via Th2 immunity and M2 macrophage activation. *Clin Exp Allergy* 2019;49(11):1464-74.
- Labib A, Ju T, Yosipovitch G. Managing Atopic Dermatitis with Lebrikizumab - The Evidence to Date. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2022;15:1065-72.
- Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet* 2020;396(10247):345-60.
- LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 2008;132(2):259-72.
- Larsen L, Ropke C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 2002;110(12):833-44.
- Le Lamer M, Pellerin L, Reynier M, Cau L, Pendaries V, Leprince C, et al. Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis. *Biol Chem* 2015;396(11):1163-79.
- Lee J, Kim B, Chu H, Zhang K, Kim H, Kim JH, et al. FABP5 as a possible biomarker in atopic march: FABP5-induced Th17 polarization, both in mouse model and human samples. *EBioMedicine* 2020;58:102879.
- Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int* 2013;62(2):151-61.
- 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.
- Liang Y, Chang C, Lu Q. The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016;51(3):315-28.
- Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(4):552-62.
- Lloyd CM, Snelgrove RJ. Type 2 immunity: Expanding our view. *Sci Immunol* 2018;3(25).
- Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2017;25(3):283-9.
- Lowa A, Jevtic M, Gorreja F, Hedtrich S. Alternatives to animal testing in basic and preclinical research of atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2018;27(5):476-83.

- Margolis DJ, Apter AJ, Gupta J, Hoffstad O, Papadopoulos M, Campbell LE, et al. The persistence of atopic dermatitis and filaggrin (FLG) mutations in a US longitudinal cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(4):912-7.
- Marsella R, De Benedetto A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. *Vet Sci* 2017;4(3).
- Marsella R, Girolomoni G. Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *J Invest Dermatol* 2009;129(10):2351-7.
- Mascre G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Brohee S, Sotiropoulou PA, et al. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 2012;489(7415):257-62.
- Matsumoto K, Morita H, Nakae S. New insights into human atopic dermatitis provided by mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 2021;148(3):722-4.
- McCormick SM, Heller NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine* 2015;75(1):38-50.
- Milstone LM. Epidermal desquamation. *J Dermatol Sci* 2004;36(3):131-40.
- Minner F, Herphelin F, Poumay Y. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol* 2010;585:71-82.
- Minton K. What 'drives' IL-4 versus IL-13 signalling? *Nature Reviews Immunology* 2008;8(3):167-.
- 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(2):100018.
- Morinobu A. JAK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunol Med* 2020;43(4):148-55.
- 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.
- Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, Duschl A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592(3):237-50.
- Murata T, Obiri NI, Puri RK. Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors (review). *Int J Mol Med* 1998;1(3):551-7.
- Murota H, Lingli Y, Katayama I. Periostin in the pathogenesis of skin diseases. *Cell Mol Life Sci* 2017;74(23):4321-8.
- Nakashima C, Yanagihara S, Otsuka A. Innovation in the treatment of atopic dermatitis: Emerging topical and oral Janus kinase inhibitors. *Allergol Int* 2022;71(1):40-6.
- Namrata K, Bai B-X. Role of Tight Junctions and Their Protein Expression in Atopic Dermatitis. *International Journal of Dermatology and Venereology* 2021;4:40-4.
- Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 1999;31(1):5-19.
- Niehues H, Smits JPH, Rodijk-Olthuis D, Schalkwijk J, van den Bogaard EH. Keratinocyte Proliferation and Differentiation on IL-9 Stimulation: An Explorative In vitro Study. *Acta Derm Venereol* 2017;97(6):741-2.
- Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Ogawa H. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp Dermatol* 2017;26(11):989-98.
- Nocchi S, Bjorklund S, Svensson B, Engblom J, Ruzgas T. Electrochemical monitoring of native catalase activity in skin using skin covered oxygen electrode. *Biosens Bioelectron* 2017;93:9-13.

- Nomoto K, Itaya Y, Watanabe K, Yamashita T, Okazaki T, Tokudome Y. Epidermal permeability barrier function and sphingolipid content in the skin of sphingomyelin synthase 2 deficient mice. *Exp Dermatol* 2018;27(8):827-32.
- Nowak K, Linzner D, Thrasher AJ, Lambert PF, Di WL, Burns SO. Absence of gamma-Chain in Keratinocytes Alters Chemokine Secretion, Resulting in Reduced Immune Cell Recruitment. *J Invest Dermatol* 2017;137(10):2120-30.
- O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(4):689-93.
- O'Toole M, Legault H, Ramsey R, Wynn TA, Kasaian MT. A novel and sensitive ELISA reveals that the soluble form of IL-13R-alpha2 is not expressed in plasma of healthy or asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2008;38(4):594-601.
- Obiri NI, Murata T, Debinski W, Puri RK. Modulation of interleukin (IL)-13 binding and signaling by the gamma chain of the IL-2 receptor. *J Biol Chem* 1997;272(32):20251-8.
- Oh MH, Oh SY, Yu J, Myers AC, Leonard WJ, Liu YJ, et al. IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 2011;186(12):7232-42.
- 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.
- Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci* 2015;16(10):25476-501.
- Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, de Waard-van der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol* 2007;157(4):645-8.
- Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci* 2009;34(9):453-63.
- Paller AS, Siegfried EC, Thaci D, Wollenberg A, Cork MJ, Arkwright PD, et al. Efficacy and safety of dupilumab with concomitant topical corticosteroids in children 6 to 11 years old with severe atopic dermatitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. *J Am Acad Dermatol* 2020;83(5):1282-93.
- Paller AS, Spergel JM, Mina-Osorio P, Irvine AD. The atopic march and atopic multimorbidity: Many trajectories, many pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143(1):46-55.
- 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.
- Papp K, Szepietowski JC, Kircik L, Toth D, Eichenfield LF, Leung DYM, et al. Efficacy and safety of ruxolitinib cream for the treatment of atopic dermatitis: Results from 2 phase 3, randomized, double-blind studies. *J Am Acad Dermatol* 2021;85(4):863-72.
- 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.
- Parmentier JM, Voss J, Graff C, Schwartz A, Argiriadi M, Friedman M, et al. In vitro and in vivo characterization of the JAK1 selectivity of upadacitinib (ABT-494). *BMC Rheumatol* 2018;2:23.
- Patrick GJ, Archer NK, Miller LS. Which Way Do We Go? Complex Interactions in Atopic Dermatitis Pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2021;141(2):274-84.
- 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.

- Plager DA, Leontovich AA, Henke SA, Davis MD, McEvoy MT, Sciallis GF, 2nd, et al. Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp Dermatol* 2007;16(1):28-36.
- Plugis NM, Weng N, Zhao Q, Palanski BA, Maecker HT, Habtezion A, et al. Interleukin 4 is inactivated via selective disulfide-bond reduction by extracellular thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115(35):8781-6.
- Popovic B, Breed J, Rees DG, Gardener MJ, Vinall LM, Kemp B, et al. Structural Characterisation Reveals Mechanism of IL-13-Neutralising Monoclonal Antibody Tralokinumab as Inhibition of Binding to IL-13Ralpha1 and IL-13Ralpha2. *J Mol Biol* 2017;429(2):208-19.
- 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 in vitro studies. *Arch Dermatol Res* 2004;296(5):203-11.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17(12):1063-72.
- Puar N, Chovatiya R, Paller AS. New treatments in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2021;126(1):21-31.
- Radi G, Simonetti O, Rizzetto G, Diotallevi F, Molinelli E, Offidani A. Baricitinib: The First Jak Inhibitor Approved in Europe for the Treatment of Moderate to Severe Atopic Dermatitis in Adult Patients. *Healthcare (Basel)* 2021;9(11).
- Rahaman SO, Sharma P, Harbor PC, Aman MJ, Vogelbaum MA, Haque SJ. IL-13R(alpha)2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2002;62(4):1103-9.
- Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 2004;17 Suppl 1:43-8.
- Remitz A, De Pita O, Mota A, Serra-Baldrich E, Vakirlis E, Kapp A. Position statement: topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018;32(12):2074-82.
- 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).
- Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* 2019;8(6).
- Rocha MA, Bagatin E. Skin barrier and microbiome in acne. *Arch Dermatol Res* 2018;310(3):181-5.
- Salomon J, Matusiak L, Nowicka-Suszko D, Szepietowski JC. Chitinase-3-Like Protein 1 (YKL-40) Is a New Biomarker of Inflammation in Psoriasis. *Mediators Inflamm* 2017;2017:9538451.
- Sandilands A, O'Regan GM, Liao H, Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Watson RM, et al. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2006;126(8):1770-5.
- Scharschmidt TC. Establishing Tolerance to Commensal Skin Bacteria: Timing Is Everything. *Dermatol Clin* 2017;35(1):1-9.
- Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007;282(28):20059-63.
- Schmidt H, Braubach P, Schilpp C, Lochbaum R, Neuland K, Thompson K, et al. IL-13 Impairs Tight Junctions in Airway Epithelia. *Int J Mol Sci* 2019;20(13).
- Seshadri D, Kumaran MS, Kanwar AJ. Acantholysis revisited: back to basics. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2013;79(1):120-6.

- Shamloul G, Khachemoune A. An updated review of the sebaceous gland and its role in health and diseases Part 1: Embryology, evolution, structure, and function of sebaceous glands. *Dermatol Ther* 2021;34(1):e14695.
- Shankar A, McAlees JW, Lewkowich IP. Modulation of IL-4/IL-13 cytokine signaling in the context of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2022;150(2):266-76.
- Shi X, Nie F, Wang Z, Sun M. Pseudogene-expressed RNAs: a new frontier in cancers. *Tumour Biol* 2016;37(2):1471-8.
- Shiohara T, Hayakawa J, Mizukawa Y. Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *J Dermatol Sci* 2004;36(1):1-9.
- Shokry IM, Callanan JJ, Sousa J, Tao R. Rapid In Situ Hybridization using Oligonucleotide Probes on Paraformaldehyde-prefixed Brain of Rats with Serotonin Syndrome. *J Vis Exp* 2015(103).
- Silverberg JI, de Bruin-Weller M, Bieber T, Soong W, Kabashima K, Costanzo A, et al. Upadacitinib plus topical corticosteroids in atopic dermatitis: Week 52 AD Up study results. *J Allergy Clin Immunol* 2022;149(3):977-87 e14.
- Silverberg JI, Garg NK, Paller AS, Fishbein AB, Zee PC. Sleep disturbances in adults with eczema are associated with impaired overall health: a US population-based study. *J Invest Dermatol* 2015;135(1):56-66.
- Silverberg JI, Toth D, Bieber T, Alexis AF, Elewski BE, Pink AE, et al. Tralokinumab plus topical corticosteroids for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: results from the double-blind, randomized, multicentre, placebo-controlled phase III ECZTRA 3 trial. *Br J Dermatol* 2021;184(3):450-63.
- Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, Beck LA, Blauvelt A, Cork MJ, et al. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2016;375(24):2335-48.
- Simpson EL, Paller AS, Siegfried EC, Boguniewicz M, Sher L, Gooderham MJ, et al. Efficacy and Safety of Dupilumab in Adolescents With Uncontrolled Moderate to Severe Atopic Dermatitis: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 2020;156(1):44-56.
- Sivaprasad U, Warriar MR, Gibson AM, Chen W, Tabata Y, Bass SA, et al. IL-13 α 2 has a protective role in a mouse model of cutaneous inflammation. *J Immunol* 2010;185(11):6802-8.
- Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(1 Suppl):S2-8.
- Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 2006;38(3):337-42.
- Smits JPH, Meesters LD, Maste BGW, Zhou H, Zeeuwen P, van den Bogaard EH. CRISPR-Cas9Based Genomic Engineering in Keratinocytes: From Technology to Application. *JID Innov* 2022;2(2):100082.
- 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.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S73-80.
- Streit D, Schleiff E. The Arabidopsis 2'-O-Ribose-Methylation and Pseudouridylation Landscape of rRNA in Comparison to Human and Yeast. *Front Plant Sci* 2021;12:684626.
- Swaney MH, Kalan LR. Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. *Infect Immun* 2021;89(4).

- Tabata Y, Khurana Hershey GK. IL-13 receptor isoforms: breaking through the complexity. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007;7(5):338-45.
- Tanei R. Atopic Dermatitis in Older Adults: A Review of Treatment Options. *Drugs Aging* 2020;37(3):149-60.
- Thibodeaux Q, Smith MP, Ly K, Beck K, Liao W, Bhutani T. A review of dupilumab in the treatment of atopic diseases. *Hum Vaccin Immunother* 2019;15(9):2129-39.
- Tissot FS, Boulter E, Estrach S, Feral CC. The body's tailored suit: Skin as a mechanical interface. *Eur J Cell Biol* 2016;95(11):475-82.
- Todorović V, Kligys KR, Dusek RL, R.Jones JC, Green KJ. Desmosomes and Hemidesmosomes. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2013:636-43.
- Totte JE, van der Feltz WT, Hennekam M, van Belkum A, van Zuuren EJ, Pasmans SG. Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 2016;175(4):687-95.
- Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016;5(3):119-36.
- Ul-Haq Z, Naz S, Mesaik MA. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016;32:3-15.
- Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Tsuji G, Furue K, Hashimoto-Hachiya A, et al. Scratching Counteracts IL-13 Signaling by Upregulating the Decoy Receptor IL-13Ralpha2 in Keratinocytes. *Int J Mol Sci* 2019;20(13).
- Vakulskas CA, Behlke MA. Evaluation and Reduction of CRISPR Off-Target Cleavage Events. *Nucleic Acid Ther* 2019;29(4):167-74.
- 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 den Oord JJ, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Distribution of interferon-gamma receptors in normal and psoriatic skin. *Pathol Res Pract* 1995;191(6):530-4.
- 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.
- van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841(3):295-313.
- Waickman AT, Park JY, Park JH. The common gamma-chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(2):253-69.
- Wajahat M, Bracken CP, Orang A. Emerging Functions for snoRNAs and snoRNA-Derived Fragments. *Int J Mol Sci* 2021;22(19).
- Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4(1):1.
- Westerberg R, Tvrdik P, Unden AB, Mansson JE, Norlen L, Jakobsson A, et al. Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J Biol Chem* 2004;279(7):5621-9.
- Witkoff B, Logas CM, Glick BP, Del Rosso JQ. JAK inhibitors in the treatment of atopic dermatitis. *Dermatological Reviews* 2022;3:20-8.
- Wollenberg A, Blauvelt A, Guttman-Yassky E, Worm M, Lynde C, Lacour JP, et al. Tralokinumab for moderate-to-severe atopic dermatitis: results from two 52-week, randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled phase III trials (ECZTRA 1 and ECZTRA 2). *Br J Dermatol* 2021;184(3):437-49.
- Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol* 2016;25(2):92-8.

- Woo SH, Lumpkin EA, Patapoutian A. Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends Cell Biol* 2015;25(2):74-81.
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Glaser R, Schroder JM. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS One* 2009;4(4):e5227.
- Xiao S, Lu Z, Steinhoff M, Li Y, Buhl T, Fischer M, et al. Innate immune regulates cutaneous sensory IL-13 receptor alpha 2 to promote atopic dermatitis. *Brain Behav Immun* 2021;98:28-39.
- Yaghmaie P, Koudelka CW, Simpson EL. Mental health comorbidity in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(2):428-33.
- Yao X, Zha W, Song W, He H, Huang M, Jazrawi E, et al. Coordinated regulation of IL-4 and IL-13 expression in human T cells: 3C analysis for DNA looping. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417(3):996-1001.
- Yasuo K. Implications of normal and disordered remodeling dynamics of corneodesmosomes in stratum corneum. *Dermatologica Sinica* 2015;33:58-63.
- Yokouchi M, Kubo A. Maintenance of tight junction barrier integrity in cell turnover and skin diseases. *Exp Dermatol* 2018;27(8):876-83.
- Yoshikawa M, Nakajima T, Tsukidate T, Matsumoto K, Iida M, Otori N, et al. TNF-alpha and IL-4 regulate expression of IL-13 receptor alpha2 on human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312(4):1248-55.
- Yuki T, Komiya A, Kusaka A, Kuze T, Sugiyama Y, Inoue S. Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing. *J Dermatol Sci* 2013;69(2):148-58.
- Yuki T, Tobiishi M, Kusaka-Kikushima A, Ota Y, Tokura Y. Impaired Tight Junctions in Atopic Dermatitis Skin and in a Skin-Equivalent Model Treated with Interleukin-17. *PLoS One* 2016;11(9):e0161759.
- Zeiser K, Hammel G, Kirchberger I, Traidl-Hoffmann C. Social and psychosocial effects on atopic eczema symptom severity - a scoping review of observational studies published from 1989 to 2019. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2021;35(4):835-43.
- Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* 2015;75(1):14-24.
- 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.