Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Laura Cau

le vendredi 6 janvier 2017

Titre :

Importance de la désimination
dans l'homéostasie de l'épiderme et du follicule pileux

École doctorale et discipline ou spécialité :
ED BSB : Biologie structurale et fonctionnelle

Unité de recherche :
UDEAR / U1056 Inserm - Université Toulouse 3 Paul Sabatier - FRE 3742 CNRS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Michel SIMON et Hidenari TAKAHARA

Jury :
Catherine GRILLON (Rapporteur)
Jérôme LAMARTINE (Rapporteur)
Marie-Hélène RATINAUD (Rapporteur)
Marie-Claire MECHIN (Examinateur)
Guy SERRE (Examinateur)
Michel SIMON (Examinateur)

“Il est absolument possible qu'au delà de ce que perçoivent nos sens, se cachent des mondes insoupçonnés.”

Albert Einstein

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à **Guy Serre** pour m'avoir accueillie dans les meilleures conditions au sein de son unité durant mon stage de master 2 puis durant ma thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et pour les encouragements que vous m'avez adressés. Merci aussi de m'avoir permis de partir plusieurs fois en congrès, en France et à l'étranger. Ceci m'a permis de faire des rencontres et de commencer à développer mon réseau, ce qui est essentiel pour ma carrière.

Je remercie L'**école doctorale Biologies-Santé-Biotechnologies** et le **ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** qui m'ont accordée une bourse de trois ans pour réaliser ma thèse.

Je remercie également chaleureusement la **Fondation SILAB-Jean Paufique**, qui m'a attribué un prix en 2014 afin de financer mon projet de thèse. Cette aide financière a rendu le déroulement de ma thèse extrêmement confortable.

J'adresse ensuite toute ma gratitude à **Catherine Grillon**, **Jérôme Lamartine** et **Marie-Hélène Ratinaud,** qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci pour votre investissement et pour la qualité de vos rapports, qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Merci à **Fabrice Dumas** et **Laurence Lamant**, les deux membres de mon comité de thèse, d'avoir pris le temps de m'accompagner durant cette thèse. Nos réunions annuelles ont chaque fois été très sympathiques.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde gratitude à **Michel Simon**, mon directeur de thèse, et à **Marie-Claire Méchin**, ma co-encadrante de thèse.

Michel, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de cette thèse. Merci d'avoir été toujours disponible, toujours présent, et d'avoir suivi pas à pas l'avancée de mes résultats. Merci aussi de m'avoir permis de voyager, au Japon et en Belgique, durant la première année de ma thèse. Ces expériences ont été un « un plus » qui me tenait à cœur et que vous m'avez accordé. Merci de m'avoir plusieurs fois incitée à passer des concours, écrire avec vous des demandes de financements et participer à des congrès. Tout cela a été très formateur. Enfin, merci pour vos encouragements et vos compliments.

Marie-Claire, un immense MERCI pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as pris sous ton aile et tu m'as accompagnée au quotidien pendant toutes ces années, partageant avec moi l'excitation des résultats ! (ou parfois la déception mais celle-ci on peut l'oublier) Merci pour les innombrables heures que tu as passées à m'inculquer la « science des PADs », les « secrets de l'épiderme », et surtout à me transmettre ta passion pour la recherche. Tu as toujours su positiver, m'encourager, me rassurer et me motiver, même dans les périodes où j'avais l'impression de ne pas réussir à avancer. Tu m'as toujours complimentée pour le travail que j'avais accompli, même quand les résultats escomptés n'étaient pas là, et cela m'a fait du bien. Tu as été une véritable petite maman pour moi ! C'est grâce à toi que mon master 2 puis ma thèse se sont si bien passés. Tu as toujours de très bonnes idées, scientifiquement très pertinentes et novatrices. Tu as été un véritable exemple pour moi et j'ai énormément appris auprès de toi. Je te remercie pour tout ce que tu as partagé avec moi.

Le trio que nous avons formé durant ces quatre années aura au final plutôt bien fonctionné ! Vous avez su m'encadrer juste comme il fallait, en m'accordant petit à petit plus d'autonomie et de liberté, tout en continuant à m'entourer. J'ai beaucoup grandi à vos côtés.

Je remercie aussi chaleureusement **Hidenari Takahara**, mon co-directeur de thèse, qui m'a accueillie durant deux mois dans son laboratoire, au Japon, durant ma première année de thèse. Merci de m'avoir reçue à bras ouverts et d'avoir tout mis en œuvre pour que j'aie tout le confort possible dès mon arrivée. Ce séjour fut une expérience très enrichissante, aussi bien au niveau professionnel qu'au niveau personnel. J'espère sincèrement vous revoir. Merci aussi à votre femme Masako et votre fille Mary pour les moments de convivialité que nous avons partagés.

Un grand merci aux autres membres de mon groupe de recherche, présents et passés : **Corinne Leprince**, **Valérie Pendaries**, **Caroles Pons**, **Carle Paul**, **Renan Destrade**, **Géraldine Gasc**, **Elise Gaspard**, **Marina Le Lamer**, **Marie Reynier** et **Laurence Pellerin**, pour tous ces moments passés ensemble et pour les discussions scientifiques, ou non scientifiques et parfois assez philosophiques, que j'ai pu avoir avec les uns et les autres durant ces années.

J'adresse un remerciement tout particulier à Carole, qui m'a appris l'art du western blot puis de la qPCR et qui a également contribué à ce travail de thèse. Travailler avec toi est toujours un plaisir. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta patience (car il faut en avoir pour s'y retrouver dans mon bazar…). Merci pour tes petites attentions qui réchauffent le cœur ! J'ai toujours la belle image de BarbaLaura affichée près de mon bureau.

Merci également à Renan qui m'a inculqué l'art (parfois abstrait) de l'histologie et qui m'a aussi bien fait rigoler et divertie durant les trop nombreux temps d'incubations.

Un grand merci à Valérie qui m'a appris à produire les épidermes reconstruits, outils clés de mes expériences de thèse. Merci aussi pour ta gentillesse.

Corinne, merci pour ta cool-attitude et ta gaîté. Tu apportes un peu de fraîcheur à l'équipe ! Merci aussi pour toutes les fois où tu m'as aidée sur le plan technique ou scientifique.

Elise, merci pour ta gentillesse et pour les discussions sur l'épanouissement personnel qu'on a pu avoir ensemble. On s'est découvert un peu tard mais c'est un plaisir de te revoir à chaque fois !

Enfin merci à Géraldine, avec qui j'ai travaillé ces derniers mois et qui a permis de bien faire avancer le projet « inhibiteur des PADs ». Merci pour ta gaîté et ton gros grain de folie ! Tous ces bons moments passés au labo et en dehors resteront de beaux souvenirs. Tu pars toi aussi vers de nouvelles aventures mais on continuera de se donner des nouvelles.

Enfin, un merci tout particulier à Laurence, Marie, Marina et Sarra, les autres « petites thésardes » du labo. Laurence, on ne s'est finalement pas côtoyé très longtemps au labo mais on s'est vite bien entendu. Merci pour tous ces chouettes moments et ces belles soirées passés ensemble au début de ma thèse, c'est toujours un grand plaisir de te revoir quand tu reviens des US. Merci aussi pour ce magnifique surnom : Chicot… que tu as transmis à Marina et Marie, et qui s'est par la suite (heureusement !) transformé en Kiko… Marie et Marina, vous avez été mes fidèles compagnons durant cette thèse. Merci pour touuuus ces bons moments partagés de discussion, de rire et de détente, aussi bien au labo qu'en dehors. Merci pour le saut en parapente ! C'était un super cadeau et le plus génial a été de passer ce beau week-end ensemble. Marie, tu as été mon exemple. J'ai toujours admiré ta rigueur. Et j'ai essayé au mieux de marcher dans tes pas (sauf pour ce qui est d'arriver tôt au labo, ça aurait été peine perdue…) Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés au cours de ces années et pour toutes les fois où tu as été là pour m'apaiser. Malgré quelques mois d'absence, tu auras finalement été à mes côtés jusqu'à la fin. Ton soutien aura été vraiment très important ! Marina, merci d'avoir toujours été là pour moi, même après ton départ du labo. La dynamique dans laquelle tu es maintenant est une belle leçon de vie ! Il y a des milliers de choses possibles à faire après la thèse et tu en es la preuve. Je te soutiens à fond dans tes projets. On n'est pas enfermé dans des cases, c'est extrêmement rassurant. Merci pour l'ouverture d'esprit que tu as pu m'apporter ces derniers temps.

Je tiens aussi à remercier les stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : **Martin Gachenot, Gabrielle Capin, Jérémy Santamaria** et **Candide Alioli**. Merci pour votre investissement qui a permis de faire avancer les projets plus vite ! Vous avez tous été supers !

Merci à tous les autres membres de l'Unité (présents et passés là aussi) : **Nathalie Jonca, Sabrina Belouaar, Anne Huchenq-Champagne, Patrick Aregui, Marion Roy, Carole Trzaska, Emilie Amblard, Catherine Bouchouata, Alicia Mallet, Sarra Zaafouri, Mélanie Pichery, Léonor Nogueira, Cyril Clavel, Géraldine Offer, Martin Cornillet, Mireille Sebbag, Florence Anquetil, Laurie Ceccato, Axel legue, Emilie**

Parra, Marianne Chabod, Céline Thomann, Michèle Allouche, Cyrielle Tricoire, Stéphane Galiacy, Margaux Grollier, Célia Zazo Seco, Tatiana Lupasco, Laure Buisson, Emeline Lhuillier, Guillaume Besin, Sophie Menager, Margaux Larrieu, Manon Blanc, Johanne Guéant, Brigitte Bernet, Thierry Thomas, Nicolas Borrot, Catherine Knodlseder et Roxane Vilarrupla. Merci à tous pour ces agréables moments de vie passés ensemble.

Merci à Anne de nous avoir aidées, Marie-Claire et moi, pour les prélèvements des souris déficientes en PAD3 et de nous avoir transmis un peu de son savoir-faire en expérimentation animale ; et merci à Patrick pour avoir réalisé le génotypage des souris.

Sabrina, merci pour ton humour, ta légèreté et ton côté rebelle. Y'a pas à dire, tu mets de l'animation dans le labo !

Nicolas (c'est marrant les mêmes mots que pour Sabrina me viennent…), merci pour ton humour et ton côté rebelle. Un sacré personnage !

Martin, Emilie, Alicia, Carole, Margaux, merci pour la bonne ambiance que vous avez apportée dans les locaux du temps où vous étiez là !

Ma petite Sarra, tu as eu une place très importante durant la deuxième moitié de ma thèse. C'est là qu'on s'est vraiment rapproché et j'ai découvert quelqu'un de super ! Merci pour tous ces bons moments partagés, de discussions sérieuses et surtout de rires et bavardages. C'est maintenant toi la prochaine et je suis sûre que tout se passera au mieux. On continuera de se voir et de se donner des nouvelles, j'espère. Et qui sait, peut-être qu'on finira par élever des brebis ensemble !

Je remercie également l'ensemble des membres des plateaux techniques qui ont été d'une aide précieuse pour le déroulement de mon projet de thèse. En particulier, merci à **Florence Capilla** du plateau d'histologie Genotoul Anexplo, à **Sophie Allart**, **Astrid Canivet** et **Danièle Daviaud** du plateau d'imagerie Genotoul TRI, à **Bruno Payre**, **Dominique Goudounèche** et **Isabelle Fourquaux** du CMEAB, à **Emeline Lhuillier** du plateau de Génomique Genotoul GeT-Purpan, et à **Laëtitia Trottereau** et **Alexandre Diet** du TAAM (Transgénèse et archivage d'animaux modèles, CNRS UPS44, Orléans).

Un grand merci à Genoskin et en particulier à **Pascal Descargues,** qui m'a permis d'avoir accès à des prélevements de peau à partir desquels j'ai isolé des kératinocytes primaires m'ayant servi pour l'ensemble de mes expériences de cultures cellulaires**.** Merci également à **Anthony David, Sandrine Kurdykowski** et **Claire Jardet**. Votre folie aura apporté beaucoup de gaîté dans le labo !

Je remercie aussi chaleureusement Synelvia, et en particulier **Alain Moga**, pour avoir effectué le dosage des dérivés d'acide aminé du FNH pour mon premier article.

Je souhaite ensuite remercier **Yves Poumay** et toute son équipe, qui m'ont chaleureusement accueilli une semaine parmi eux, pour « réapprendre » à produire les épidermes reconstruits. Ce fut une semaine très sympathique ! De plus, merci à Yves, sa femme Marie-Paule et sa fille Lucie, pour m'avoir accueillie une semaine chez eux et m'avoir fait découvrir un peu de la culture belge, toujours dans une ambiance très chaleureuse.

Je finirai par remercier ma famille et mes amis, en commençant par ma maman, qui est la seule à avoir réellement participé à ma thèse. Elle a relu à peu près tous les rapports que j'ai écrits durant ces quatre années passées au labo (rapport de M2, demandes de bourse et de prix, et surtout l'imposant manuscrit de thèse). Elle a corrigé d'innombrables fautes d'orthographe et de grammaire, et a même été jusqu'à lire une publication car elle ne comprenait pas le sens de mes mots !! (Ça parlait de probabilité et en tant que prof de maths, ma phrase mal formulée l'a fait tiquer…). A tous les autres : merci d'avoir fait semblant de vous intéresser à mon sujet de thèse, et parfois même de vous y être vraiment intéressés ! (un peu !?) Et surtout merci de m'avoir permis de m'aérer l'esprit : au quotidien à la coloc et lors de nombreuses virées en ville avec les colocs, les dîners entre cousins toulousains, les week-ends mémorables en famille ou entre amis, ou encore d'inoubliables vacances. Enfin merci à Guillaume qui, au bout d'un an et demi, aura réussi à prononcer correctement « peptidyl-arginine désiminase » !

Résumé

Les peptidyl-arginine désiminases (PADs) catalysent une modification post-traductionnelle, appelée désimination, qui correspond à la transformation des résidus arginine en résidus citrulline. À ce jour, leur rôle est encore mal compris, bien qu'elles aient été impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques. Dans l'épiderme et le follicule pileux, trois d'entre elles sont exprimées, les PAD1, 2 et 3. La désimination de la filaggrine (FLG), protéine essentielle de la différenciation épidermique, semble conduire à sa dissociation des filaments de kératines et permettre sa protéolyse totale. Les acides aminés libres ainsi générés sont nécessaires à la fonction de barrière que remplit la couche cornée, couche cellulaire la plus externe de l'épiderme. Dans le follicule pileux, la désimination de la trichohyaline (TCHH), protéine apparentée à la FLG, augmente sa solubilité et permet sa liaison covalente aux kératines par la transglutaminase 3 (TGase 3), ce qui participe à la formation de la tige pilaire. La description du rôle des PADs au cours de la différenciation des kératinocytes est cependant encore incomplète, et leurs implications dans les maladies de peau peu explorée.

L'objectif de mon travail de thèse a été de mieux comprendre le rôle des PADs dans le métabolisme de la FLG et, plus généralement, dans l'homéostasie de l'épiderme et du follicule pileux.

Tout d'abord, j'ai montré que la désimination de la FLG humaine par la PAD1 et/ou 3 est une étape majeure qui permet de réguler sa dégradation complète en fonction du taux d'humidité extérieure. Pour cela, j'ai utilisé comme modèle expérimental des épidermes reconstruits humains (ERHs). La diminution de l'humidité relative lors de leur production, de 95% à 30-50%, augmente la protéolyse de la FLG et la genèse des acides aminés correspondants. En parallèle, l'expression de la PAD1 et le taux de désimination de la FLG sont fortement accrus alors que ni l'expression ni l'activité des protéases impliquées dans cette protéolyse ne varient. De plus, le traitement d'ERHs pendant 24 heures avec un inhibiteur des PADs, le Cl-amidine, bloque en partie l'effet de la sécheresse sur le métabolisme de la FLG.

J'ai ensuite recherché si la désimination joue un rôle plus global au cours de la différenciation des kératinocytes. J'ai traité des ERHs avec différentes concentrations de Cl-amidine pendant 48 heures et analysé l'effet du traitement sur leur morphologie. L'inhibition de la désimination est dose-dépendante et non toxique. À la plus forte concentration, le Cl-amidine entraîne un amincissement de la couche cornée, une augmentation importante du nombre de cellules transitionnelles, et l'accumulation de mitochondries et de vésicules dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux. Ceci permet de proposer que la cornification, dernière étape de la différenciation kératinocytaire, est retardée. De plus, la protéine LC3B-II, marqueur des autophagosomes, étant plus fortement détectée dans les ERHs traités, les PAD1 et/ou 3 pourraient être impliquées dans le processus d'autophagie associé à la cornification.

Enfin, j'ai participé à un nouveau projet collaboratif qui a permis de découvrir l'origine d'une maladie génétique rare, le syndrome des cheveux incoiffables. Des mutations des gènes de la TCHH, de la PAD3 ou de la TGase 3 ont été identifiées dans 11 familles et sont responsables de ce syndrome. La mutation non-sens du gène de la TCHH aboutit à la synthèse, si elle a lieu, d'une forme très courte, probablement incapable d'interagir avec les kératines. Les mutations des gènes de la PAD3 et de la TGase 3 induisent des changements structuraux et une quasi-absence de l'activité des enzymes correspondantes. De plus, les souris dont le gène de la Pad3 a été inactivé présentent des anomalies de la forme des poils. Ces résultats ont permis de comprendre la physiopathologie de cette maladie des cheveux et ont prouvé que la PAD3 est essentielle à leur morphogenèse.

Abstract

Peptidylarginine deiminases (PADs) catalyze a post-translational modification, named deimination, corresponding to the transformation of arginine residues into citrulline. So far, their role is still poorly understood even if they have been associated with numerous physiological and pathological processes. In the epidermis and the hair follicle, three PADs are expressed, namely PAD1, 2 and 3. Deimination of filaggrin (FLG), a major protein of epidermal differentiation, would lead to its detachment from keratin filaments and allow its full proteolysis. The resulting free amino acids contribute to the barrier function of the cornified layer, the outmost cellular layer of the epidermis. In the hair follicle, deimination of trichohyalin (TCHH), a FLG-related protein, increases its solubility and improves its crosslinking by transglutaminase 3 (TGase 3) to keratins, contributing to the hair shaft formation. However, the function of PADs during keratinocyte differentiation is incompletely described and their involvements in skin diseases have been poorly investigated.

The objective of my work was to better understand the role of PADs in the metabolism of FLG, and more generally in the epidermis and hair follicle homeostasis.

First of all, I demonstrated that a major step in the metabolism of human FLG is its deimination by PAD1 and/or PAD3. This regulates its complete degradation according to the external humidity level. For this purpose, I used reconstructed human epidermis (RHEs) as an experimental model. Lowering relative humidity from 95 to 30-50% during RHE generation enhanced FLG proteolysis as well as the resulting amino acid amount. In parallel, PAD1 expression and FLG deimination were highly increased while the expression or activity of proteases known to target FLG did not vary. Moreover, treatment of RHEs during 24 hours with Cl-amidine, a PAD inhibitor, partially blocked the effect of dryness on FLG metabolism.

Then, I investigated whether deimination could play a more general role during keratinocyte differentiation. I treated RHEs with various concentrations of Cl-amidine during 48 hours and I analyzed the effect of treatments on the epidermis morphology. The inhibition of deimination was dose-dependent and not cytotoxic. At the strongest concentration, Cl-amidine was shown to cause thinning of the cornified layer, to highly increase the number of transitional cells and to induce accumulation of mitochondria and vesicles in the cytoplasm of granular keratinocytes. This suggested that cornification, the ultimate stage of keratinocyte differentiation, is slowed down by Cl-amidine treatment. Besides, as the autophagosome marker LC3B-II was up-regulated in Cl-amidine treated RHEs, PAD1 and/or PAD3 could be involved in the cornification-associated process of autophagy.

Finally, I participated in a new collaborative work that led to discover the cause of uncombable hair syndrome, a rare genetic disorder. Mutations of the genes encoding TCHH, PAD3 and TGase 3 were identified in 11 families and were shown to be responsible for the disease. The nonsense mutation in TCHH gene results in the synthesis, if any, of a very short protein, probably not able to interact with keratins. Mutations in PAD3 and TGase3 genes were shown to induce structural changes and almost total absence of activity of the corresponding enzymes. Moreover, examination of Pad3 deficient mice revealed alterations in the hair morphology. These results allowed a better understanding of this hair disease physiopathology and proved that PAD3 is essential for the hair shaft morphogenesis.

Table des matières

INTRODUCTION **1**

Avant-propos : La peau et ses annexes 4

A. La peau, les cheveux et les poils : bien plus que de simples organes 4

B. Structure de la peau 4

I. L'épiderme, une barrière multifonctionnelle 7

A. Les différents types cellulaires de l'épiderme 8

1. Les mélanocytes 8

2. Les cellules de Langerhans 8

3. Les cellules de Merkel 9

4. Les kératinocytes 9

B. Structure pluristratifiée de l'épiderme 10

1. La couche basale 10

2. La couche épineuse 10

3. La couche granuleuse 11

4. La couche cornée 12

C. Fonctions de barrière de l'épiderme 13

1. Une barrière presque imperméable 13

2. Une barrière résistante aux stress mécaniques 14

3. Une barrière antioxydante 14

4. Une barrière photoprotectrice 15

5. Une barrière antimicrobienne 15

D. Homéostasie de l'épiderme 16

1. Cellules souches, prolifération et auto-renouvellement 16

2. La régulation de la différenciation 18

a. Le complexe de différenciation épidermique 18

b. Facteurs de transcription 19
c. Le calcium 20
d. La vitamine D 22
3. La desquamation 22
E. La cornification : étape ultime de la différenciation épidermique 24
1. Formation de la matrice fibreuse intracornéocytaire de kératines 24
a. Les kératines de l'épiderme 24
b. Formation de la matrice fibreuse 26
2. Formation de l'enveloppe cornée 27
a. Les composants protéiques de l'enveloppe cornée 27
b. Les transglutaminases épidermiques 28
c. Les étapes de la formation de l'enveloppe cornée 29
3. Mise en place des lipides intercornéocytaires 30
a. Composition et origine des lipides intercornéocytaires 30
b. Organisation des lamellae lipidiques 31
4. Transformation des desmosomes en cornéodesmosomes 33
5. Production du facteur naturel d'hydratation (FNH) 34
a. Origine et composition du FNH 34
b. Rôle du FNH 36

II. La filaggrine 38
A. Une protéine de la famille des « S100 fused-type proteins » 38
B. Structure et régulation du gène de la filaggrine 40
C. La filaggrine et son métabolisme 42
1. Structure de la filaggrine 42
2. Les différentes étapes du métabolisme de la filaggrine 43
3. Kinases et phosphatases impliquées dans la phosphorylation/déphosphorylation de la proFLG 45
4. Protéases impliquées dans le clivage du domaine amino-terminal 46

5. Protéases impliquées dans la protéolyse de la profilaggrine 47

6. Protéases impliquées dans la dégradation de la filaggrine en acides aminés 50

7. Régulation de la protéolyse de la filaggrine par le taux d'humidité ambiante 51

D. Implications physiopathologiques de la filaggrine 51

1. Modèles déficients en filaggrine 52

a. Modèle murin 52

b. Epidermes reconstruits humains 52

2. L'ichtyose vulgaire 53

3. La dermatite atopique 54

4. Les multiples fonctions de la filaggrine 57

a. Rôles des domaines amino- et carboxy-terminaux de la profilaggrine 58

b. Rôle des monomères de FLG 59

III. Le follicule pileux et la trichohyaline 61

A. Structure du follicule pileux 61

B. Le cycle pilaire 63

C. Les grandes étapes de la différenciation du follicule pileux 65

D. La trichohyaline 69

1. Structure de la trichohyaline 69

2. Expression et métabolisme de la trichohyaline dans le follicule pileux 70

3. Implications physiopathologiques de la trichohyaline 71

a. Trichohyaline et forme du cheveu 71

b. Trichohyaline et alopecia areata 72

IV. Les peptidyl-arginine desiminases 73

A. De la citrulline libre à la découverte des peptidyl-arginine désiminases 73

B. La réaction de désimination catalysée par les PADs et ses conséquences 74

C. Caractéristiques géniques, biochimiques et structurales des PADs 75

1. Les gènes *PADI* codant les PADs 75

2. Structure des PADs 76

3. Mécanisme catalytique et spécificité d'action des PADs 80

a. Mécanisme catalytique des PADs 80

b. Spécificité d'action des PADs 81

D. Distribution tissulaire et cellulaire des PADs 83

E. Régulation de l'expression et de l'activité des PADs 85

1. Régulation de l'expression des PADs 85

2. Régulation de l'activité des PADs 88

F. Implications physiologiques et pathologiques des PADs dans la peau 90

1. Rôles physiologiques des PADs dans l'épiderme 90

a. Substrats épidermiques des PADs 90

b. Expression et activité des PADs dans l'épiderme 92

2. Rôles physiologiques des PADs dans le follicule pileux 94

a. Substrats des PADs dans le follicule pileux 94

b. Expression différentielle des PADs dans le follicule pileux 95

3. PADs et pathologies cutanées 97

G. Autres implications physiologiques et pathologiques des PADs 97

1. Rôles physiologiques des PADs 97

a. Homéostasie du système nerveux central 97

b. Ovogenèse et embryogenèse 99

c. Régulation de l'expression génique et pluripotence 100

d. Apoptose et autophagie 102

e. Formation des NETs et autres rôles dans l'inflammation 104

2. Implications des PADs en pathologies 105

a. Polyarthrite rhumatoïde 105

b. Sclérose en plaques et autres maladies neurodégénératives 108

c. Cancers 110

H. Inhibiteurs des PADs 111

OBJECTIFS **115**

RESULTATS EXPERIMENTAUX **119**

Article n°1 - La protéolyse de la filaggrine humaine est contrôlée, via sa désimination, par le taux d'humidité ambiante 121

Article n°2 - L'inhibition des peptidyl-arginine désiminases par le Cl-amidine ralentit la cornification et perturbe le flux autophagique dans un modèle d'épiderme humain 149

Article n°3 - Des mutations des gènes codant pour la peptidyl-arginine désiminase 3, la transglutaminase 3 et la trichohyaline sont responsables du syndrome des cheveux incoiffables 167

DISCUSSION ET PERPSECTIVES **205**

I. Rôle majeur de la désimination dans le contrôle du métabolisme de la filaggrine par le taux d'humidité ambiante 208

A. Influence du taux d'humidité ambiante sur la fonction de barrière de l'épiderme humain…. 208

B. Influence du taux d'humidité ambiante sur le métabolisme de la FLG humaine 209

C. Influence du taux d'humidité ambiante sur la désimination dans l'épiderme humain……. 212

D. Rôle de la désimination dans le contrôle du métabolisme de la FLG 215

E. Apport de ces données pour la compréhension de la physiologie épidermique et des maladies cutanées 216

II. Rôle potentiel de la désimination dans l'autophagie epidermique 217

A. Inhibition de l'activité des PADs par le Cl-amidine *in vitro* et dans les épidermes reconstruits humains 218

B. Rôle potentiel des PADs dans la régulation de la cornification 218

C. Rôle potentiel des PADs dans la régulation de l'autophagie épidermique 219

III. Implication de la peptidyl-arginine désiminase 3 dans le métabolisme de la trichohyaline et dans le syndrome des cheveux incoiffables 223

A. Identification de mutations responsables du syndrome des cheveux incoiffables 224

1. Mutation touchant le gène codant la trichohyaline 224

2. Mutation touchant le gène codant la transglutaminase 3 224

3. Mutations touchant le gène codant la peptidyl-arginine désiminase 3 225

B. Rôle essentiel des trois acteurs de la cascade peptidyl-arginine désiminase 3 – trichohyaline – transglutaminase 3 dans la morphologie de la tige pilaire 227

IV. Perspectives 229

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 235

ANNEXES 255

Annexe 1 257

Annexe 2 260

Annexe 3 261

Annexe 4 263

Liste des abréviations

ACPA	"anti-citrullinated proteins autoantibodies"
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP	adénosine monophosphate
AP-1	"activating protein 1"
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ATF	"activating transcription factor"
ATG	"autophagy-related gene/protein"
BAA	N-α-benzoyl L-arginine amide ou Bz-L-Arg-O-NH_2 (substrats des PADs)
BAEE	N-α-benzoyl L-arginine ethyl ester ou Bz-L-Arg-O-Et (substrat synthétique de référence des PADs)
BNIP3	"BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3"
Brt1	"bright trichomes 1"
CAP1/Prrs8	"channel-activating protease 1/protease serine S1 family member 8"
CaR	récepteur transmembranaire sensible au calcium
CaRE	élément de réponse au calcium
CARM1	"coactivator associated arginine methyltransferase 1"
CDSN	Cornéodesmosine
CK2	caséine kinase II
Cl-amidine	N-α-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide
CXCL	"chemokine (C-X-C motif) ligand"
CXCR	"chemokine (C-X-C motif) receptor"
DAG	diacylglycérol
Dlx3	"distal-less homeobox 3 protein"
ROS	dérivés réactif de l'oxygène ou « reactive oxygen species »
EDC	complexe de différenciation épidermique ou "epidermal differentiation complex"
ELA2	élastase 2
ERH	épiderme reconstruit humain
ERα	récepteur aux oestrogènes alpha
Ets	"epithelium specific transcription factor"
ExAC	"exome aggregation consortium"
FLG/Flg	Filaggrine
FNH	facteur naturel d'hydratation
GFAP	protéine fibrillaire acide gliale ou "glial fibrillary acidic protein"
HDAC	histone déacétylase
HIF	facteur induit par l'hypoxie
HLA-DR	"human leukocyte antigen - antigen D related"
IL	Interleukine
IP3	inositol-1,4,5-triphosphate
JAK	janus kinase
kb	Kilobase
KLK	Kallikréines

LAMP	"lysosome-associated membrane glycoprotein"
LC3	"microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3"
LCE	"late cornified envelope protein"
LEKTI	"lympho-epithelial kazal-type-related inhibitor"
MAP	"mitogen-activated protein"
MBP	protéine basique de la myéline ou "myelin basic protein"
MET	"macrophage extracellular traps"
MZF1	"myeloid zinc finger 1"
NET	"neutrophil extracellular trap"
NF-kB	"nuclear transcriptionfactor-kappa B"
NF-Y	"nuclear transcription factor Y"
PACE	"paired basic amino acid cleaving enzyme"
PADI/Padi - PAD/Pad	peptidyl-arginine désiminase
pb	paire de bases
PCA	acide pyrrolidine carboxylique
PEP1	"profilaggrine endopeptidase 1"
pH	potentiel hydrogen
PIE	"*PADI* intergenic enhancer"
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKC	protéine kinase C
PMRT	"protein arginine methyltransferase"
POU	"pit-oct-unc"
PP2A	sérine/thréonine phosphatase de type 2A
proFLG/proFlg	Profilaggrine
pS2	préséniline 2
PTPN22	“protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22”
RXR	récepteur X des rétinoïdes
SASPase	"skin aspatatic protease"
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium
SESN2	sestrine 2
SFTP	"S100 fused-type protein"
shRNA	"small hairpin RNA"
siRNA	"small interfering RNA"
Sp1	"specificity protein 1"
SPINK5	"serine protease inhibitor, kazal-type 5"
SPRR	"small proline-rich protein"
TCHH	Trichohyaline
TEWL	perte en eau trans-épidermique ou "transepidermal water loss"
TGM - TGase/Tgase	Transglutaminase
T_H	lymphocyte T "helper"
TNF-α	“tumor necrosis factor alpha”
UCA	acide urocanique
VDR	récepteur nucléaire de la vitamine D
VDRE	élément de réponse à la vitamine D

Tables des illustrations

Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique de la peau. 5

Figure 2 : Représentation schématique de l'épiderme. 7

Figure 3 : Distribution des mélanocytes et de la mélanine dans l'épiderme 8

Figure 4 : Distribution des cellules de Langerhans dans l'épiderme 9

Figure 5 : Etroite connexion entre cellules de Merkel et terminaisons nerveuses afférentes. 9

Figure 6 : Aspect "épineux" et desmosomes de la couche épineuse observés en microscopie électronique à transmission.. 10

Figure 7 : Granule de kératohyaline, corps lamellaire et jonction serrée, trois structures spécifiques de la couche granuleuse observées en microscopie électronique à transmission. 11

Figure 8 : Enveloppe cornée, cornéodesmosomes, *lamellae* lipidiques intercornéocytaires et matrice fibreuse intracornéocytaire observés en microscopie électronique à transmission. 12

Figure 9 : Fonctions de barrière de l'épiderme 13

Figure 10 : Représentation schématique des deux modèles de renouvellement de l'épiderme 17

Figure 11 : Représentation schématique du complexe de différenciation épidermique humain 18

Figure 12 : Expression des facteurs de transcription AP-1 dans l'épiderme 19

Figure 13: Régulation de la différenciation épidermique par synergie entre calcium et vitamine D3 . 21

Figure 14 : Modèle du processus de desquamation 23

Figure 15 : Kératines de type I et II et leur assemblage en filaments intermédiaires. 25

Figure 16 : Réactions de transamidation et d'estérification catalysées par les transglutaminases. 28

Figure 17 : Les trois étapes de la formation de l'enveloppe cornée : initiation de l'échafaudage protéique, formation de l'enveloppe lipidique et renforcement.. 29

Figure 18 : Mécanisme de synthèse des lipides constituant les *lamellae* lipidiques intercornéocytaires.. 32

Figure 19 : La transformation des desmosomes en cornéodesmosomes..... 33

Figure 20 : Formation de l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA) et de l'acide urocanique (UCA) respectivement à partir de la glutamine et de l'histidine 35

Figure 21 : Rôles multiples des acides aminés et des dérivés d'acides aminés du facteur naturel d'hydratation dans l'homéostasie et la fonction barrière de l'épiderme.. 37

Figure 22 : Cluster des gènes de la famille des « S100 fused-type proteins » dans le locus 1q21. 39

Figure 23 : Les domaines S100-like des sept "S100 fused-type proteins" 39

Figure 24 : Le gène de la filaggrine humaine..... 40

Figure 25 : Structure de la profilaggrine humaine 42

Figure 26 : Modèle actualisé du métabolisme de la filaggrine. 44

Figure 27 : Localisation de la (pro)filaggrine dans l'épiderme humain normal observée par immunomicroscopie électronique 44

Figure 28 : Caractéristiques cliniques, macroscopiques et microscopiques de l'ichtyose vulgaire..... 54

Figure 29 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la dermatite atopique..... 55

Figure 30 : Les multiples fonctions de la filaggrine dans l'homéostasie épidermique..... 58

Figure 31 : Agrégation des filaments de kératines par les monomères de filaggrine..... 60

Figure 32 : Structure du follicule pileux 62

Figure 33 : Le cycle pilaire. 64

Figure 34 : Différenciation du follicule pileux 65

Figure 35 : Différenciation du cortex..... 67

Figure 36 : Différenciation de la cuticule de la tige pilaire..... 68

Figure 37 : Différenciation de la médulla 68

Figure 38 : Structure de la trichohyaline 69

Figure 39 : Localisation de la trichohyaline dans le follicule pileux et modèle de la maturation de la trichohyaline dans la gaine épithéliale interne et dans la médulla..... 71

Figure 40 : Nombre de publications concernant les peptidyl-arginine désiminases et la désimination. 73

Figure 41 : La désimination et ses conséquences sur les protéines cibles..... 75

Figure 42 : Organisation génomique du locus *PADI* chez l'Homme (1p35-36). 76

Figure 43 : Structures cristallographiques des PADs.. 79

Figure 44 : Mécanisme catalytique proposé pour la réaction de désimination, en utilisant la PAD4 comme modèle 80

Figure 45 : Spécificité de substrats des PADs 1, 2 et 3 82

Figure 46 : Spécificité de substrats des PAD2 et PAD4. 82

Figure 47 : Promoteurs minimums des gènes *PADI* 1, 2 et 3 et les facteurs de transcription capables de s'y lier. 86

Figure 48 : Régulation transcriptionnelle à longue distance des gènes *PADI1* et *PADI3.*. 87

Figure 49 : Effet de l'auto-désimination sur la conformation du site actif de la PAD3. 89

Figure 50 : Distribution et identification de protéines désiminées dans l'épiderme. 90

Figure 51 : Lorsqu'elle est désiminée, la filaggrine n'est pas capable d'interagir avec les filaments de kératines et est plus rapidement protéolysée par la calpaïne 1.. 91

Figure 52 : Localisation des PADs 1, 2 et 3 dans l'épiderme humain.. 92

Figure 53 : Localisation des PADs 1 et 3 dans les couches granuleuse et cornée et colocalisation avec la filaggrine.. 93

Figure 54 : Localisation des protéines désiminées dans le follicule pileux. 94

Figure 55 : Localisation des PADs 1 et 3 dans le follicule pileux. 95

Figur*e* 56 : Localisation des protéines désiminées dans le follicule pileux 96

Figure 57 : Vue d'ensemble des implications physiologiques et pathologiques des PADs. 98

Figure 58 : Implication de la Pad4 dans le maintien de la pluripotence. 102

Figure 59 : Implication de la PAD4 dans la formation des NETs. 104

Figure 60 : Implication des PADs 2 et 4 dans l'auto-entretien de la polyarthrite rhumatoïde. 107

Figure 61 : Implication des PADs dans la physiopathologie de la sclérose en plaques. Voir le texte ci-dessus pour détails. 109

Figure 62 : Cl-amidine et Cl4-amidine, deux inhibiteurs spécifiques des PADs 112

Figure 63 : YW3-56 et Tétrazole Cl-amidine, deux dérivés de Cl-amidine présentant une efficacité augmentée 113

Figure 64 : Effet de l'humidité ambiante sur la protéolyse de la filaggrine dans l'épiderme de rat durant les heures suivant la naissance 210

Figure 65 : Effet d'une diminution abrupte de l'humidité ambiante sur la protéolyse de la filaggrine dans l'épiderme de souris hairless. 211

Figure 66 : Détection de la filaggrine, des protéines désiminées et de la filaggrine désiminée dans l'épiderme de souris avant et durant les heures suivant la naissance 212

Figure 67 : Gradient de calcium dans des épidermes reconstruits humains produits en atmopshère humide (~100 % d'humidité relative) et sèche (~50% d'humidité relative) et dans un échantillon *ex vivo* de peau humaine. 214

Figure 68 : Représentation schématique de l'effet de l'atmosphère sèche sur les propriétés morphologiques et fonctionnelles des épidermes reconstruits humains et sur le métabolisme de la filaggrine. 215

Figure 69 : L'autophagie dans les kératinocytes. 220

Figure 70 : Comment interpréter l'immunodétection de LC3 en western blot. 222

Figure 71 : Modèle de la cascade d'interactions entre la trichohyaline, la peptidyl-arginine désiminase 3 et la transglutaminase 3 dans la gaine épithéliale interne du follicule pileux. 228

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Distribution des kératines dans l'épiderme 26

Tableau 2 : Composition du FNH. 34

Tableau 3 : Composition en acides aminés des domaines répétitifs centraux des "S100-fused type proteins". 40

Tableau 4 : Pourcentage d'homologie entre les séquences protéiques des paralogues humains des PADs et des orthologues humains et de souris 76

Tableau 5 : Alignement des acides aminés impliqués dans le site catalytique de la PAD4 avec les séquences des autres PADs humaines 77

Tableau 6 : Distribution tissulaire et cellulaire des PADs chez l'homme 83

Tableau 7 : Résumé des perspectives de mon projet de thèse 233

INTRODUCTION

L'objet principal de ma thèse est l'étude du rôle d'une famille d'enzymes, les peptidyl-arginine désiminases (PADs ; enzymes catalysant une modification post-traductionnelle appelée désimination et correspondant à la transformation des résidus arginine en résidus citrulline), dans l'homéostasie épidermique, et en particulier dans le métabolisme d'une protéine essentielle de l'épiderme : la filaggrine (FLG). Un projet mené en collaboration entre mon laboratoire et une équipe de recherche allemande m'a de plus donné l'opportunité d'étudier le rôle des PADs dans le follicule pileux. Ainsi, mon introduction est séparée en quatre grands chapitres :

Après un bref avant-propos présentant la peau et ses annexes, le premier chapitre décrira l'organisation structurale de l'épiderme et les différentes fonctions de ce tissu ainsi que le processus de cornification, étape ultime de différenciation des kératinocytes.

La deuxième partie sera consacrée à la FLG, protéine jouant un rôle essentiel dans la cornification et qui est l'un des substrats majeurs des PADs dans l'épiderme.

Dans le troisième chapitre, l'organisation structurale du follicule pileux ainsi que les processus de différenciation des différentes couches le constituant seront présentés. La structure et le rôle de la trichohyaline (TCHH), une protéine exprimée dans le follicule pileux apparentée à la FLG et substrat des PADs, seront aussi détaillés.

Dans la quatrième et dernière partie introductive, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des PADs seront décrites. Les PADs étant exprimées dans de très nombreux tissus du corps humain, une brève revue de leurs implications physiologiques et pathologiques sera présentée avec un focus sur leur rôle dans l'épiderme et le follicule pileux.

AVANT-PROPOS : LA PEAU ET SES ANNEXES

A. La peau, les cheveux et les poils : bien plus que de simples organes

La peau représente l'enveloppe du corps. Elle est en continuité avec les muqueuses recouvrant les cavités naturelles de l'organisme. C'est l'organe de l'être humain le plus volumineux, représentant 1/3 du poids de l'organisme et une surface de l'ordre de 2 m^2 chez l'adulte. Sa fonction principale est de former une barrière protectrice contre la pénétration d'agents infectieux et d'allergènes et contre le risque de déshydratation. Outre ce rôle fonctionnel, elle joue aussi un rôle social très important dans nos sociétés. Rougeurs et frissons peuvent trahir nos émotions : elle est ainsi le « reflet de l'âme ». Elle est aussi le reflet de notre santé, et lorsqu'elle présente un aspect trop « anormal », à cause d'une maladie cutanée sévère, de cicatrices ou brûlures importantes, cela peut engendrer un rejet social douloureux pour l'individu. Elle est également le reflet de notre âge : elle va, au fur et à mesure de la vie, perdre de sa fermeté et se couvrir de rides et ridules. De plus, la couleur de notre peau est le premier indicateur de nos origines géographiques. Enfin, la peau peut être porteuse de nombreux symboles : tatouage, piercing, maquillage, bronzage ou culte de la peau pâle sont autant de choix faits par les humains pour « habiller » leur peau et indiquent les aspirations sociales de chacun.

Les cheveux et les poils assurent aussi un rôle protecteur, en particulier contre le froid et les rayonnements ultraviolets. De plus, certains poils ont un rôle plus spécifique. Les sourcils et les cils empêchent par exemple les poussières, la sueur et l'eau de pénétrer dans l'œil et le protègent des rayonnements lumineux. Les poils situés dans les oreilles et le nez constituent une sorte de filtre retenant les grosses poussières, ou les insectes. En outre, les poils et cheveux ont eux aussi un rôle social. La forme et la couleur des cheveux ainsi que l'abondance de la pilosité sont le reflet de nos origines. Dans certains groupes ethniques, les cheveux et les poils sont des symboles de virilité et de sensualité. Et les nombreuses coiffures que les cheveux permettent de réaliser peuvent aussi bien symboliser l'appartenance à un groupe que permettre l'expression de son individualité.

B. Structure de la peau

La peau est constituée de trois tissus superposés qui sont depuis la surface vers la profondeur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Outre ces trois compartiments, la peau présente des structures annexes telles que les follicules pileux, à l'origine des poils et des cheveux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (Figure 1).

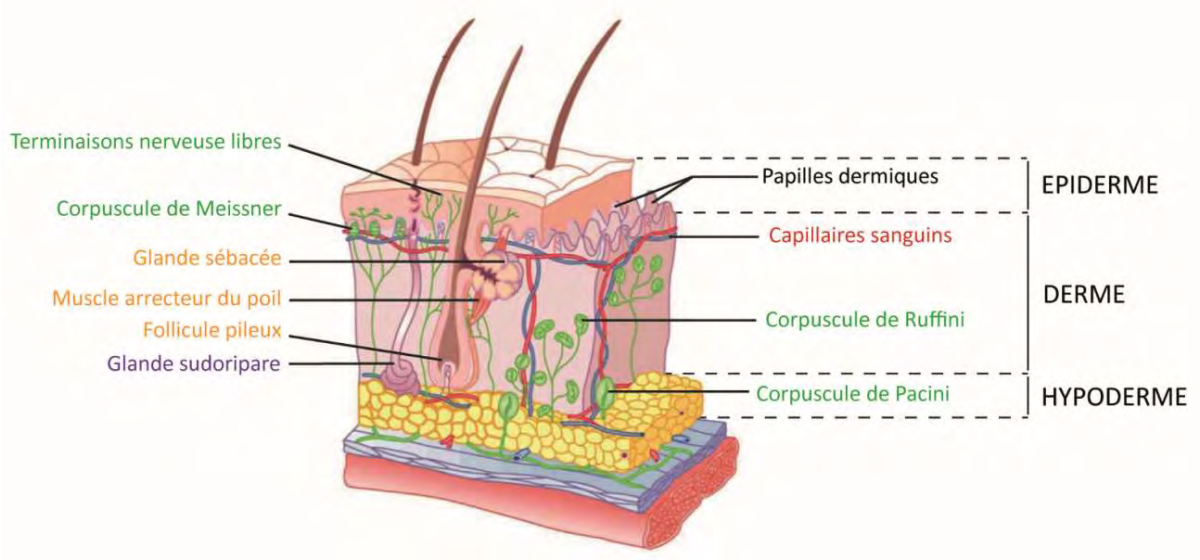


Figure 1 : Représentation schématique de la peau. Sont indiqués en orange les éléments du follicule pilo-sébacé, en violet une glande sudoripare eccrine, en rouge les capillaires sanguins et en vert les différents éléments du système nerveux. Les corpuscules de Meissner sont des récepteurs du toucher, les corpuscules de Ruffini sont sensibles à la chaleur et les corpuscules de Pacini sont sensibles aux pressions et vibrations. De plus, les terminaisons libres innervant l'épiderme sont responsables de la sensation de douleur. D'après (http://blog.nuxe.rs/zaboravite-na-prve-bore).

L'épiderme, épithélium d'origine ectodermique, constitue la partie la plus superficielle de la peau. L'épiderme, comme tout épithélium, n'est pas vascularisé mais contient de nombreuses terminaisons nerveuses libres. Son épaisseur est en moyenne de 100 µm mais varie de manière importante selon les régions du corps (de 50 µm au niveau des paupières et des organes génitaux externes jusqu'à 1 mm dans les régions palmo-plantaires). Son organisation et ses fonctions seront décrites en détails dans le chapitre II. L'épiderme est séparé du derme par la jonction dermo-épidermique ou lame basale, une structure acellulaire dont les composants sont synthétisés par les cellules des deux tissus. Outre son rôle de support mécanique pour l'ancrage des cellules de l'épiderme au derme, elle forme une barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments.

Le derme est un tissu conjonctif d'origine mésodermique richement vascularisé et innervé. On y retrouve des fibroblastes en quantité abondante ainsi que des cellules du système immunitaire (lymphocytes, mastocytes, macrophages tissulaires, cellules dendritiques). Les fibroblastes synthétisent les fibres de collagène et d'élastine, ainsi que la « substance fondamentale » (principalement composée d'acide hyaluronique et de protéoglycanes) de la matrice extracellulaire. C'est cette matrice qui confère à la peau sa résistance et son élasticité. Le derme est composé de deux zones : la zone réticulaire (profonde) et la zone papillaire, qui s'invagine dans l'épiderme pour former les papilles dermiques. Celles-ci contiennent des fibres nerveuses qui peuvent traverser la

lame basale pour aller innerver l'épiderme et les récepteurs du toucher que sont les corpuscules de Meissner. On y trouve également un riche réseau vasculaire qui permet d'alimenter l'épiderme en nutriments par diffusion à travers la lame basale.

Le derme est soutenu par l'hypoderme (sauf au niveau des paupières, des oreilles et des organes génitaux masculins où il n'y a pas d'hypoderme). L'hypoderme est un tissu adipeux d'origine mésodermique richement vascularisé. Il est essentiellement composé d'adipocytes, cellules stockant les lipides principalement sous forme de triglycérides et organisées en lobules. Ce tissu constitue ainsi un important réservoir énergétique et assure une fonction d'isolant thermique et de protection contre les chocs mécaniques.

Les annexes cutanées dérivent comme l'épiderme de l'ectoderme et s'invaginent dans le derme et l'hypoderme lors du développement embryonnaire.

Le follicule pileux, qui sera présenté plus en détails dans le chapitre III, est toujours associé à une glande sébacée et dans certains territoires anatomiques, à un muscle arrecteur et/ou à une glande sudoripare apocrine. On parle de follicule pilo-sébacé.

Les glandes sébacées sont présentes sur toute la peau, à l'exception de la paume des mains et de la plante des pieds, et sont principalement annexées aux poils sauf dans les régions dépourvues de ceux-ci (comme par exemple les lèvres et les paupières). Ces glandes sont dites holocrines : c'est-à-dire que la sécrétion se fait par éclatement des cellules. En effet, les sébocytes se chargent de lipides (des triglycérides, des céramides et du squalène notamment) au cours de leur différenciation et finissent par éclater pour libérer leur contenu, le sébum, au niveau du canal de la glande. Le sébum est finalement excrété à la surface de la peau et forme un film lipidique protégeant la peau du dessèchement.

Enfin, les glandes sudoripares, dites eccrines lorsqu'elles ne sont pas associées à un follicule pileux, sont réparties sur toute la surface de la peau et sont particulièrement nombreuses au niveau de la paume des mains, de la plante des pieds et du front. Ce sont des glandes exocrines sécrétant principalement la sueur mais également des acides gras et des peptides. La sueur est essentiellement composée d'eau mais contient également des minéraux, du lactate et de l'urée. Elle participe à la thermorégulation de l'organisme et à l'hydratation des couches supérieures de l'épiderme (le lactate et l'urée entrent en effet dans la composition du facteur naturel d'hydratation (FNH) ; voir paragraphe I.E.5). De plus, grâce à son acidité (pH compris entre 4 et 6), la sueur participe au contrôle de la croissance de la flore cutanée et à la défense antimicrobienne.

I. L'EPIDERME, UNE BARRIERE MULTIFONCTIONNELLE

L'épiderme, tissu le plus superficiel de la peau, est un épithélium de revêtement pavimenteux pluristratifié et kératinisé. Sa principale fonction est de former une barrière vitale protégeant l'organisme contre les agressions extérieures et le risque de déshydratation. L'épiderme est majoritairement composé de kératinocytes qui subissent une différenciation vectorisée, orientée vers la surface, et aboutissant à la stratification de l'épiderme en 4 couches cellulaires : couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée. C'est un tissu qui se renouvelle en continu grâce à un équilibre dynamique finement régulé entre la prolifération des kératinocytes basaux, leur migration vers la surface pendant laquelle ils se différencient et leur élimination par desquamation. L'épiderme met entre 4 et 6 semaines à se renouveler complètement. Les autres cellules épidermiques, à savoir : les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langerhans, sont dispersées entre les kératinocytes. Bien que minoritaires, ces cellules possèdent néanmoins chacune des fonctions spécifiques essentielles (Figure 2).

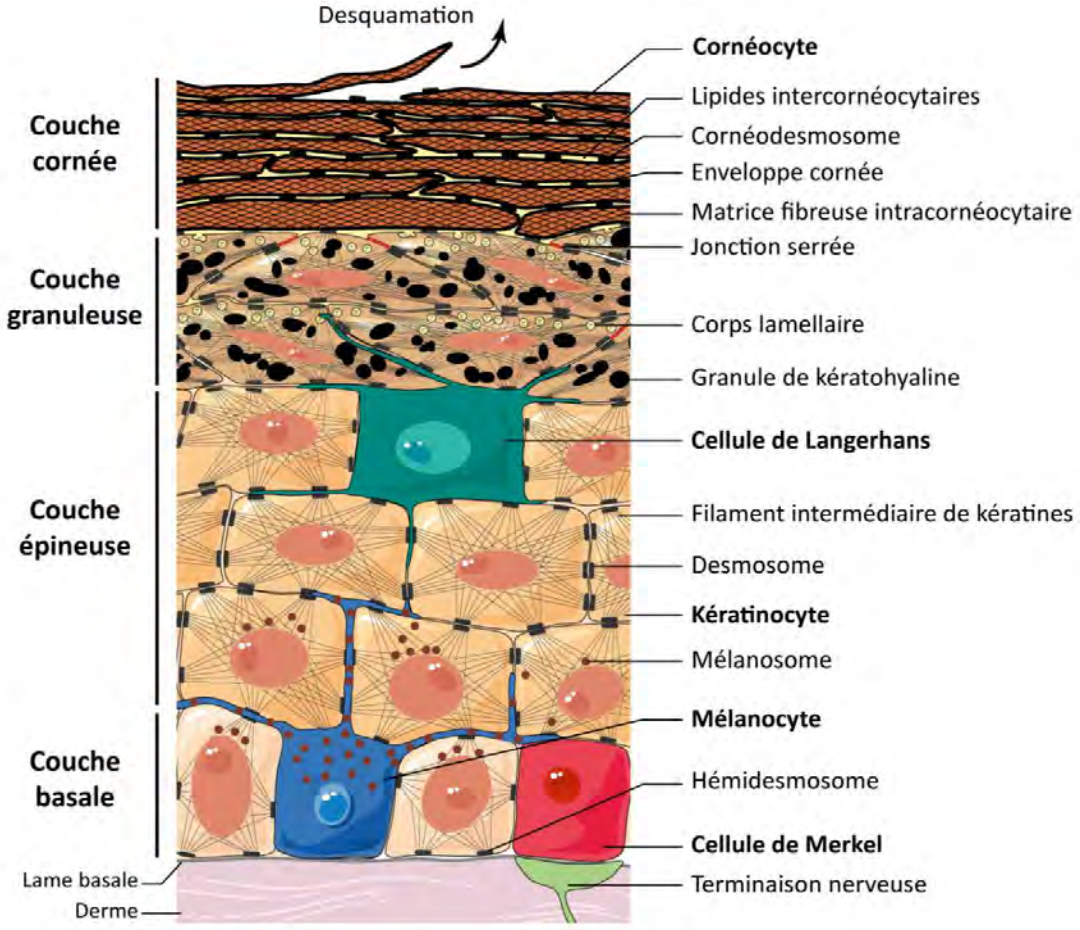


Figure 2 : Représentation schématique de l'épiderme. En condition normale, quatre types cellulaires sont présents dans l'épiderme. Les cellules majoritaires sont les kératinocytes, organisés en quatre strates : couches basale, épineuse, granuleuse et cornée. Au niveau de la couche cornée, les kératinocytes sont aplatis et anucléés, on les appelle alors cornéocytes. On trouve ensuite, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

A. Les différents types cellulaires de l'épiderme

1. Les mélanocytes

Les mélanocytes représentent environ 5% de la population cellulaire épidermique et jouent un rôle dans la photoprotection de la peau. Ils dérivent des crêtes neurales, migrent jusqu'à l'épiderme lors de l'embryogenèse et s'intègrent au sein de la couche la plus profonde de l'épiderme, la couche basale (Figures 2 et 3A). On les retrouve aussi au niveau du follicule pileux et de l'iris de l'oeil. Ce sont des cellules spécialisées dans la synthèse de mélanines : phéomélanines, pigments jaunes-rouges et eumélanines, pigments bruns-noirs. Ces pigments sont responsables de la couleur de la peau, des cheveux, des poils et des iris et ont un rôle photoprotecteur. Ils sont stockés dans des vésicules sécrétrices appelées mélanosomes. Dans l'épiderme, les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes au niveau des dendrites mélanocytaires et se localisent en position apicale des noyaux des kératinocytes afin de protéger le matériel génétique des rayonnements ultraviolets (Figures 2 et 3B ; pour revue : Wu et Hammer, 2014).

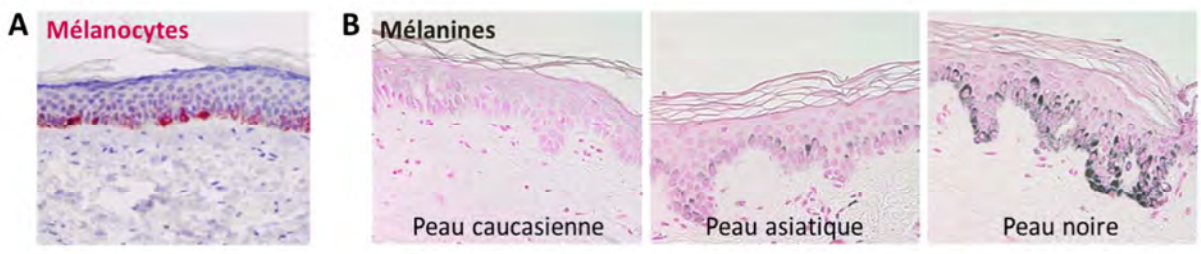


Figure 3 : Distribution des mélanocytes et de la mélanine dans l'épiderme. (A) Immunomarquage spécifique des mélanocytes sur coupe de peau humaine normale. D'après (Wong *et al.*, 2015a). (B) Marquage des mélanines sur coupes de peau humaine de différentes origines ethniques avec une coloration Fontana-Masson. La quantité de mélanine présente dans l'épiderme varie fortement en fonction du type de peau alors que le nombre de mélanocytes est le même. D'après (Brenner et Hearing, 2008).

2. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont des cellules du système immunitaire inné, devant leur nom à Paul Langerhans qui les a découvertes en 1868. Elles représentent 3 à 5% de la population cellulaire épidermique. Dérivées des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, elles migrent vers l'épiderme et s'insèrent entre les kératinocytes. Elles forment grâce à leurs longues dendrites un vaste réseau de sentinelles immunologiques (Figure 4). Elles sont douées d'activité de phagocytose et internalisent toutes molécules ou tous micro-organismes pathogènes en contact avec leur membrane. Ce sont de plus des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T « naïfs » des ganglions lymphatiques, qui jouent donc un rôle de premier plan dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

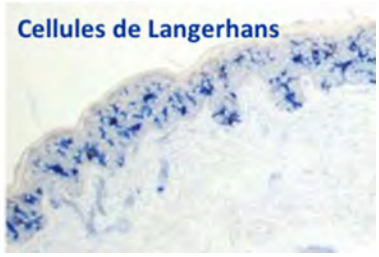


Figure 4 : Distribution des cellules de Langerhans dans l'épiderme. Immunomarquage des cellules de Langerhans sur coupe de peau humaine normale avec un anticorps anti-Langerine. D'après (Liu, 2009).

3. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont les cellules les moins abondantes de l'épiderme puisqu'elles représentent environ 1 % des cellules épidermiques. Décrites initialement en 1875 par Friedrich Sigmund Merkel, il a longtemps été admis que ces cellules dérivaient des crêtes neurales au vu des nombreuses caractéristiques neurales qu'elles présentent (par exemple : synthèse de neuropeptides, expression de molécules synaptiques et de facteurs de transcription pro-neuraux), mais des données relativement récentes prouvent que ces cellules dérivent de cellules souches épidermiques (van Keymeulen *et al.*, 2009). Ces cellules se localisent dans la couche basale de l'épiderme et au niveau du « bulge » (renflement) du follicule pileux. Elles jouent un rôle de mécanorécepteur et sont notamment sensibles aux déformations mécaniques fines telles que celles utilisées pour la lecture du braille. En contact étroit avec les terminaisons nerveuses périphériques, elles leur transmettent des informations par la libération de neurotransmetteurs (Figures 2 et 5 ; Boulais et Misery, 2007).

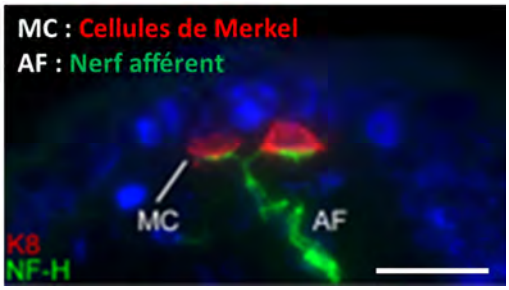


Figure 5 : Etroite connexion entre cellules de Merkel et terminaisons nerveuses afférentes. Immunomarquage des cellules de Merkel sur coupe de peau de souris avec un anticorps anti-kératine 8 et des terminaisons nerveuses afférentes avec un anticorps anti-NF-H (neurofilament-heavy). Barre d'échelle = 60 µm. D'après (Woo *et al.*, 2010).

4. Les kératinocytes

Les kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme, représentent environ 90% de la population cellulaire épidermique. D'origine ectodermique, ils doivent leur nom aux kératines, protéines constitutives des filaments intermédiaires qu'ils produisent en quantité très importante. En migrant de la profondeur vers la surface, les kératinocytes subissent un processus de différenciation vectorisé

qui se traduit par des changements morphologiques et biochimiques progressifs et donnent ainsi à l'épiderme sa caractéristique d'épithélium pavimenteux (dont les cellules superficielles sont aplaties), pluristratifié et cornifié.

B. Structure pluristratifiée de l'épiderme

1. La couche basale

La couche basale ou *stratum basale* est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est constituée d'une seule assise de kératinocytes de forme cubique au noyau volumineux (Figure 2). Ils sont rattachés à la lame basale par des structures d'adhésion, les hémidesmosomes, et aux kératinocytes voisins par les desmosomes. Seuls les kératinocytes basaux sont mitotiquement actifs et assurent le renouvellement continu de l'épiderme (voir paragraphe I.D.1). De façon très régulée, certains d'entre eux se détachent de la lame basale pour migrer vers la couche épineuse et s'engagent ainsi dans le processus de différenciation kératinocytaire.

2. La couche épineuse

La couche épineuse ou *stratum spinosum* est composée de cinq à dix assises cellulaires. Elle doit son nom à la présence de très nombreux desmosomes visibles au niveau de ce compartiment en microscopie électronique et donnant un aspect « épineux » aux cellules (Figure 6A). Les desmosomes sont des systèmes de jonction intercellulaire où s'ancrent les filaments intermédiaires de kératines (Figures 6B et C). Ces structures d'adhésion assurent la cohésion entre les kératinocytes et confèrent à l'épiderme une grande résistance mécanique. Dès lors qu'un kératinocyte entre dans la couche épineuse, il sort du cycle cellulaire et entre en différenciation. Les kératinocytes épineux sont polyédriques, ils s'aplatissent et s'élargissent à mesure qu'ils migrent vers la couche granuleuse.

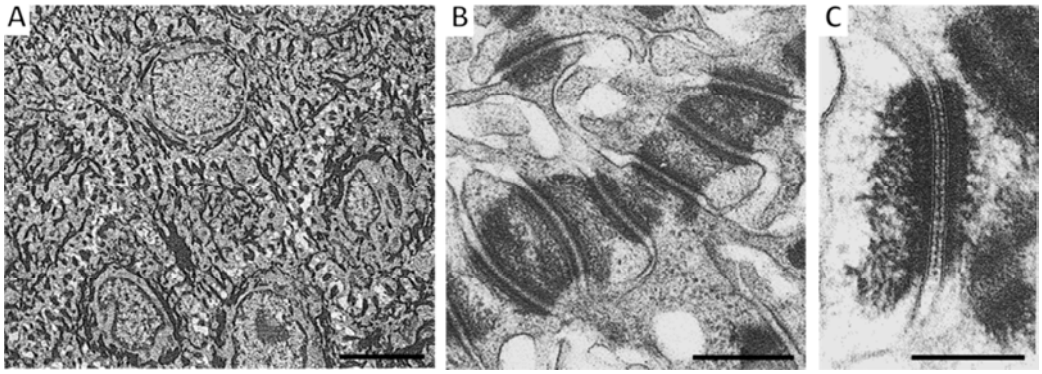


Figure 6 : Aspect "épineux" et desmosomes de la couche épineuse observés en microscopie électronique à transmission. (A) Vue d'ensemble de la couche épineuse. Barre d'échelle = 2 µm (B, C) Desmosomes. Barre d'échelle = 500 nm et 200 nm respectivement. D'après (Leigh *et al.*, 1994).

3. La couche granuleuse

La couche granuleuse ou *stratum granulosum* est composée d'une à trois assises de kératinocytes. C'est la dernière couche de cellules vivantes de l'épiderme (présentant une activité transcriptionnelle et traductionnelle). Bon nombre de composants nécessaires à la formation de la couche cornée (voir paragraphe I.B.4) sont donc synthétisés par le kératinocyte granuleux. Les kératinocytes granuleux sont particulièrement aplatis et doivent leur nom à la présence dans leur cytoplasme de nombreux granules de kératohyaline (Figures 2 et 7A). Ce sont des agrégats protéiques amorphes de taille variable (faisant jusqu'à plusieurs micromètres de largeur) qui constituent des zones de stockage de protéines indispensables au processus terminal de différenciation. Chez le rongeur, on distingue les granules de type F qui contiennent le précurseur de la FLG : la profilaggrine (proFLG) (voir chapitre II), et des granules de type L qui contiennent la loricrine (voir paragraphe I.E.2.a ; Steven *et al.*, 1990). Chez l'homme, il semble que ces deux protéines soient stockées au sein des mêmes granules (Yoneda *et al.*, 2012). Le cytoplasme des kératinocytes granuleux contient aussi des corps lamellaires, structures sécrétoires tubulo-vésiculaires de petite taille (100-150 nm de diamètre) dérivant du réseau trans-golgien (Figures 2 et 7B ; Elias *et al.*, 1998). Les corps lamellaires (appelés aussi kératinosomes) sont des petites structures vésiculaires délimitées par une membrane lipidique qui contiennent notamment les précurseurs lipidiques des espaces intercornéocytaires organisés en feuillets, les enzymes impliquées dans la maturation des lipides, des protéases et leurs inhibiteurs impliqués dans la desquamation, et aussi des protéines et des peptides antimicrobiens. Les corps lamellaires des kératinocytes granuleux

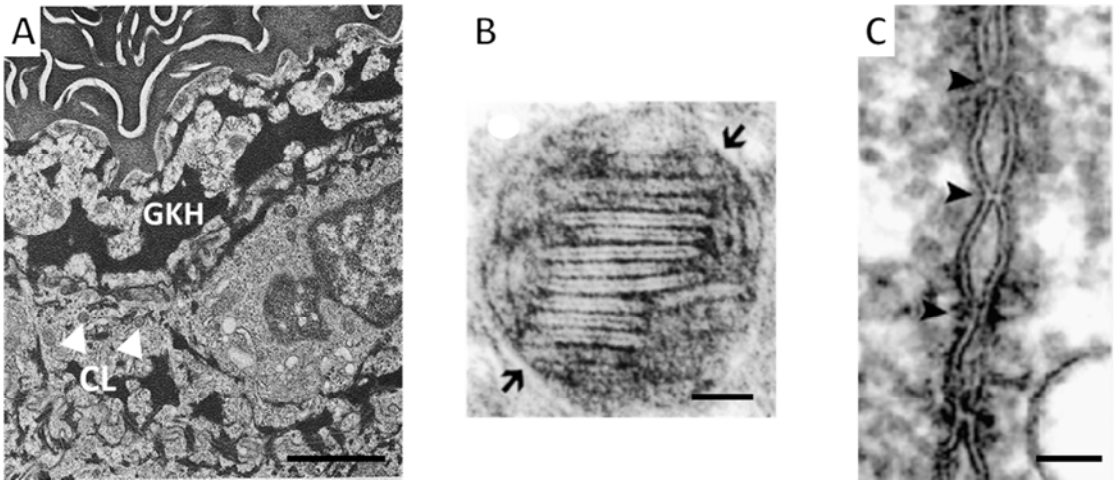


Figure 7 : Granule de kératohyaline, corps lamellaire et jonction serrée, trois structures spécifiques de la couche granuleuse observées en microscopie électronique à transmission. (A) Observation de granules de kératohyaline (GKH) et de corps lamellaires (CL, flèches blanches) de la couche granuleuse. Barre d'échelle = 1 µm. D'après (Leigh *et al.*, 1994). (B) Organisation en feuillets des lipides stockés au sein d'un corps lamellaire. Barre d'échelle = 50 nm. D'après (Madisson *et al.*, 2003). (C) Jonctions serrées présentes au niveau de la membrane latéro-apicale des kératinocytes granuleux. Barre d'échelle = 50 nm. D'après (Brandner *et al.*, 2009).

déversent leur contenu dans l'espace extracellulaire entre couche granuleuse et couche cornée et jouent ainsi un rôle majeur dans la formation du « ciment » lipidique intercornéocytaire et dans la régulation de la desquamation. Enfin, on retrouve aussi au niveau de la couche granuleuse des jonctions intercellulaires spécifiques des épithéliums, associées au cytosquelette d'actine : les jonctions serrées (Figures 2 et 7C ; Kirschner et Brandner, 2012). Elles sont localisées au niveau des membranes latéro-apicales des kératinocytes granuleux et il semble qu'elles persistent dans la couche cornée profonde (Haftek *et al.*, 2011). Ces jonctions serrées assurent une étanchéité presque totale de l'épiderme, ne laissant passer que les toutes petites molécules et les ions. Elles jouent de plus un rôle dans la polarisation cellulaire en empêchant la diffusion libre des lipides et protéines de la membrane plasmique entre le pôle baso-latéral et le pôle apical (Kirschner et Brandner, 2012).

4. La couche cornée

Lors de la transition entre couche granuleuse et couche cornée, les kératinocytes subissent un programme de différenciation unique, aboutissant à la mort cellulaire, appelé cornification. Ce processus est décrit en détail au paragraphe I.E.

La couche cornée ou *stratum corneum* est composée d'un empilement de 10 à 30 assises de kératinocytes très aplatis, anucléés et dépourvus d'organites, appelés cornéocytes (Figure 2). Les cornéocytes présentent des caractéristiques structurales bien particulières, qui leur confèrent des caractéristiques fonctionnelles à part entière. L'espace intracornéocytaire est majoritairement composé d'une matrice fibreuse, dense et riche en kératines. Les cornéocytes sont délimités par une coque lipido-protéique très rigide et insoluble qui remplace la membrane plasmique : l'enveloppe cornée (ou cornifiée). Les espaces intercornéocytaires sont emplis de lipides organisés en *lamellae* qui constituent un ciment hydrophobe autour des cornéocytes (assurant en partie l'étanchéité de la couche cornée). De plus, les cornéocytes sont reliés entre eux par les cornéodesmosomes, jonctions spécifiques de la couche cornée issues de la modification des desmosomes (Figure 8). Ces structures

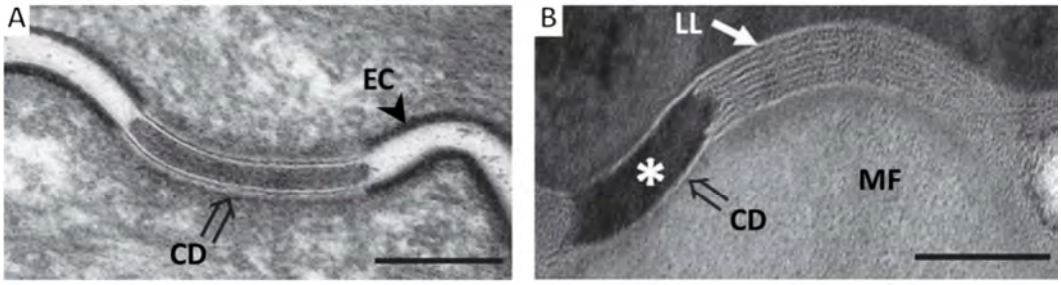


Figure 8 : Enveloppe cornée, cornéodesmosomes, *lamellae* lipidiques intercornéocytaires et matrice fibreuse intracornéocytaire observés en microscopie électronique à transmission. (A) Observation de l'enveloppe cornée (EC) et d'un cornéodesmosome (CD) en cours de formation dans un kératinocyte situé à la transition entre couche granuleuse et couche cornée. (B) Observation des *lamellae* lipidiques intercornéocytaires (LL) et d'un cornéodesmosome (CD) et de la matrice fibreuse intracornéocytaire (MF). Barres d'échelle = 100 nm. D'après (Lin *et al.*, 2012).

assurent la cohésion des cornéocytes dans la partie profonde de la couche cornée appelé *stratum compactum.* Au niveau des assises plus superficielles appelées *stratum disjunctum*, les cornéodesmosomes sont protéolysés. Les cornéocytes sont alors moins cohésifs et finissent par se détacher de l'épiderme. Ce processus est appelé la desquamation (voir paragraphe I.D.3).

La couche cornée a longtemps été considérée comme une simple couche de cellules mortes sans réelle fonction. En réalité, elle est métaboliquement active et assure en très grande partie la fonction de barrière de l'épiderme.

C. Fonctions de barrière de l'épiderme

Grâce à sa structure unique, l'épiderme forme une barrière multifonctionnelle assurant la protection de l'organisme contre les divers stress externes auxquels il est sans cesse confronté (Figure 9).

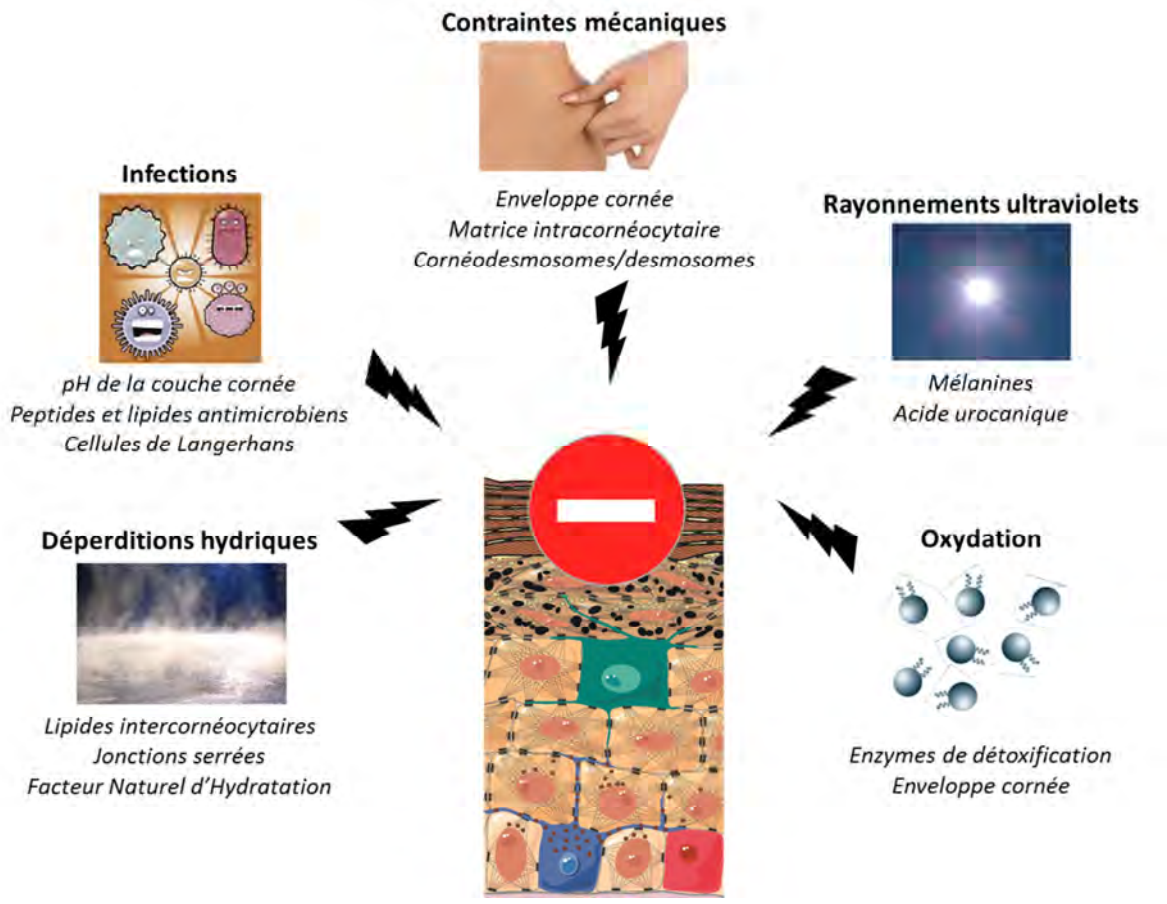


Figure 9 : Fonctions de barrière de l'épiderme. Pour détails voir le texte ci-dessous.

1. Une barrière presque imperméable

L'épiderme constitue une barrière quasi imperméable aussi bien de l'intérieur vers l'extérieur que de l'extérieur vers l'intérieur. Une de ses fonctions premières est en effet de limiter les déperditions

hydriques. L'importance de cette fonction est illustrée par le fait qu'un grand brûlé non pris en charge mourra de déshydratation en quelques heures. En outre, l'épiderme empêche la pénétration d'éléments extérieurs indésirables tels que des micro-organismes pathogènes et des substances toxiques. Cette imperméabilité de l'épiderme est assurée par les lipides intercornéocytaires ainsi que par les jonctions serrées de la couche granuleuse. De plus, un mélange de molécules hautement hygroscopiques, appelé FNH et présent exclusivement dans la couche cornée, permet de retenir l'eau au sein des cornéocytes et de capter l'humidité ambiante. L'imperméabilité de l'épiderme n'est cependant pas totale. Une légère évaporation d'eau de la couche cornée vers l'extérieur peut être mesurée et est appelée « perte en eau trans-épidermique » (« transepidermal water loss » ou TEWL en anglais) ou « perte insensible en eau » (PIE) ou encore perspiration.

2. Une barrière résistante aux stress mécaniques

La résistance de l'épiderme aux divers stress mécaniques est principalement assurée par trois structures spécifiques des cornéocytes : l'enveloppe cornée, la matrice fibreuse intracornéocytaire de kératines et les cornéodesmosomes. L'enveloppe cornée et la matrice fibreuse de kératines sont très rigides et résistantes, et les cornéodesmosomes assurent la cohésion intercellulaire. Ces trois structures sont liées entre elles et forment ainsi une « superstructure » que l'on peut voir comme la charpente protéique de la couche cornée. L'hydratation de la couche cornée permise par la présence du FNH assure de plus la flexibilité de cet échafaudage.

Dans les couches inférieures, la cohésion tissulaire est assurée par les desmosomes et le cytosquelette de kératines. Les liens étroits de ces structures avec celles de la couche cornée permettent de répartir les contraintes mécaniques dans l'ensemble du tissu.

3. Une barrière antioxydante

L'épiderme étant en contact direct avec l'air, il est exposé à de nombreux stress oxydatifs exogènes provenant notamment des agents polluants, de la fumée de tabac et des irradiations ultraviolettes. Ces derniers vont réagir avec l'oxygène pour former des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species » en anglais), molécules présentant un électron non apparié et étant de ce fait chimiquement très réactives. Au niveau cellulaire, une quantité excessive de ROS induit un déséquilibre de la balance oxydo-réductrice et engendre des réactions d'oxydation altérant définitivement les protéines, les lipides et l'ADN des cellules. Ceci aboutit à terme à un vieillissement cellulaire précoce, à des réactions inflammatoires ou encore à l'apparition de cancers.

Au sein de l'épiderme, des mécanismes de lutte contre l'activité des ROS, cruciaux pour le maintien de l'homéostasie épidermique, ont été caractérisés. Au sein des kératinocytes, on retrouve

des enzymes de détoxification permettant de transformer les ROS en espèces moins toxiques (comme les superoxydes dismutases, la catalase et la peroxydase du glutathion) ainsi que des molécules antioxydantes de faible poids moléculaire (comme le glutathion lui-même, l'acide urique, l'acide ascorbique (vitamine C) et l'α-tocophérol (vitamine E)) et des enzymes de réparation. De manière intéressante, ils sont présents en plus grande quantité dans les kératinocytes suprabasaux, les plus exposés aux agressions oxydantes d'origine exogène (Schäfer et Werner, 2011).

Outre ces systèmes classiques de défense contre le stress oxydatif, des composants plus spécifiques de l'enveloppe cornée, notamment certains membres de la famille des petites protéines riches en proline (SPRRs pour « small proline-rich proteins » en anglais), ont aussi des propriétés antioxydantes démontrées (Vermeij et Backendorf, 2014).

La couche cornée forme ainsi une première ligne de défense contre les ROS exogènes.

4. Une barrière photoprotectrice

La fonction de barrière photoprotectrice de l'épiderme est conférée à la fois par les mélanines, pigments produits par les mélanocytes protégeant le noyau des kératinocytes (voir paragraphe I.A.1) et par l'acide urocanique (UCA pour « urocanic acid », en anglais), un dérivé de l'histidine entrant dans la composition du FNH et capable d'absorber les rayons ultraviolets (voir paragraphe I.E.5).

5. Une barrière antimicrobienne

Les cellules épidermiques impliquées dans la fonction de barrière immunologique sont les cellules de Langerhans (voir paragraphe I.A.2) et les kératinocytes. Ces derniers jouent en effet un rôle primordial dans la défense antimicrobienne. Tout d'abord, la couche cornée est imperméable aux micro-organismes de par sa structure. Le processus de desquamation assure de plus l'élimination des cornéocytes de surface et des éventuels micro-organismes pathogènes qui pourraient s'y être déposés.

En plus de cette barrière physique, l'acidité de la couche cornée (en moyenne le pH superficiel est de 4,5) favorise le développement de la microflore naturelle, dite commensale (bactéries, protozoaires) tout en inhibant la croissance de certains micro-organismes pathogènes (le staphylocoque doré se multiplie mieux à pH neutre par exemple). Au niveau de la couche cornée, on observe un gradient de pH décroissant de la profondeur vers la surface. Cette acidification est notamment due aux acides aminés et dérivés d'acides aminés du FNH et en particulier à l'UCA (voir paragraphe I.E.5), à la sécrétion d'ions H^+ par des échangeurs de protons situés à l'interface entre kératinocytes granuleux et cornéocytes (Behne *et al.*, 2002), et aux acides gras libres issus de la dégradation des phospholipides membranaires lors de la cornification (Fluhr *et al.*, 2001). En

parallèle, l'acide lactique présent dans la sueur et les acides gras libres sécrétés par les glandes sébacées participent aussi à l'acidification de la surface épidermique.

Aussi, les kératinocytes produisent un grand nombre de peptides antimicrobiens, dont les deux principales familles sont les défensines et les cathélicidines (Braff *et al.*, 2005). La plupart sont amphiphiles et interagissent avec la membrane bactérienne pour y former des pores (Henzler Wildman *et al.*, 2003). Certains lipides des *lamellae* de la couche cornée, comme les acides gras libres et les sphingosines, auraient également un rôle antimicrobien (Bibel *et al.*, 1992).

D. Homéostasie de l'épiderme

L'homéostasie épidermique est assurée par un équilibre finement régulé entre la prolifération des kératinocytes au niveau de la couche basale, leur migration vers la surface de l'épiderme en parallèle de leur différenciation et leur exfoliation via le processus de desquamation. Ainsi l'épaisseur de l'épiderme est maintenue constante en condition physiologique normale.

1. Cellules souches, prolifération et auto-renouvellement

Les cellules souches épidermiques sont distribuées dans trois régions différentes de l'épiderme. On les retrouve réparties de manière éparse dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire, au niveau du bulge du follicule pileux et dans la glande sébacée. Elles sont capables de s'auto-renouveler indéfiniment. En cas de blessure, elles jouent un rôle essentiel dans la réparation tissulaire. Seules les cellules souches du bulge du follicule pileux semblent être multipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de générer les différents lignages cellulaires qui constituent l'épiderme, le follicule pileux et la glande sébacée.

Le renouvellement continu de l'épiderme est assuré par une sous-population de kératinocytes basaux au fort potentiel prolifératif. Deux modèles de renouvellement de l'épiderme ont été proposés : le modèle hiérarchique et le modèle stochastique (Figure 10 ; Hsu *et al.*, 2014). Le modèle hiérarchique, suggéré par Potten en 1974 et admis pendant longtemps, est basé sur l'existence d'unités de prolifération épidermique. Dans ce modèle, une cellule souche épidermique se divise rarement et de manière asymétrique, donnant naissance à une cellule souche fille et à une cellule d'amplification transitoire. Cette dernière est capable de se diviser rapidement mais un nombre limité de fois (< 15 cycles) avant de s'engager dans le processus de différenciation épidermique. Ceci aboutit à une organisation en colonne verticale des cellules dérivant d'une même cellule souche (Potten, 1974). Dans le modèle stochastique proposé par Clayton *et al.* en 2007, les cellules souches n'interviennent pas dans le renouvellement en condition physiologique normale. Des cellules

progénitrices engagées dans un programme de prolifération illimité sont responsables à elles seules du renouvellement des kératinocytes. Chacune se divise fréquemment, essentiellement de manière asymétrique, donnant naissance à une cellule progénitrice qui reste dans la couche basale et une cellule post-mitotique qui passe dans le compartiment supra-basal et entame le processus de différenciation (84% des divisions). De manière plus marginale, des divisions symétriques ont lieu générant deux cellules progénitrices (8% des divisions) ou deux cellules post-mitotiques (8% des divisions) (Clayton *et al.*, 2007). De récents travaux, dans lesquels les cellules souches épidermiques de souris ont été marquées de manière individuelle afin de suivre leurs dynamiques de division sur le long terme, sont en accord avec le modèle stochastique (Doupé *et al.*, 2010 ; Lim *et al.*, 2013) alors que les résultats d'une autre étude soutiennent l'existence d'un modèle hiérarchique (Mascré *et al.*, 2012). Il est possible que les contradictions entre ces différentes études puissent provenir des méthodes utilisées pour marquer les cellules mais aussi du fait que ces expériences n'ont pas été menées sur les mêmes régions anatomiques (oreille, queue et patte selon les cas). Ainsi, les mécanismes permettant l'auto-renouvellement de l'épiderme sont très complexes et ne sont pas encore complètement compris.

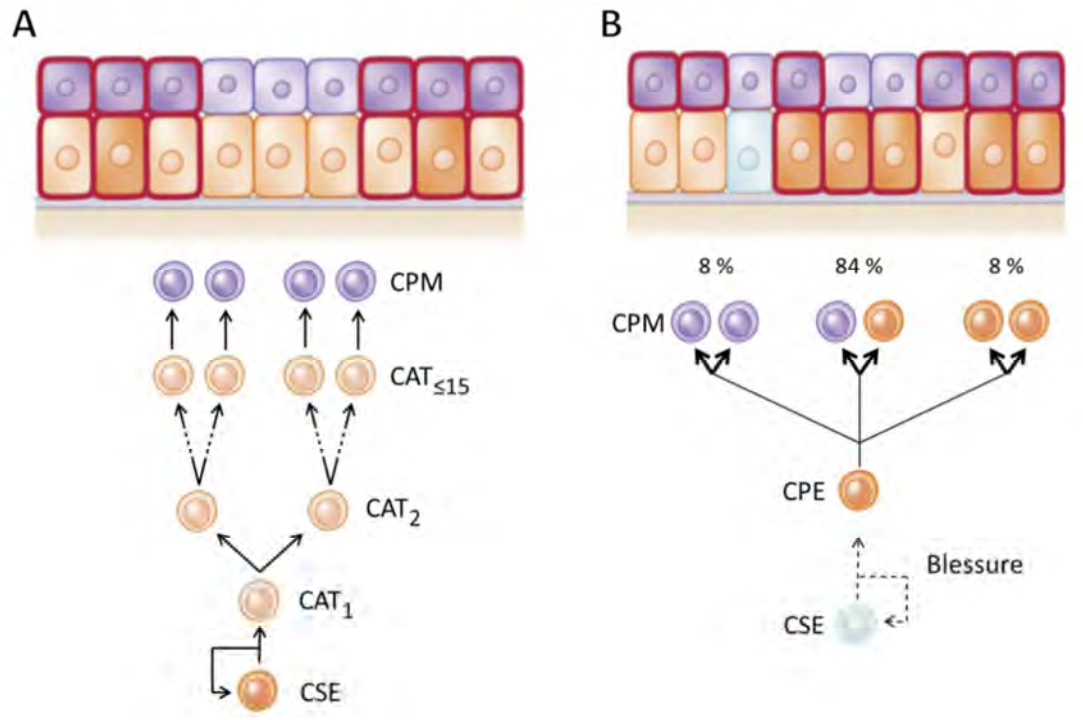


Figure 10 : Représentation schématique des deux modèles de renouvellement de l'épiderme. (A) Modèle hiérarchique basé sur la présence d'unités de prolifération épidermique composées des cellules issues de la division d'une même cellule souche. Une cellule souche (SC) se divise et génère une nouvelle cellule souche et une cellule d'amplification transitoire (CAT) au potentiel prolifératif rapide mais limité (15 cycles de division maximum) pour finalement donner des cellules post-mitotiques qui s'engagent dans le processus de différenciation. (B) Modèle stochastique dans lequel les cellules souches n'interviennent pas en condition physiologique normale. Des cellules progénitrices engagées (CPE) au potentiel prolifératif non limité se divisent en mode symétrique ou asymétrique, générant deux CPE (8% des divisions), une CPE et une CPM (84%), ou deux CPM (8%). Adapté de (Hsu *et al.*, 2014).

2. La régulation de la différenciation

La différenciation épidermique est un processus extrêmement régulé qui implique l'expression et la répression séquentielles et coordonnées de gènes spécifiques, impliqués soit dans la prolifération soit dans la différenciation. Cette régulation se fait notamment par le biais de nombreux facteurs de transcription. En outre, le calcium et la vitamine D jouent aussi un rôle majeur dans la régulation de la différenciation et ceci de façon synergique.

a. Le complexe de différenciation épidermique

Plus de 60 gènes codant des protéines impliquées dans la cornification sont réunis au sein d'un même cluster d'environ 1,6 Mb : le locus en position 1q21 appelé « Complexe de Différenciation Epidermique » (EDC pour « epidermal differentiation complex » en anglais) (Figure 11 ; Henry *et al.*, 2012 ; Kypriotou *et al.*, 2012). On y retrouve les gènes codant les membres des familles des « S100 fused-type proteins » (SFTPs) (dont la FLG et la TCHH font partie ; voir paragraphes II et III.D, respectivement), des « late cornified envelope » (LCEs), des « small proline rich proteins » (SPRP) et des protéines S100. Les gènes codant la loricrine et l'involucrine, deux composants majeurs de l'enveloppe cornée se trouvent aussi dans ce cluster (voir paragraphe I.E.2.a). Le regroupement de ces gènes au sein d'un même locus et leur expression coordonnée lors du développement embryonnaire et de la différenciation épidermique suggèrent l'existence de mécanismes de régulation communs qui commencent à être décryptés. Cependant, les gènes d'autres protéines jouant un rôle tout aussi essentiel dans la cornification ne se trouvent pas en 1q21, comme par exemple la cornéodesmosine, les transglutaminases (TGases) ou les gènes *PADIs* codant les PADs.

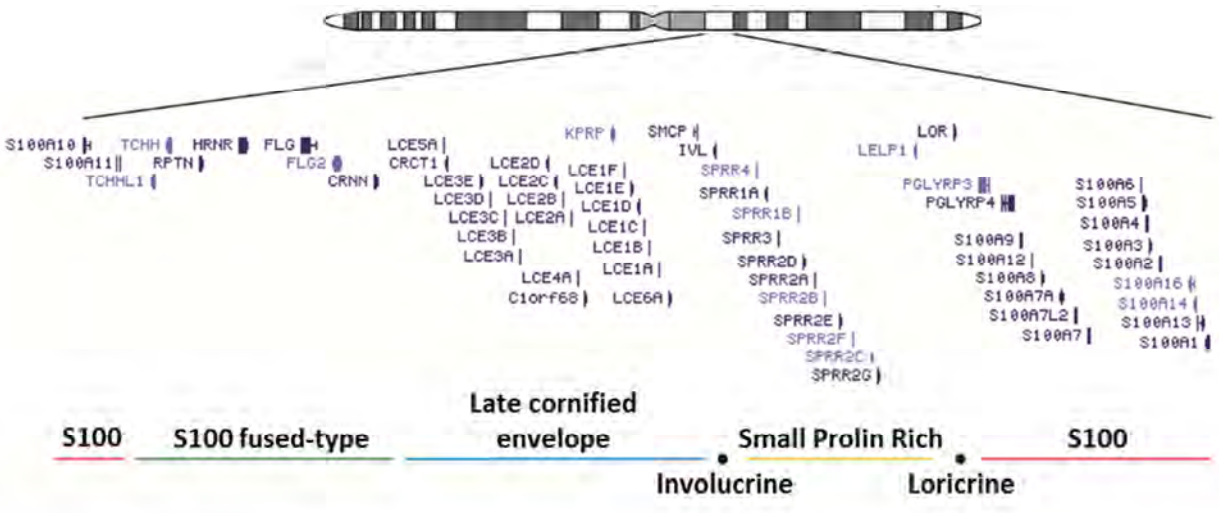


Figure 11 : Représentation schématique du complexe de différenciation épidermique humain. D'après (Henry *et al.*, 2012).

b. Facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de la différenciation épidermique ont été identifiés (pour revue : Mattiuzzo, 2009). Certains de ces facteurs sont ubiquistes alors que d'autres ont une expression restreinte à l'épiderme. Ainsi, la combinaison de ces différents facteurs semble déterminer, de manière coordonnée, la spécificité d'expression des différents gènes lors de la différenciation. Seuls quelques exemples de ces facteurs seront donnés ici.

On retrouve notamment des facteurs du complexe ubiquitaire AP-1 dont les principaux membres sont les protéines des familles Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) et Jun (c-Jun, JunB, JunD). Les protéines Fos et Jun s'associent sous forme d'homodimères et/ou d'hétérodimères et se lient à l'ADN au niveau des sites de liaison AP-1 présents au sein du promoteur ou dans des régions activatrices des gènes cibles pour induire leur transcription. Dans l'épiderme, l'expression et la combinaison de ces multiples facteurs de transcription varient selon les couches cellulaires (Figure 12). Les protéines AP-1 ont notamment été impliquées dans l'activation de la transcription des gènes codant l'involucrine, la loricrine, la FLG, la TGase 1 (Mehic *et al.*, 2005) ou encore les PADs 1-3 (voir paragraphe IV.E.1).

De plus, de récents travaux ont mis en évidence l'existence d'une région activatrice appelée « enhancer-923 » (car présente approximativement à 923 kb du site d'initiation de la transcription du gène S100A10 situé à l'extrémité 5' de l'EDC) qui contrôlerait l'activation transcriptionnelle de gènes de l'EDC en formant de multiples interactions avec leur promoteur via la fixation de facteurs de transcription AP-1 notamment (de Guzman *et al.*, 2010 ; Oh *et al.*, 2014).

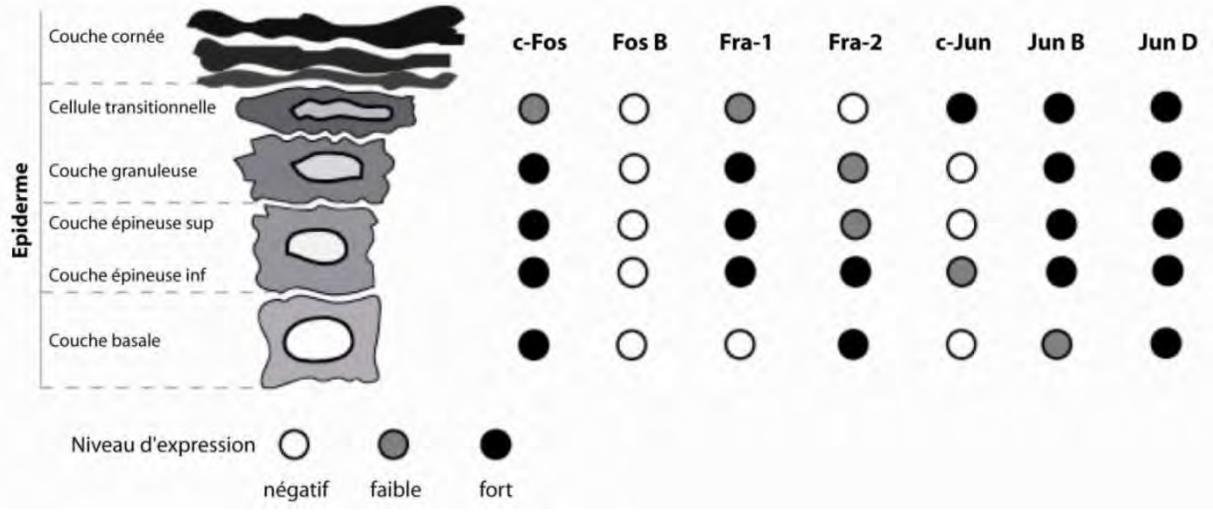


Figure 12 : Expression des facteurs de transcription AP-1 dans l'épiderme. Estimation semi-quantitative de l'intensité de fluorescence obtenue par immunofluorescence indirecte avec des anticorps spécifiques des différents facteurs de transcription sur coupe d'épiderme humain. D'après (Mehic *et al.*, 2005).

Aussi, différentes études ont mis en évidence le rôle majeur du facteur de transcription p63 dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation épidermiques. La protéine p63 est un membre de la famille p53 dont l'expression est restreinte aux épithéliums stratifiés. Ce facteur de transcription apparaît comme un régulateur essentiel de la balance prolifération/différenciation des kératinocytes. En effet, il est fortement exprimé au niveau de la couche basale et participe au maintien des cellules dans un état prolifératif, notamment via la régulation positive de l'expression du facteur de transcription MYC. D'autre part, p63 inhiberait la différenciation (de manière directe ou indirecte) via l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et contribuerait ainsi à la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire (Wu et Gidrol, 2014). Enfin, une étude récente a mis en évidence le rôle de p63 et d'une de ces cibles (le facteur de transcription Brt1) dans la relocalisation du locus de l'EDC de la périphérie vers l'intérieur du noyau durant la morphogenèse de l'épiderme. Cette relocalisation chromatinienne du locus étant requise pour l'activation des gènes de l'EDC (Mardaryev *et al.*, 2014), p63 semble donc jouer aussi un rôle majeur dans la régulation de l'EDC.

c. Le calcium

Dans l'épiderme, un gradient de calcium existe : la concentration calcique est faible au niveau de la couche basale, elle augmente progressivement au niveau des couches épineuse et granuleuse, puis diminue au niveau de la couche cornée (Menon *et al.*, 1985). Ce gradient joue un rôle essentiel dans le contrôle de la différenciation épidermique. De nombreuses études menées *in vitro* ont permis de démontrer le rôle primordial du calcium extracellulaire dans la régulation de la différenciation. En effet, des kératinocytes cultivés dans un milieu pauvre en calcium (<0,07 mM) présentent un phénotype de cellules basales avec une importante capacité de prolifération. L'augmentation de la concentration calcique (>1,5 mM *in vitro*) permet à elle seule d'initier le processus de différenciation. Ceci se traduit notamment par la mise en place des desmosomes engendrant l'apparition de nombreux contacts cellulaires, suivie par l'apparition de l'enveloppe cornée quelques jours après le début de la stimulation calcique (Pillai *et al.*, 1990 ; Celli *et al.*, 2016).

L'augmentation de la concentration en calcium induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans la cornification dont par exemple ceux de la FLG, l'involucrine, la loricrine et les PADs 1 à 3. Ceci se fait soit de manière directe par fixation du calcium au niveau d'éléments de réponse au calcium (CaRE) du promoteur de certains de ces gènes, soit de manière indirecte via l'activation de facteurs de transcription AP-1.

Selon le modèle proposé par Bikle *et al.*, une augmentation du calcium extracellulaire induit une augmentation du calcium intracellulaire selon le mécanisme suivant : la fixation du calcium

extracellulaire à des récepteurs transmembranaires présents à la surface des kératinocytes (CaR) induit l'activation de la voie des phospholipases C qui hydrolysent alors le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) pour générer de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 active la libération des stocks de calcium depuis le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, augmentant ainsi la concentration en calcium intracellulaire. Ceci a pour effet d'ouvrir des canaux calciques membranaires générant un influx calcique supplémentaire et augmentant encore davantage la concentration calcique dans la cellule. Le DAG ainsi que le calcium vont ensuite conduire via l'activation de la protéine kinase C (PKC) à la phosphorylation et à la translocation au noyau des facteurs de transcription de la famille AP-1 capables de se fixer aux régions promotrices de certains gènes de la différenciation et activant ainsi leur expression. En outre, le calcium intracellulaire active directement la transcription de certains gènes de la différenciation dont le promoteur contient un CaRE (Figure 13 ; Bikle *et al.*, 2004).

De plus, certaines protéines impliquées dans le processus de cornification présentent elles-mêmes des sites de fixation du calcium, comme par exemple les protéines S100 et SFTPs ainsi que les TGases et les PADs (voir paragraphe IV.C.2). Le calcium régule ainsi leur fonction de manière directe. Par ailleurs, il a aussi été démontré que la concentration en calcium régule la sécrétion des corps lamellaires (Menon *et al.*, 1994).

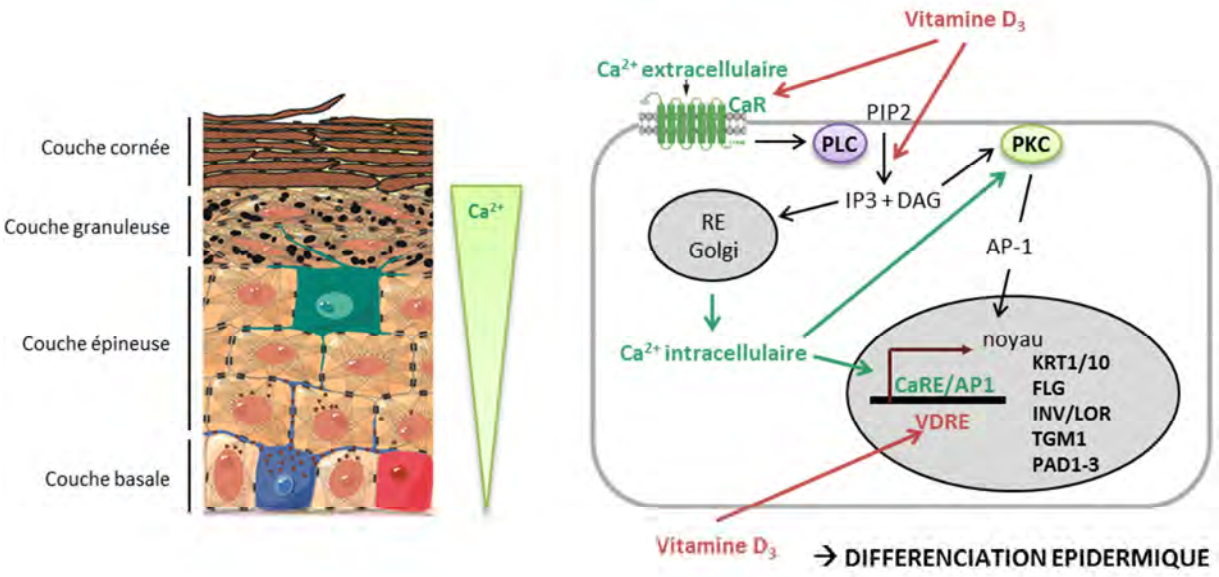


Figure 13: Régulation de la différenciation épidermique par synergie entre calcium et vitamine D3. La fixation du $Ca2^{+}$ extracellulaire sur le récepteur calcique (CaR) active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse alors le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). L'IP3 et le DAG vont permettre d'augmenter la concentration calcique intracellulaire via le réticulum endoplasmique et d'activer la protéine kinase C (PKC), entraînant l'activation de la transcription de gènes de la différenciation épidermique qui contiennent un élément de réponse au calcium (CaRE) dans leur(s) promoteur ou région(s) régulatrice(s). La vitamine D3 (1,25-(OH)2-D3) potentialise l'action du calcium en augmentant l'expression du CaR, en activant la PKC, et en activant la transcription de gènes possédant un élément de réponse à la vitamine D (VDRE) dans leur(s) promoteur ou région(s) régulatrice(s). Adapté de (Bike *et al.*, 2004).

d. La vitamine D

L'épiderme est la principale source de vitamine D3 (ou cholécalciférol) de l'organisme. En effet, la biosynthèse de la vitamine D est initiée dans l'épiderme où les rayons ultraviolets réagissent avec le 7-déhydrocholestérol, un dérivé du cholestérol présent au niveau de la membrane des kératinocytes, pour produire la pré-vitamine D3. Elle est ensuite principalement métabolisée au niveau du foie en 25-hydroxyvitamine D3, qui est à son tour transformée, au niveau des reins, en 1,25-dihydroxyvitamine D3, correspondant à la forme biologiquement active de la vitamine D3. La vitamine D3 diffuse alors dans l'ensemble de l'organisme. Cependant, dans les kératinocytes, la pré-vitamine D3 peut être directement métabolisée en 25-hydroxyvitamine D3 puis en 1,25-dihydroxyvitamine D3 (Bikle *et al.*, 2011). La vitamine D3 active se lie alors à son récepteur nucléaire appelé VDR (« vitamin D receptor ») qui s'associe à son tour aux récepteurs X des rétinoïdes (RXR). Ce complexe se fixe alors au niveau d'éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) situés dans les régions promotrices des gènes cibles, ce qui module leur transcription. La vitamine D3 agit ainsi sur la transcription de nombreux gènes de la différenciation épidermique tels que ceux codant l'involucrine, les PADs 1, 2 et 3 ou encore de nombreuses kallikréines (KLKs ; voir paragraphe I.D.3 ; Lu et *al.*, 2005). Outre ce mode d'action transcriptionnelle, la vitamine D3 peut également agir sur des voies de signalisation communes à celles du calcium. Elle peut notamment stimuler l'expression des récepteurs calciques CaR ainsi que l'expression de nombreuses phospholipases C (Figure 13 ; Bikle *et al.*, 2004).

3. La desquamation

En moyenne, un millier de cornéocytes par cm^2 se détachent de la surface de l'épiderme chaque heure par le processus de desquamation. Ce processus correspond à la dégradation progressive des composants extracellulaires des cornéodesmosomes par clivage protéolytique lors de la migration des cornéocytes vers la surface de l'épiderme. Les cornéocytes sont alors de moins en moins cohésifs (*stratum disjunctum*) et finissent par se décrocher du tissu.

De nombreuses protéases sont impliquées dans le processus de desquamation (Figure 14). Les mieux caractérisées sont les KLKs, une famille de protéases à sérine composée de 15 membres chez l'homme. Dans l'épiderme, au moins 9 KLKs (KLK1, KLK5-8, KLK10, KLK11, KLK13 et KLK14) sont retrouvées au niveau des couches granuleuse et cornée, parmi lesquelles la KLK5 (aussi appelée SCTE pour « stratum corneum tryptic enzyme »), la KLK7 (ou SCCE pour « stratum corneum chymotryptic enzyme), la KLK14 et la KLK8 sont les seules à avoir été détectées sous forme active à ce jour (Ovaere *et al.*, 2009 ; Prassa *et al.*, 2015). Les KLKs sont sécrétées par les corps lamellaires dans l'espace intercellulaire à la transition entre couche granuleuse et couche cornée, sous forme de zymogènes

inactifs. Elles sont ensuite activées par clivage de leur domaine amino-terminal par une enzyme de type trypsique. La KLK5 est capable de s'auto-activer et d'activer d'autres KLKs, notamment les KLK7 et KLK14. On parle de cascade d'activation des KLKs. La KLK5 serait responsable de l'initiation de celle-ci. Une fois activées, ces 3 protéases pourraient ainsi dégrader les différents constituants extracellulaires des cornéodesmosomes, à savoir la cornéodesmosine (CDSN), la desmogléine 1 et la desmocolline 1 comme cela a été démontré *in vitro* (Caubet *et al.*, 2004 ; Borgoño *et al.*, 2007). Concernant la KLK8, il semble qu'elle ne joue pas de rôle dans la desquamation en condition normale puisque les souris invalidées pour son gène ne présentent aucun phénotype épidermique notable (Kishibe *et al.*, 2007).

Outre le clivage de la proforme nécessaire à l'activation des KLKs, l'activité de ces protéases est régulée par la présence d'inhibiteurs spécifiques afin de prévenir une desquamation prématurée. L'un des mieux décrits est LEKTI (« lymphoepithelial kazal-type-related inhibitor »), un inhibiteur codé par le gène *SPINK5* dont des mutations engendrent chez l'homme une génodermatose sévère appelée syndrome de Netherton (OMIM #256500 ; Chavanas *et al.*, 2000). D'un point de vue biochimique, il a été montré *in vitro* que l'interaction entre LEKTI et les KLKs, notamment les KLK5 et 7, est régulée par le pH. Ainsi, l'acidification physiologique de la couche cornée de la profondeur vers la surface permettrait la dissociation progressive de ces complexes, les KLKs n'étant finalement actives que dans les couches les plus superficielles de l'épiderme où le pH, plus faible, est optimal (Deraison *et al.*, 2007). *A contrario*, une autre étude menée chez la souris montre qu'une augmentation du pH superficiel (par applications topiques de deux solutions basiques différentes, contenant du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène ou du 1,1,3,3-Tetramethylguanidine) engendrerait une augmentation anormale de la desquamation via une activation des protéases à sérine (Hachem

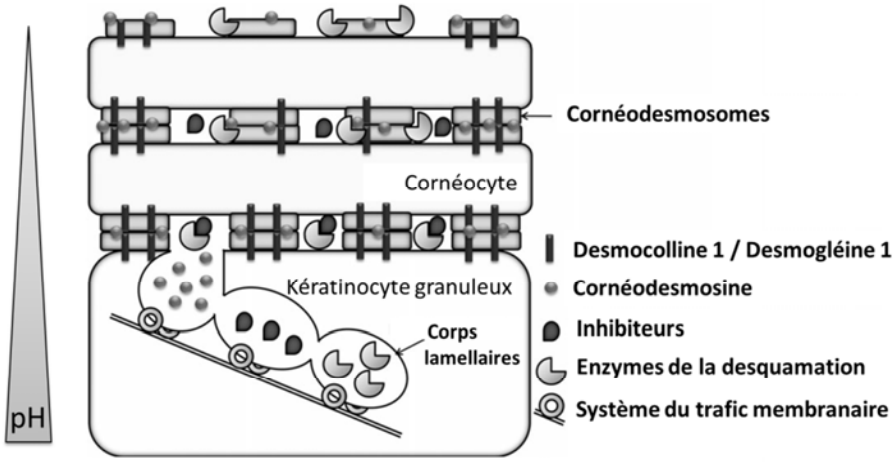


Figure 14 : Modèle du processus de desquamation. Les enzymes de la desquamation, leurs inhibiteurs et la cornéodesmosine sont transportés dans des corps lamellaires distincts afin de protéger la cornéodesmosine d'une dégradation trop précoce. Une fois sécrétées dans l'espace intercornéocytaire, les enzymes sont, dans un premier temps, inactivées par la présence de leur inhibiteur afin de prévenir une desquamation prématurée. Dans la partie la plus superficielle de l'épiderme, les inhibiteurs se dissocient des enzymes du fait de la diminution du pH et attaquent alors les composants des cornéodesmosomes (cornéodesmosine, desmogléine 1, desmocolline 1). D'après (Ishida-Yamamoto et Kishibe, 2011).

et al., 2003). Le pH semble donc réguler de manière complexe l'activité des enzymes de la desquamation.

Par ailleurs, les protéases et leurs substrats sont pris en charge séparément par des corps lamellaires distincts, ce qui permet de protéger les composants cornéodesmosomaux d'une dégradation prématurée pendant leur transport (Ishida-Yamamoto *et al.*, 2004). Enfin, il a été proposé que la présence de jonctions serrées dans la partie profonde de la couche cornée, réparties de part et d'autre des cornéodesmosomes de surface, serait un mécanisme supplémentaire pour protéger ces derniers d'une protéolyse précoce (Igawa *et al.*, 2011).

D'autres protéases et inhibiteurs de protéases interviennent aussi dans le processus de desquamation, comme par exemple la cathepsine L2 (ou cathepsine-V), une protéase à cystéine, et la cystatine M/E, un inhibiteur de protéases à cystéine (Zeeuwen *et al.*, 2009).

La desquamation est donc un processus protéolytique complexe régulé de manière spatio-temporelle, dans lequel une cascade d'activation de protéases et de nombreux inhibiteurs spécifiques interviennent.

E. La cornification : étape ultime de la différenciation épidermique

Dernière étape de la différenciation épidermique, la cornification est un processus de mort cellulaire programmée unique à but fonctionnel. Elle correspond à la transformation des kératinocytes granuleux en cornéocytes, kératinocytes considérés comme morts, puisqu'ils ne présentent plus d'activité transcriptionnelle, mais néanmoins indispensables. La cornification se traduit par la dégradation de l'ADN, la disparition du noyau et la lyse des autres organelles, ainsi que par des modifications morphologiques et biochimiques très spécifiques. Le réseau de filaments de kératines s'agrège pour former une matrice fibreuse dense remplaçant le cytoplasme, simultanément les kératinocytes s'aplatissent. Les espaces extracellulaires se remplissent de lipides organisés en lamelles. La membrane plasmique est remplacée par l'enveloppe cornée, une coque lipido-protéique très résistante et insoluble. Et les desmosomes se transforment en cornéodesmosomes. Enfin, la production des acides aminés du FNH au sein des cornéocytes les plus superficiels constitue une des étapes ultimes de la cornification.

1. Formation de la matrice fibreuse intracornéocytaire de kératines

a. Les kératines de l'épiderme

Les kératines sont les composants des filaments intermédiaires des cellules épithéliales. Ce sont les protéines structurales principales de l'épiderme. On distingue deux types de kératines : les

kératines de type I qui sont acides, nommées kératines 9 à 28 dans les épithéliums, et les kératines de type II qui sont basiques à neutres, nommées kératines 1 à 8 et 71 à 80 dans les épithéliums (Figure 15A). Chez l'homme, les gènes des kératines de type I sont regroupés au niveau du locus 17q21.2 et ceux des kératines de type II au niveau du locus 12q13.3, à l'exception du gène de la kératine 18 (type I) qui est situé dans le locus 12q13.3 (Schweizer *et al.*, 2006). Elles présentent toutes la même organisation structurale avec un domaine central en hélice-α d'environ 310 acides aminés, flanqué de deux domaines globulaires non hélicoïdaux de taille et composition très variables (Coulombe, 1993).

Les filaments intermédiaires sont générés par la polymérisation spontanée de kératines de type I et II. Une kératine acide et une kératine basique s'assemblent tout d'abord par enroulement de leurs domaines centraux pour former un hétérodimère. Les hétérodimères s'associent alors de manière antiparallèle pour former des tétramères qui se lient les uns aux autres par leurs extrémités permettant la formation et l'élongation d'un protofilament. L'association latérale de 8 protofilaments puis leur compaction donnent finalement naissance aux filaments intermédiaires de kératines (Figure 15B ; Homberg et Magin, 2014). Les filaments intermédiaires forment ainsi un vaste réseau qui s'étend dans tout le cytoplasme des cellules depuis la membrane nucléaire jusqu'à la membrane plasmique au niveau de laquelle ils sont liés aux protéines desmosomales.

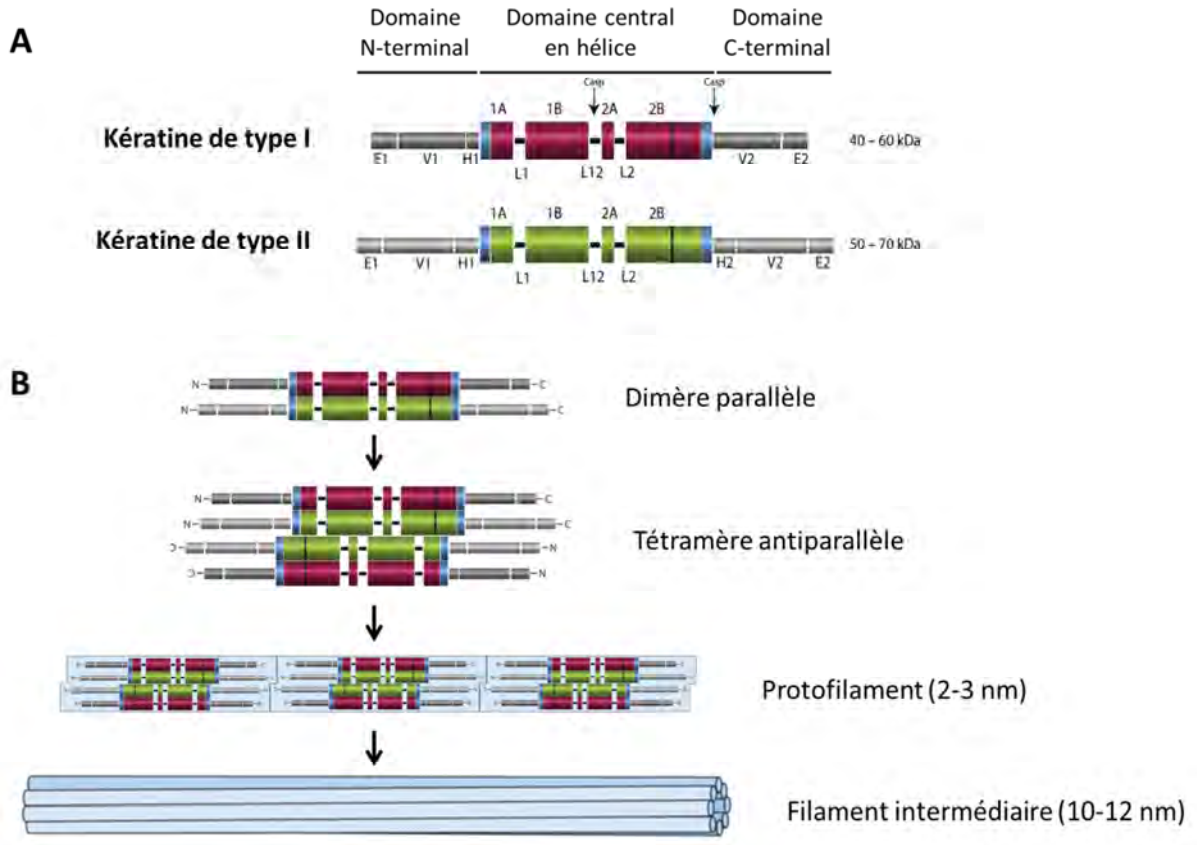


Figure 15 : Kératines de type I et II et leur assemblage en filaments intermédiaires. (A) Structures des kératines de type I et II. (B) Mécanisme d'assemblage des kératines aboutissant à la formation des filaments intermédiaires. Adapté de (Homberg et Magin, 2014).

Dans l'épiderme, les kératinocytes expriment différentes kératines en fonction de leur état de différenciation et du territoire anatomique (Tableau 1). Les kératines majoritaires de l'épiderme sont K5 et K14 dans les cellules non différenciées de la couche basale qui sont remplacées par K1 et K10 dans les cellules des couches suprabasales. L'expression de kératines additionnelles vient ensuite en complément de celles-ci. Dans les couches basales, la kératine K15 est notamment exprimée et a été décrite comme un marqueur des cellules souches mais ceci reste controversé (Bose *et al.*, 2013). On retrouve aussi la kératine 78 exprimée dans la couche basale et les premières assises épineuses (Langbein *et al.*, 2015) alors que les kératines 2 et 80 sont exprimées à partir des derniers kératinocytes épineux (Collin *et al.*, 1992 ; Langbein *et al.*, 2010). La kératine 23 est aussi retrouvée dans les assises suprabasales (Mattiuzzo *et al.*, 2011). La kératine 9 est quant à elle spécifique des kératinocytes suprabasaux de l'épiderme palmo-plantaire. Enfin l'expression des kératines 6, 16 et 17 est induite dans les kératinocytes possédant un taux de prolifération élevé, comme c'est le cas dans l'épiderme palmo-plantaire, ou lorsque l'épiderme est soumis à des lésions comme lors d'une inflammation, de la cicatrisation ou après irradiation par des rayonnements ultraviolets (Paladini *et al.*, 1996, Moll *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Distribution des kératines dans l'épiderme

Epiderme		Kératine de type I (acide)	Kératine de type II (basique)
Non palmo-plantaire	Kératinocytes basaux	**K14**, K15	**K5**, K78
	Kératinocytes suprabasaux	**K10**, K23	**K1**, K2, K80
Palmo-plantaire	Kératinocytes basaux	K14	K5, K78
	Kératinocytes suprabasaux	K9, K10, K16, K17	K1, K2, K80, K6a, K6b
Hyperprolifératif		K16, K17	K6a, K6b

b. Formation de la matrice fibreuse

Au cours de la cornification, le réseau de filaments intermédiaires est remanié pour former la matrice fibreuse dense intracornéocytaire. Les filaments de kératines s'agrègent et s'ordonnent parallèlement à la surface, ce qui serait à l'origine de l'aplatissement des cornéocytes. Cette agrégation est favorisée par l'interaction de la FLG avec les filaments intermédiaires (filaggrine pour filament aggregating protein ; voir chapitre II). De plus, les kératines subissent un certain nombre de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la désimination (voir paragraphe IV.F.1), qui jouent probablement un rôle important dans la réorganisation des filaments intermédiaires lors de la différenciation épidermique. La matrice, déjà liée aux (cornéo)desmosomes, est finalement fixée à l'enveloppe cornée sous l'action des TGases formant ainsi une structure stable indispensable à la résistance de la couche cornée.

2. Formation de l'enveloppe cornée

La transformation de la membrane plasmique en enveloppe cornée est une étape majeure de la cornification et joue un rôle primordial dans la résistance mécanique de l'épiderme. L'enveloppe cornée (ou enveloppe cornifiée) est composée d'une part d'une structure protéique hautement rigide et insoluble, résistante aux détergents et aux agents dénaturants et réducteurs, et d'autre part d'une structure lipidique extracellulaire constituée d'une monocouche de céramides qui sert d'ancrage aux lipides intercornéocytaires. La résistance de cet échafaudage est due à l'assemblage progressif et covalent de précurseurs protéiques et lipidiques grâce à l'action des TGases.

a. Les composants protéiques de l'enveloppe cornée

L'enveloppe cornée est constituée d'une grande variété de protéines différentes. La composition de l'enveloppe cornée varie en fonction des régions anatomiques et détermine les propriétés mécaniques de l'enveloppe. La plupart des composants de l'enveloppe cornée sont des protéines dont les gènes appartiennent à l'EDC (voir paragraphe I.D.2.a). Les deux protéines majeures sont l'involucrine et la loricrine, mais on retrouve aussi en quantité importante l'envoplakine, la périplakine et des protéines de la famille des SPRRs et des LCEs, ainsi que de nombreuses autres protéines telles que la répétine, l'hornerine, la FLG et certaines protéines S100.

La loricrine est exprimée plus tardivement que l'involucrine, uniquement au niveau de la couche granuleuse. C'est la protéine largement majoritaire de l'enveloppe cornée de l'épiderme interfolliculaire puisqu'elle constitue environ 80% de sa masse protéique. La loricrine présente la particularité d'être très riche en glycine et sérine (respectivement 47% et 23%). Des acides aminés aromatiques ou aliphatiques (notamment des résidus phénylalanine, tyrosine, isoleucine et valine) sont dispersés au sein de ces régions riches en glycine et sérine et interagissent entre eux pour former de larges boucles. Cette conformation atypique confèrerait à la loricrine une grande flexibilité. De plus, ces boucles sont séparées par des régions riches en glutamine et lysine, constituant probablement les sites de liaison aux autres protéines de l'enveloppe cornée par l'action des TGases (Hohl *et al.*, 1991).

L'involucrine est une protéine de 585 acides aminés constituée de la répétition en tandem de courtes séquences (39 répétitions de 10 acides aminés). Elle est exprimée précocement dans le cytoplasme des cellules différenciées, à partir de la moitié de la couche épineuse. Au niveau de la couche granuleuse, elle est relocalisée à la périphérie des cellules avant d'être incorporée à l'enveloppe cornée. Elle représente environ 5 % de sa masse.

L'envoplakine et la périplakine appartiennent à la famille des plakines et sont à ce titre des composants de la plaque desmosomale. L'envoplakine est principalement exprimée dans les

kératinocytes les plus différenciés alors que la périplakine est détectée dans tout l'épiderme. Ces deux plakines permettent l'ancrage des filaments intermédiaires de kératines aux desmosomes et sont incorporées à l'enveloppe cornée précocement lors de sa formation (Kalinin *et al.*, 2002).

b. Les transglutaminases épidermiques

Chez l'homme, la famille des TGases (EC 2.3.2.13) est composée de neuf membres. Ce sont des enzymes aux multiples fonctions (Lorand et Graham, 2003). Dans l'épiderme, au moins quatre TGases sont exprimées : les TGases 1, 2, 3 et 5. Alors que les TGases 1, 3 et 5 ont été impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée, aucune donnée ne permet de démontrer que la TGase 2 participe à ce processus. Les TGases 1, 3 et 5 sont toutes les trois synthétisées sous forme de pro-enzymes et sont activées par clivage protéolytique. Leur expression est induite par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. De plus, les TGases possédant des sites de fixation du calcium, leur activité est elle-même dépendante du calcium. La TGase 1 est exprimée dans les couches épineuse et granuleuse et est ancrée à la face cytosolique de la membrane plasmique. De par sa localisation sous-membranaire, elle joue un rôle primordial dans l'assemblage des composants de l'enveloppe cornée. Les TGases 3 et 5 sont elles aussi synthétisées dans les couches épineuse et granuleuse et sont cytosoliques (Eckert *et al.*, 2005). La TGase 3 permet d'oligomériser des précurseurs protéiques qui seront ensuite liés entre eux par la TGase 1 membranaire. La TGase 5 peut former des liaisons avec de nombreux précurseurs protéiques et pourrait également jouer un rôle dans les stades précoces de formation de l'enveloppe cornée au niveau des plaques desmosomales.

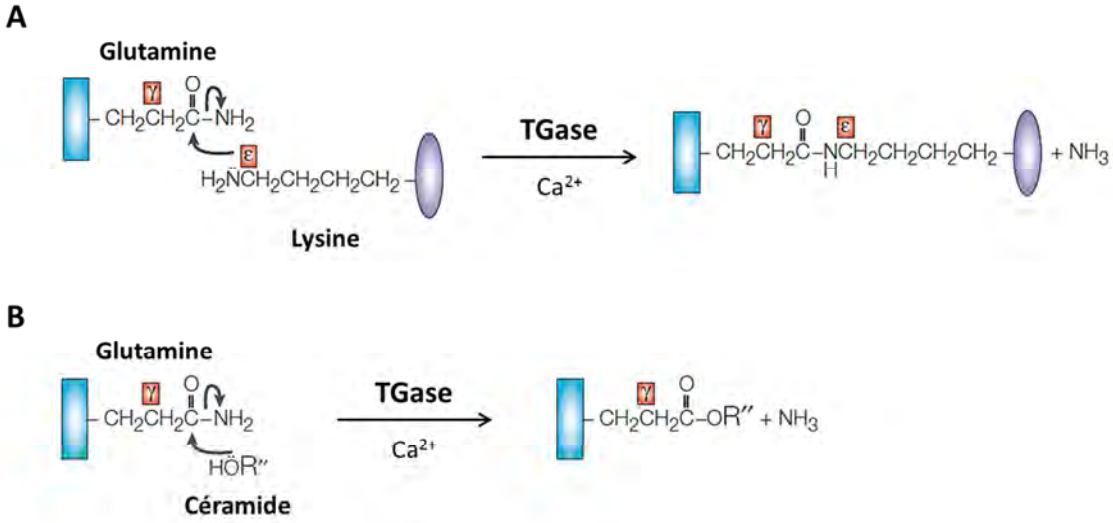


Figure 16 : Réactions de transamidation et d'estérification catalysées par les transglutaminases. (A) Les TGases catalysent la formation de liaison covalente ε-(γ-glutamyl)-lysine entre un résidu lysine (donneur d'amine) et un résidu glutamine (accepteur d'amine) par transamidation. (B) Les TGases catalysent aussi la formation de liaison covalente entre un résidu glutamine d'une protéine et le groupement OH d'un céramide par transestérification. D'après (Lorand et Graham, 2003).

Les TGases catalysent la formation de liaisons covalentes par transamidation entre un résidu glutamine et un résidu lysine des protéines précurseurs de l'enveloppe cornée (Figure 16A). Ces liaisons peuvent être intra- ou interchaînes. La TGase 1 est de plus capable de catalyser une réaction de transestérification entre un résidu glutamine d'une protéine et le groupement hydroxyl- d'un céramide (Figure 16B).

c. Les étapes de la formation de l'enveloppe cornée

L'assemblage de l'enveloppe cornée est un processus séquentiel initié par l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Elle induit l'expression génique des précurseurs de l'enveloppe cornée et des TGases ainsi que l'activation de ces dernières. Selon le modèle proposé par Candi *et al.*, la formation de l'enveloppe cornée se déroule en trois étapes : initiation, formation de l'enveloppe lipidique et renforcement (Figure 17 ; Kalinin *et al.*, 2002 ; Candi *et al.*, 2005).

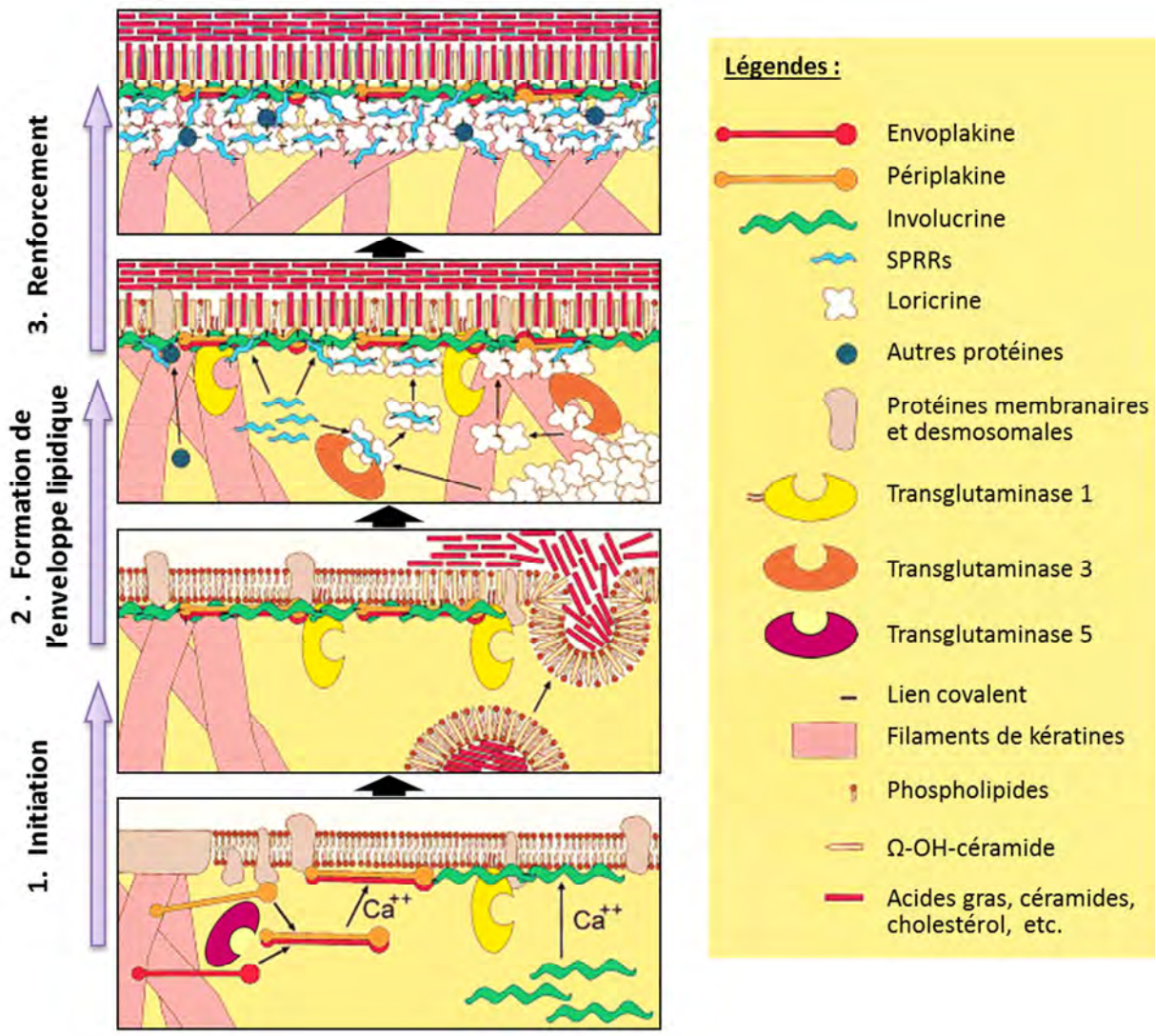


Figure 17 : Les trois étapes de la formation de l'enveloppe cornée : initiation de l'échafaudage protéique, formation de l'enveloppe lipidique et renforcement. Adapté de (Kalinin *et al.*, 2002).

Initiation : Dans les kératinocytes épineux, l'envoplakine et la périplakine s'associent en hétérodimères stables sous l'action de la TGase 5 et s'accumulent au niveau de la face interne de la membrane plasmique. A ce niveau, la TGase 1 sous-membranaire forme des liaisons covalentes entre involucrine et envoplakine, ce qui initie la formation d'un échafaudage protéique très rigide qui s'étend sur toute la longueur de la membrane plasmique et s'ancre aux plaques desmosomales.

Formation de l'enveloppe lipidique : Dans un second temps, l'enveloppe lipidique se met en place. À la transition entre couches granuleuse et cornée, les corps lamellaires déversent leur contenu dans l'espace intercornéocytaire, et notamment les précurseurs lipidiques de l'enveloppe cornée. Les phopholipides de la membrane plasmique sont alors remplacés par des ω-hydroxy-céramides qui sont liés à l'involucrine par la TGase 1.

Renforcement : En parallèle de la mise en place de l'enveloppe lipidique, la structure protéique intracellulaire de l'enveloppe cornée est renforcée par l'ajout d'autres protéines. De nombreuses molécules de loricrine sont liées entre elles et à d'autres protéines comme les SPRRs via l'activité de la TGase 3 cytoplasmique, puis sont transférées à la périphérie de la cellule où elles sont liées à l'échafaudage initial par la TGase 1. La loricrine est supposée, de par sa structure particulière, conférer à l'enveloppe cornée une certaine flexibilité. D'autres protéines sont encore incorporées à cette enveloppe telles que les protéines LCE, les kératines, la FLG et des protéines S100.

3. Mise en place des lipides intercornéocytaires

L'espace intercornéocytaire se remplit de lipides au cours de la cornification. Ces lipides sont organisés en feuillets et représentent près de 15% du poids sec de la couche cornée. Ils forment une barrière hydrophobe essentielle limitant la perte d'eau de l'organisme (pour revue : Van Smeden *et al.*, 2014).

a. Composition et origine des lipides intercornéocytaires

La composition en lipides de la couche cornée est très différente de celle que l'on retrouve dans les membranes biologiques. Elle est très pauvre en phospholipides et est principalement constituée de céramides (50% de la masse), de cholestérol (25%) et d'acides gras libres (10-20%) (Weerheim et Ponec, 2001). On retrouve également d'autres espèces lipidiques en faible quantité (moins de 5%) dont la plus importante est le sulfate de cholestérol. Les lipides de la couche cornée sont majoritairement produits par les kératinocytes. Des précurseurs lipidiques sont synthétisés au niveau de la couche granuleuse puis déversés dans les espaces intercornéocytaires par les corps lamellaires, en parallèle de lipases nécessaires à leur maturation (Figure 18). On peut noter que les glandes

sébacées constituent également une source de lipides puisque le sébum est constitué de 60% de triglycérides et 30% de cires dont 10 à 15% de squalènes.

Les céramides : Une grande diversité de céramides entre dans la composition lipidique de la couche cornée. Ils représentent à eux seuls environ la moitié des lipides intercornéocytaires. Les céramides sont constitués d'une base sphingoïde liée à un acide gras par une liaison amide. Douze sous-classes de céramides ont été retrouvées dans la couche cornée, différant les unes des autres par la nature de la base sphingoïde et par la nature et la longueur de la chaîne hydrocarbonée. La voie principale de synthèse des céramides repose sur le catabolisme de précurseurs lipidiques véhiculés par les corps lamellaires. En effet, les glucosylcéramides et les sphingomyélines sont respectivement dégradés par la β-glucocérébrosidase et la sphingomyélinase au sein de l'espace intercornéocytaire. Une deuxième voie correspond à une synthèse *de novo* à partir de la condensation de sérine et de palmitoyl-CoA faisant intervenir plusieurs enzymes.

Le cholestérol : Le cholestérol est synthétisé dans les couches profondes de l'épiderme. Toutefois, une petite proportion est issue de la réabsorption par les kératinocytes basaux à partir de la circulation sanguine. Au sein de la couche granuleuse, une partie du cholestérol est pris en charge par les corps lamellaires et le reste est converti en sulfate de cholestérol par la sulfotransférase. Le caractère hydrophobe du sulfate de cholestérol lui permet de franchir la membrane plasmique pour rejoindre l'espace intercornéocytaire où il est à nouveau converti en cholestérol sous l'action de la stéroïde sulfatase. En outre, la sulfatase des stéroïdes et le sulfate de cholestérol pourrait jouer un rôle dans la régulation de la desquamation puisque ce dernier est un inhibiteur des protéases à sérine.

Les acides gras : La couche cornée contient une trentaine d'acides gras libres différents. Ceux-ci présentent de longues chaînes carbonées (C12 à C24) et sont majoritairement saturés, mais on trouve aussi des acides gras mono-insaturés, poly-saturés et hydroxylés. Les acides gras libres principaux sont : l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1ω9), l'acide béhénique (C22:0) et l'acide lignocérique (C24:0). Ces acides gras libres proviennent quasi-exclusivement d'une synthèse *de novo* ayant lieu dans l'espace intercornéocytaire via l'hydrolyse des glycérophospholipides par des phospholipases A_2.

b. Organisation des lamellae lipidiques

Dans les années 90, des analyses par microscopie électronique à transmission ont permis de mettre en évidence l'organisation des lipides intercornéocytaires en *lamellae*, apparaissant comme une alternance de bandes transparentes et denses aux électrons, parallèles à la surface des cornéocytes (Figure 8B). Les lipides forment ainsi de multiples couches superposées les unes aux

autres. Ils sont disposés perpendiculairement à la surface des cornéocytes et parallèles les uns aux autres. Les bandes denses aux électrons correspondent à l'alignement des têtes polaires des céramides et des groupements hydroxyles des acides gras et du cholestérol. Les bandes claires correspondent aux chaînes hydrocarbonées apolaires de ces lipides, alignées et positionnées en vis-à-vis. Des expériences *in vitro* ont démontré que la composition lipidique spécifique de la couche cornée permet à elle seule cet arrangement particulier des lipides en *lamellae* (De Jager *et al.*, 2005). Finalement, la microscopie électronique a également permis de visualiser que les lipides s'organisent en feuillets dès leur présence dans les corps lamellaires (Figure 7B). Après leur sécrétion dans l'espace intercornéocytaire, ces feuillets fusionneraient bout à bout afin de former les *lamellae* lipidiques.

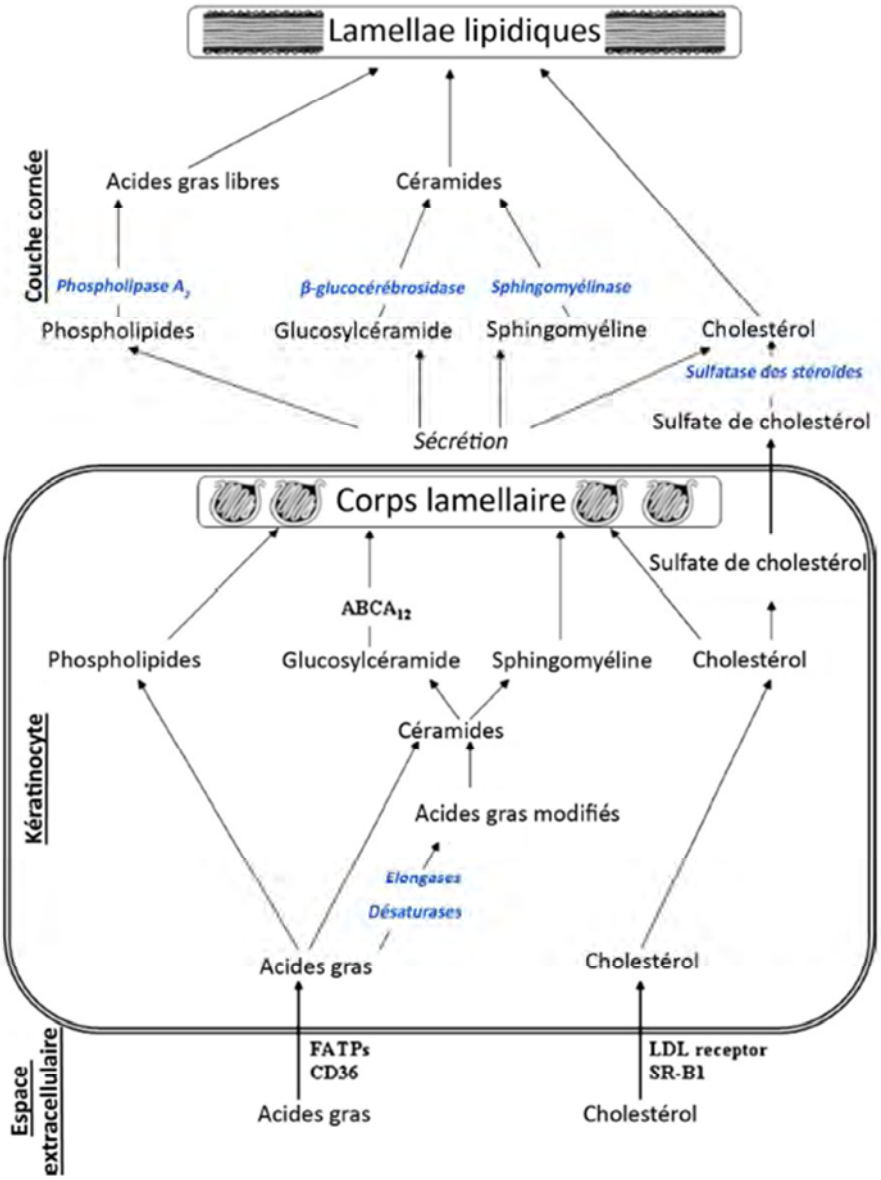


Figure 18 : Mécanisme de synthèse des lipides constituant les *lamellae* lipidiques intercornéocytaires. Voir le texte pour détails. D'après (Feingold *et al.*, 2007).

4. Transformation des desmosomes en cornéodesmosomes

Les desmosomes sont présents dans toutes les couches de l'épiderme et sont soumis à un certain nombre de modifications au cours de la différenciation épidermique. A mesure que les kératinocytes migrent vers la surface, le nombre de desmosomes augmente tandis que leur taille diminue (McMillan *et al.*, 2003). Au cours de la cornification, les desmosomes subissent d'importants réarrangements structuraux et prennent alors le nom de cornéodesmosomes (Figure 19). Desmosomes et cornéodesmosomes jouent un rôle important dans la résistance de l'épiderme en assurant la cohésion des kératinocytes vivants et des cornéocytes.

Du point de vue ultrastructural, les desmosomes sont constitués d'un cœur extracellulaire encadré par deux plaques symétriques présentes chacune sur la face interne de la membrane plasmique de deux cellules adjacentes. Le cœur desmosomal est composé de la partie extracellulaire des cadhérines desmosomales, glycoprotéines transmembranaires dépendantes du calcium divisées en 2 sous-familles : les desmocollines et les desmogléines. Les desmocollines et desmogléines de deux cellules voisines s'associeraient entre elles de façon homophile via leur domaine amino-terminal extracellulaire. Via leur domaine carboxy-terminal intracellulaire, les cadhérines interagissent avec les protéines de la plaque desmosomale, dont la desmoplakine, la périplakine,

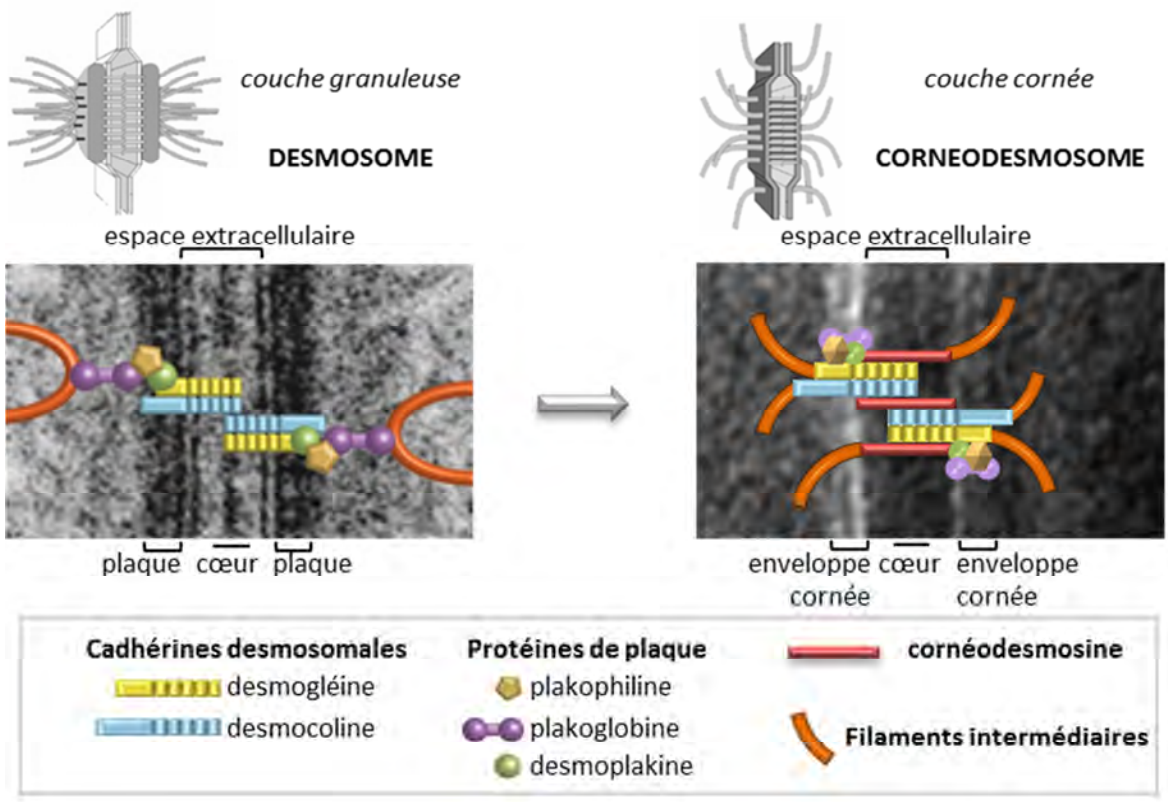


Figure 19 : La transformation des desmosomes en cornéodesmosomes. Lors de la cornification, la plaque desmosomale cytoplasmique est incorporée à l'enveloppe cornée et la cornéodesmosine vient densifier le cœur extracellulaire. Schéma original de C. Vincent et M. Reynier. Adapté de (Green et Simpson, 2007).

l'envoplakine ainsi que la plakoglobine et les plakophilines (protéines à domaine armadillo). Ces dernières sont elles-mêmes associées aux filaments intermédiaires de kératines par leur extrémité carboxy-terminale. L'expression des différentes isoformes de protéines desmosomales varie au cours de la différenciation épidermique.

À la transition entre couche granuleuse et couche cornée, la plaque desmosomale s'incorpore à l'enveloppe cornée et le cœur extracellulaire se densifie. Ceci s'accompagne de l'intégration d'une protéine supplémentaire : la CDSN. Cette protéine est exprimée au sein des kératinocytes granuleux où elle est stockée dans les corps lamellaires. Lors de la sécrétion de ces vésicules, la CDSN s'intègre au niveau de la partie extracellulaire des desmosomes. La CDSN est la seule protéine identifiée à ce jour comme étant spécifique des cornéodesmosomes. Elle renforce la cohésion intercornéocytaire (Jonca *et al.*, 2002 ; Jonca et *al.*, 2011).

5. Production du facteur naturel d'hydratation (FNH)

Le FNH est un mélange de molécules hautement hygroscopiques jouant un rôle primordial dans le maintien de l'hydratation des assises superficielles de la couche cornée. Le FNH est présent en forte concentration au sein des cornéocytes superficiels puisqu'il représente jusqu'à 30% de leur masse sèche (Rawling et Harding, 2004).

a. Origine et composition du FNH

Le FNH est constitué à plus de 50% d'acides aminés et de dérivés d'acides aminés libres auxquels s'ajoutent de l'acide lactique, des sucres, de l'urée, des ions inorganiques et d'autres petites molécules à fort pouvoir humectant (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition du FNH.

Constituants du FNH	Pourcentage (%)
Acides aminés libres et dérivés	**52**
dont acide pyrrolidone carboxylique (PCA)	12
Acide lactique	12
Sucres	8,5
Urée	7
Chlorure	6
Sodium	5
Potassium	4
Ammoniaque, acide urique, glucosamine, créatine	1,5
Calcium	1,5
Magnésium	1,5
Phosphate	0,5
Citrate, formate	0,5

D'après (Rawlings et Harding, 2004).

Les acides aminés et dérivés du FNH proviennent majoritairement de la protéolyse de la FLG (voir chapitre II.C). Cependant, la filaggrine-2, une protéine de la famille des SFTPs apparentée à la FLG et présentant une composition comparable en acides aminés, pourrait aussi participer à la production des acides aminés et dérivés du FNH (Tableau 3 ; Wu *et al.*, 2009 ; Hsu *et al.*, 2011 ; Le Lamer *et al.*, 2015). Les acides aminés majoritaires du FNH sont la sérine, la glycine, l'arginine et sa forme modifiée par les PADs : la citrulline (voir chapitre IV). La protéolyse de la FLG aboutit de plus à la libération d'une grande quantité de glutamine et d'histidine qui sont modifiées au niveau de la couche cornée pour former deux dérivés hydrosolubles : l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA) et l'acide urocanique (UCA), deux composants majeurs du FNH. Le PCA, qui dérive de la glutamine, se forme spontanément dans les cornéocytes alors que l'UCA est formé à partir de l'histidine sous l'action d'une enzyme cytoplasmique : l'histidase.

Le glucose, sucre majoritaire du FNH, serait essentiellement produit par l'hydrolyse des glucosylcéramides ayant lieu dans la couche cornée profonde lors de la formation des *lamellae* lipidiques intercornéocytaires (voir paragraphe I.E.3). Enfin, l'acide lactique et l'urée proviendraient au moins en partie de la sueur sécrétée par les glandes sudoripares (Rawlings et Matts, 2005).

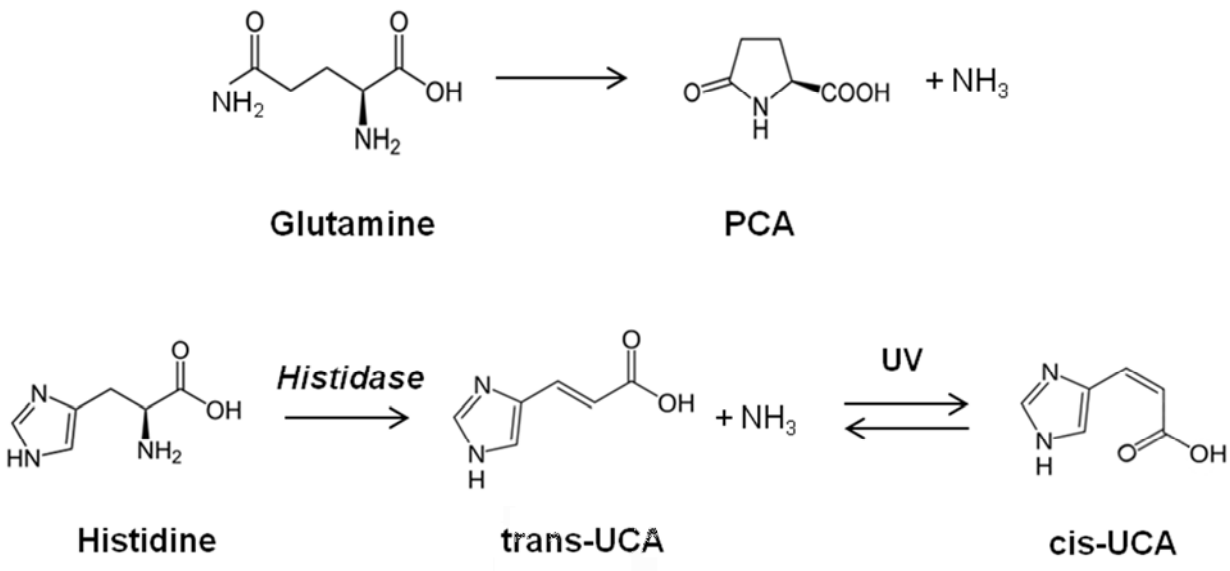


Figure 20 : Formation de l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA) et de l'acide urocanique (UCA) respectivement à partir de la glutamine et de l'histidine.

b. Rôle du FNH

Les composants du FNH jouent de multiples rôles dans l'homéostasie et la fonction de barrière de l'épiderme (Figure 21).

Ils jouent tout d'abord une fonction majeure dans l'hydratation de la couche cornée. Dans les conditions physiologiques normales, un gradient hydrique est mis en place dans l'épiderme : alors que les couches profondes présentent une teneur en eau de l'ordre de 70%, la couche cornée en contient environ 20% seulement (Rawlings et Matts, 2005). Ces 20% d'eau, principalement retenus par les composants du FNH, sont essentiels au maintien de l'activité métabolique de la couche cornée et donc à l'homéostasie épidermique. Au sein des cornéocytes, ce sont principalement les acides aminés et dérivés du FNH qui jouent le rôle d'humectant, et en particulier le PCA qui présente un fort pouvoir hygroscopique.

Les acides aminés neutres à basiques du FNH participent aussi à la plasticité de la couche cornée en interagissant avec les filaments de kératines par l'intermédiaire de liaisons ioniques. Ceci engendrerait une diminution des mouvements de l'eau au sein de la couche cornée et réduirait les forces d'interaction entre les filaments de kératines rendant ainsi le tissu plus élastique (Jokura *et al.*, 1995).

De plus, les acides aminés et dérivés d'acides aminés du FNH jouent un rôle dans la défense antimicrobienne et dans la régulation de l'activité d'enzymes impliquées dans la desquamation et la modification des lipides intercornéocytaires, en participant à l'acidification de la couche cornée. *In vitro*, la croissance de *Staphylococcus aureus*, espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus* et fréquemment retrouvée lors des infections cutanées, est altérée par la présence d'UCA et de PCA notamment via une acidification du milieu de culture (Miajlovic *et al.*, 2010). Pendant longtemps, il a été admis que l'UCA joue un rôle majeur dans la régulation du pH de la couche cornée. Mais il a récemment été montré que des souris déficientes en histidase ne présentent pas d'altération du pH de la couche cornée, ceci suggérant que l'UCA n'est pas essentiel à l'acidification de la couche cornée (Fluhr *et al.*, 2010). Cependant, chez des individus porteurs de mutations non-sens de *FLG*, la quantité de FNH de la couche cornée est plus faible que la normale et le pH épidermique est plus élevé. En outre, cette valeur de pH est inversement corrélée à la quantité de FNH. En conséquence, l'épiderme de ces individus présente une importante altération de la composition et de l'organisation des *lamellae* lipidiques intercornéocytaires (Gruber *et al.*, 2011 ; Jungersted *et al.*, 2010 ; Kezic *et al.*, 2011).

Enfin, l'UCA assure le rôle de filtre solaire naturel. En effet, il est produit sous sa forme *trans*, un chromophore capable d'absorber une partie des rayonnements ultraviolets et qui se photoisomérise alors pour former de l'acide cis-urocanique. Pour preuve, des souris présentant une mutation

spontanée pour le gène de l'histidase, induisant une perte d'expression détectable de celle-ci et un niveau bas d'UCA, montrent une augmentation de leur sensibilité aux rayonnements ultraviolets (Barresi *et al.*, 2010).

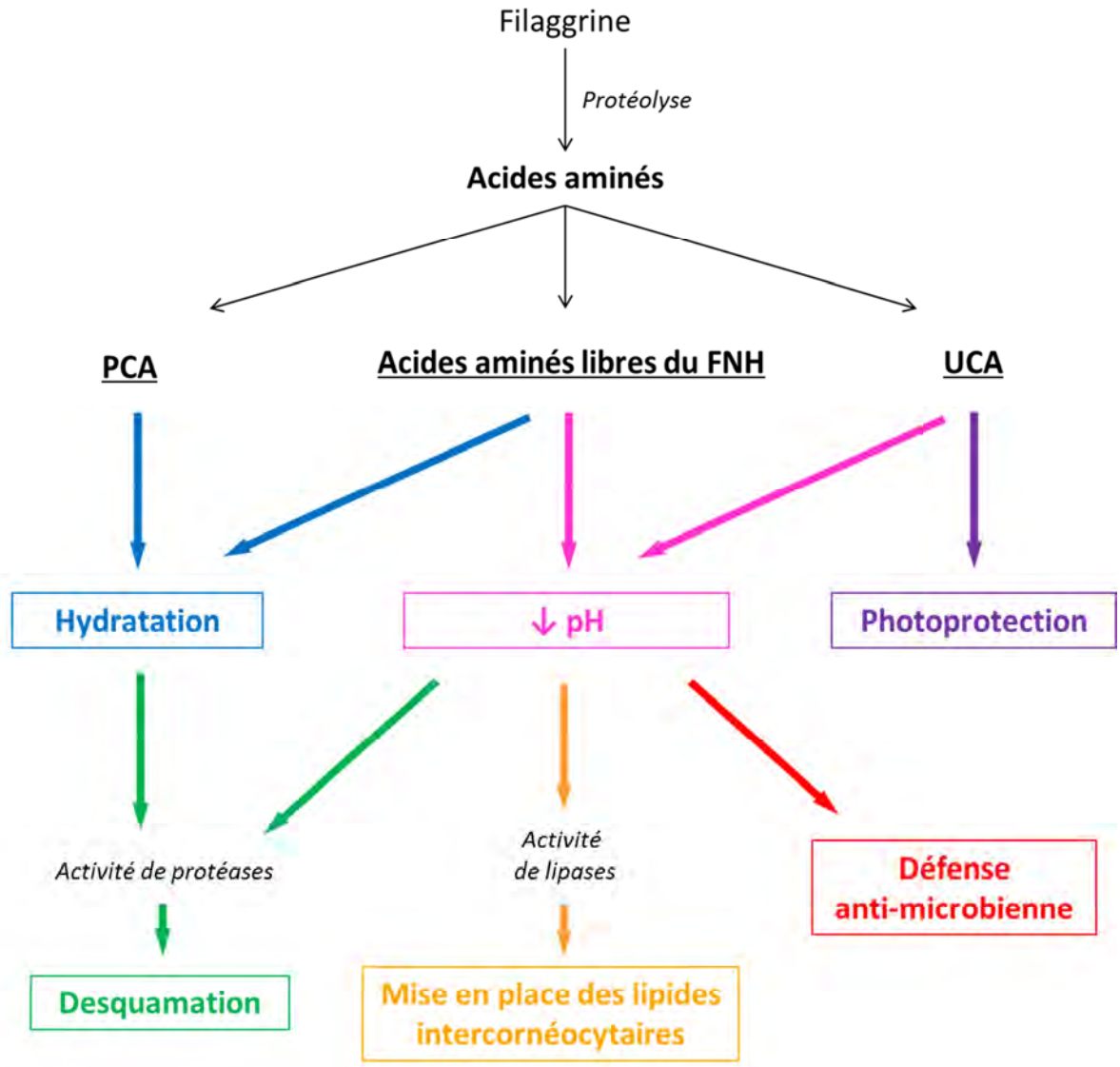


Figure 21 : Rôles multiples des acides aminés et des dérivés d'acides aminés du facteur naturel d'hydratation dans l'homéostasie et la fonction barrière de l'épiderme. Voir le texte pour détails.

II. LA FILAGGRINE

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la FLG intervient à plusieurs niveaux dans le processus de cornification : elle participe à la formation de la matrice fibreuse intracornéocytaire, entre dans la composition de l'enveloppe cornée et est à l'origine des acides aminés du FNH. Ceci en fait donc une protéine majeure de la différenciation terminale du kératinocyte. Avant de porter le nom de FLG, cette protéine a initialement été nommée « Stratum Corneum Basic Protein ». En effet, elle a initialement été identifiée dans la couche cornée de l'épiderme de rat et elle est basique. De par sa composition particulière en acides aminés (riche en arginine, glutamine, glycine, sérine et histidine), elle a ensuite été appelée « histidine-rich protein ». C'est son rôle dans l'agrégation des filaments intermédiaires de kératines qui lui a finalement valu son nom actuel de « FILament AGGregating proteIN » ou FLG. En 2006, l'identification de mutations non-sens du gène de la FLG causant une perte de fonction de la protéine et leurs implications dans la physiopathologie de l'ichtyose vulgaire et de la dermatite atopique ont engendré un regain d'intérêt pour cette protéine et ont d'autant plus mis en exergue son rôle majeur dans l'homéostasie épidermique (Smith *et al.*, 2006 ; Palmer *et al.*, 2006).

A. Une protéine de la famille des « S100 fused-type proteins »

La FLG appartient à la famille des SFTPs, constituée de sept membres chez l'homme (Henry *et al.*, 2012, Kypriotou *et al.*, 2012). Au moins un gène codant pour une SFTP est retrouvé chez les mammifères et chez les sauropsides mais aucun chez les poissons et amphibiens. D'un point de vue évolutif, les SFTPs seraient donc apparues lors de la transition de la vie aquatique vers la vie terrestre d'un sous-groupe de vertébrés appelé amniote (Mlitz *et al.*, 2014). Chez l'homme, les sept SFTPs sont : la FLG, la filaggrine-2 (ou ifapsoriasine), l'hornerine, la TCHH (voir paragraphe III.D), la trichohyaline-like 1, la répétine et la cornuline. Les gènes des membres de cette famille sont tous regroupés en un même cluster au sein du complexe de différenciation épidermique (locus 1q21) dont nous avons déjà parlé précédemment (voir paragraphe I.D.2.a et Figure 22). Ces gènes présentent tous la même organisation. Ils sont constitués de 3 exons : le premier non codant et de petite taille, le second partiellement codant et le troisième codant la majeure partie de la protéine.

Les protéines de la famille des SFTPs partagent aussi la même structure particulière. Elles sont composées d'un domaine amino-terminal de type S100 fusionné à un grand domaine central constitué de la répétition de multiples copies d'une ou plusieurs séquences et un domaine carboxy-terminal distinct.

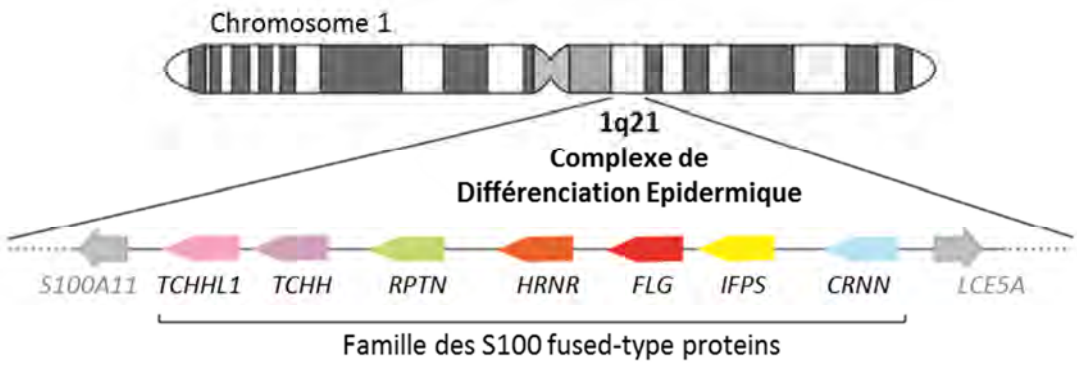


Figure 22 : Cluster des gènes de la famille des « S100 fused-type proteins » dans le locus 1q21. D'après (Henry, 2011).

Les domaines S100-like des SFTPs sont homologues aux protéines S100. Par analogie, il a été proposé qu'ils possèdent eux-aussi deux domaines EF-hand liant le calcium, séparés par une région flexible. La structure cristallographique du domaine S100-like de la FLG a d'ailleurs récemment été résolue par analyse de la diffraction aux rayons X, confirmant cette hypothèse (Bunick *et al.*, 2015). Chaque motif EF-hand est constitué de deux hélices α perpendiculaires entre elles et reliées par une courte boucle au niveau de laquelle un ion Ca^{2+} peut se fixer. De plus, les domaines S100-like des SFTPs présentent une forte homologie de séquences entre eux (63 à 79% d'homologie sauf pour le domaine S100-like de la trichohyaline-like 1 qui présente une homologie de seulement 40% avec celui des autres membres) (Figure 23).

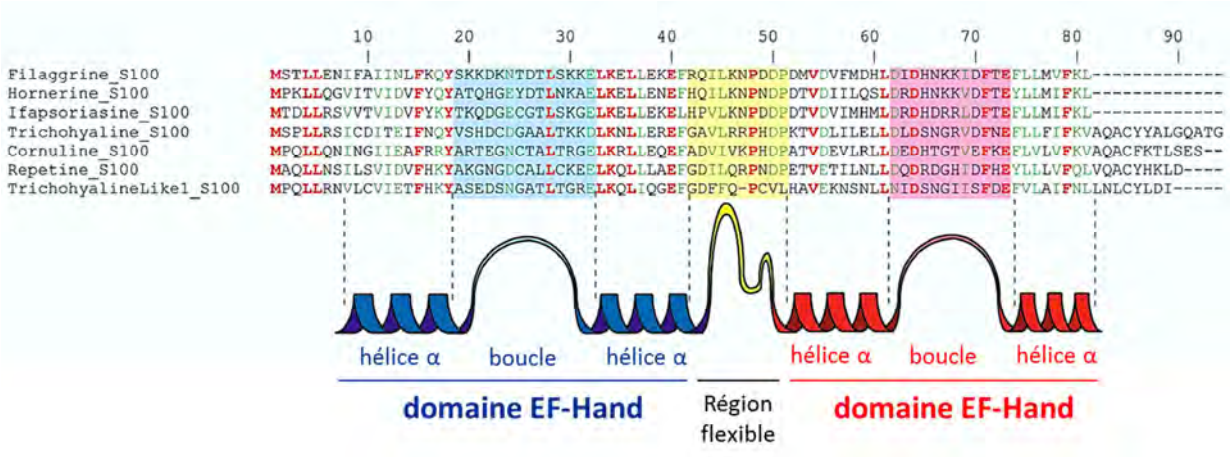


Figure 23 : Les domaines S100-like des sept "S100 fused-type proteins". D'après (Henry *et al.*, 2012).

Le domaine central répétitif confère aux SFTPs leurs fonctions spécifiques. Les homologies des séquences de ce domaine entre les différentes SFTPs sont faibles (moins de 32%). A l'inverse, la composition globale en acides aminés reste proche d'une SFTP à une autre. Pour la plupart des SFTPs, le domaine central est composé en grande majorité de 6 acides aminés : sérine, glycine, arginine, histidine, glutamine et acide glutamique (Tableau 3). On peut noter que les domaines

centraux de la FLG, la filaggrine-2 et l'hornerine présentent une composition en acides aminés très proche, suggérant l'existence d'une sous-famille constituée de ces trois membres.

Quant aux domaines carboxy-terminaux, un motif conservé entre certaines SFTPs humaines, mais aussi présent dans certaines SFTPs d'autres espèces, a été mis en évidence. La fonction de ce domaine reste largement méconnue. Il a cependant été proposé que le domaine carboxy-terminal de la FLG joue un rôle dans la régulation de son expression (voir paragraphe II.D.4.a ; Sandilands *et al.*, 2007 ; Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009) et que celui de la TCHH soit impliqué dans son interaction avec les filaments de kératines (voir paragraphe III.D.1 ; Takase et Hirai, 2012). En outre, certains fragments des domaines carboxy-terminaux de la FLG et de la filaggrine-2 semblent présenter une activité antimicrobienne (voir paragraphe II.D.4.a ; Behrendt *et al.*, 2010 ; Hansmann *et al.*, 2015).

La FLG est la première des SFTPs à avoir été identifiée. Elle est à l'heure actuelle la mieux décrite. La FLG a été retrouvée uniquement chez les mammifères et elle est exprimée chez l'homme au niveau de l'épiderme ainsi que dans d'autres épithéliums pavimenteux pluristratifiés comme les épithéliums de la langue, des gencives et du palais dur.

Tableau 3 : Composition en acides aminés des domaines répétitifs centraux des "S100-fused type proteins".

%	Filaggrine	Filaggrine-2	Hornerine	Répétine	Cornuline	Trichohyaline	Trichohyaline like-1
Ser	25,3	23,4	35,3	12,8	11,7	1,2	9,7
Gly	13,6	22,0	25,9	11,1	13,1	0,8	8,0
Arg	11,2	5,9	5,9	8,8	7,1	23,9	4,7
His	10,7	11,7	10,0	8,9	3,9	0,9	2,0
Gln	9,6	11,2	9,5	21,3	16,1	19,3	9,7
Glu	6,0	4,3	2,5	5,5	8,5	28,6	13,6
Autres	Ala : 6,5	Thr : 9,0	Tyr : 3,5	Asp : 7,6	Thr : 12,9	Leu : 9,8	Thr : 7,2

Sérine (Ser), glycine (Gly), arginine (Arg), histidine (His), glutamine (Gln), acide Glutamique (Glu), Alanine (Ala), Thréonine, (Thr), Tyrosine (Tyr), acide Aspartique (Asp), Leucine (Leu). D'après (Henry *et al.*, 2012).

B. Structure et régulation du gène de la filaggrine

Comme pour toutes les SFTPs, le gène de la FLG est organisé en 3 exons. Le premier est court et non codant. Le second porte le site d'initiation de la traduction et code le premier motif de liaison au calcium de type EF-hand du domaine S100-like. Le troisième est très grand et code le second site de liaison au calcium du domaine S100-like, le long domaine central répétitif et le domaine carboxy-terminal (Figure 24).

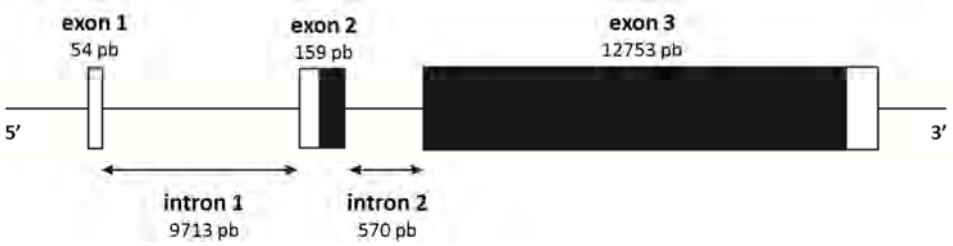


Figure 24 : Le gène de la filaggrine humaine. D'après (Henry *et al.*, 2012).

Dans l'épiderme, le gène de la FLG est exprimé au niveau de la couche granuleuse. La régulation de son expression est encore mal connue malgré de nombreuses études, dont quelques exemples sont donnés ci-après. Elle fait intervenir de nombreux facteurs de transcription et est sensible à la plupart des paramètres contrôlant la différenciation kératinocytaire (calcium, vitamine D, cytokines, etc.).

Comme pour beaucoup de gènes impliqués dans la différenciation épidermique, des facteurs de transcription de la famille AP-1 participent à la régulation de l'expression de la FLG. En effet, le promoteur du gène *FLG* présente un site consensus de fixation de ces facteurs. *In vitro*, la liaison d'hétérodimères c-Jun/c-Fos au niveau de ce site AP-1 engendre une forte augmentation de l'activité du promoteur du gène *FLG,* alors que lorsqu'une mutation délétère est insérée au niveau de ce site, l'activité transcriptionnelle chute de plus de 60%. JunB et JunD contrôlent également la transcription du gène de la FLG en agissant par une voie inconnue ne passant pas par une fixation directe au site AP-1 du promoteur. Tandis que JunB active l'expression de la FLG, JunC la réprime (Jang *et al.*, 1996).

Le promoteur du gène *FLG* présente aussi un site consensus de fixation des facteurs de transcription de la famille des Ets (pour « Epithelium specific transcription factors » en anglais). Le facteur Ets1 inhibe l'expression de la FLG alors que le facteur Jen l'active (Andreoli *et al.*, 1997). Des facteurs de transcription de la famille des protéines à domaine POU peuvent aussi réguler l'activité dépendante de c-Jun du promoteur de la FLG en se liant à des éléments de réponse spécifiques situés au sein du promoteur. Oct1 est un activateur alors que sKn1a/i et Oct6 sont des répresseurs (Jang *et al.*, 2000). Dlx3, appartenant à la famille des protéines à homéodomaine Distal-less, est capable de se lier *in vitro* au promoteur du gène *FLG* et régulerait positivement son expression (Morasso *et al.*, 1996).

On trouve également sur le promoteur du gène *FLG* des éléments de réponse à l'acide rétinoïque et aux glucocorticoïdes. Tous deux répriment l'expression de la FLG, probablement en modulant l'activité de facteurs de transcription (Presland *et al.*, 2001). De nombreuses cytokines, telles que l'IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, IL-25, IL-31, IL-33 et TNF-α répriment l'expression de la FLG (aussi bien au niveau du messager que de la protéine). Les mécanismes par lesquels les cytokines agissent sont encore peu décryptés. Certaines cytokines impliquées dans la réponse de type T_H2 agiraient sur la FLG via la voie S100/A1 et p21. Le TNF-α agirait quant à lui via une voie dépendante de c-Jun alors que l'IL-31 passerait par la voie JAK / p38 MAP kinase (Gutowska-Owsiak et Ogg, 2013).

La transcription du gène *FLG* est également régulée par des facteurs environnementaux tels que le taux d'humidité ou le taux d'O_2. Chez la souris, le niveau d'expression de la FLG varie inversement au taux d'humidité. En effet, un taux plus important d'ARNm est détecté par hybridation *in situ* dans l'épiderme de souris sans poils exposées pendant 2 semaines à une faible hygrométrie (10%

d'humidité relative) en comparaison à des souris maintenues en condition humide (80% d'humidité relative) (Elias *et al.*, 2002a). Le taux d'O_2 régule aussi l'expression de la FLG. En effet, dans des kératinocytes primaires (murins et humains) cultivés en condition d'hypoxie (0,5% d'O_2), les taux d'ARNm et de protéine de FLG sont augmentés en comparaison à des kératinocytes cultivés en conditions oxygénées (21% d'O_2). Cette régulation semble être dépendante de facteurs induits par l'hypoxie HIF1α et HIF2α, puisque dans des kératinocytes « double déficients » (c'est-à-dire des kératinocytes isolés de souris dont les gènes codant ces deux protéines ont été inactivés de concert), l'expression de la FLG n'est plus activable par l'hypoxie (Wong *et al.*, 2015b).

C. La filaggrine et son métabolisme

1. Structure de la filaggrine

Chez l'homme, la FLG est synthétisée sous la forme d'un large précurseur de plus de 400 kDa appelé proFLG. La proFLG est constituée d'un domaine central formé par la répétition de 10 à 12 sous-unités de FLG (d'environ 37 kDa ou 324-325 acides aminés) encadrées par deux sous-unités de FLG incomplètes, d'un domaine amino-terminal et d'un domaine carboxy-terminal (Figure 25).

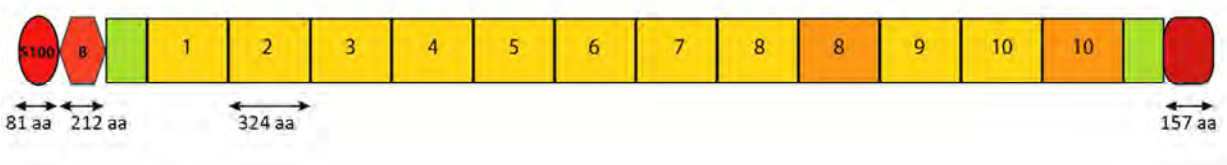


Figure 25 : Structure de la profilaggrine humaine. D'après (Henry *et al.*, 2012).

Dans le domaine répétitif, les sous-unités de FLG sont séparées entre elles par un peptide de liaison hydrophobe et peu flexible (chez l'homme : FLYQVST). Le nombre de répétitions est variable et génétiquement déterminé : les sous-unités 8 et/ou 10 peuvent en effet être dupliquées chez certains individus (Gan *et al.*, 1990). Bien que les sous-unités de FLG aient la même taille et une composition similaire en acides aminés, elles présentent une faible identité de séquence entre elles. Les séquences des sous-unités de FLG d'un même individu ou de deux individus différents peuvent présenter jusqu'à 40% de variation. Ceci suggère fortement qu'une succession précise d'acides aminés n'est pas essentielle à la fonction de la FLG mais que c'est plutôt sa composition globale en acides aminés qui importe. Ceci est facilement expliqué par le fait que le destin ultime de la FLG est de produire des acides aminés libres (voir paragraphe I.E.5). En revanche, la structure secondaire et la distribution des charges globales des sous-unités de FLG sont conservées, propriétés importantes pour leur interaction avec les filaments intermédiaires de kératines (voir paragraphe II.D.4.b et Figure 30 ; Mack *et al.*, 1993).

Le domaine amino-terminal (293 acides aminés) est constitué de deux sous-domaines. Le premier, appelé domaine A, correspond au domaine S100-like (81 acides aminés) très conservé entre les différentes SFTPs et constitué de deux domaines de liaison au calcium de type EF-hand (Presland *et al.*, 1995 ; voir paragraphe II.A). Le second, appelé domaine B, est hydrophile et basique et présente un signal de localisation nucléaire fonctionnel (Pearton *et al.*, 2002). Enfin, le domaine carboxy-terminal (157 acides aminés) est basique et hydrophobe.

L'organisation structurale de la FLG semble conservée chez les mammifères bien que la longueur des domaines amino-et carboxy-terminaux et surtout du domaine répétitif varie entre les espèces. Par exemple, ce domaine est composé de 16 à 20 répétitions de Flg (faisant 246 à 255 acides aminés) chez la souris et de seulement 4 répétitions (507 à 549 acides aminés) chez le chien (Rothnagel et Steinert 1990, Kanda *et al.*, 2013). La comparaison des sous-unités de FLG de l'homme, de la souris et du chien a révélé une faible similarité de séquence entre elles mais une composition en acides aminés semblable. Les pourcentages en acides aminés majeurs (sérine, glycine, arginine, glutamine et histidine) sont en effet conservés entre ces différentes espèces (Kanda *et al.*, 2013). Ceci renforce encore l'hypothèse selon laquelle c'est la composition en acides aminés des sous-unités de FLG, et non leur séquence, qui est importante pour leur fonction.

2. Les différentes étapes du métabolisme de la filaggrine

Lors de la différenciation épidermique, la proFLG subit un métabolisme complexe aboutissant notamment à la libération des sous-unités de FLG (ou monomères de FLG, 37 kDa chez l'homme) puis à leur protéolyse complète pour former les acides aminés libres du FNH (Figure 26).

La proFLG est exprimée tardivement dans le processus de différenciation kératinocytaire, au niveau de la couche granuleuse. À la suite de sa synthèse, elle est phosphorylée (principalement sur des résidus sérine et thréonine) et devient ainsi très insoluble (voir paragraphe II.C.3). Elle est alors stockée au sein des granules de kératohyaline (Figure 27A ; Harding et Scott, 1983).

À la transition entre couche granuleuse et couche cornée, la proFLG est déphosphorylée puis subit une protéolyse limitée engendrant la disparition des granules de kératohyaline. Des clivages enzymatiques spécifiques ont notamment lieu au niveau des peptides de liaison aboutissant à la libération des monomères de FLG ainsi que des domaines amino- et carboxy-terminaux. Une fois libérés, les monomères de FLG, de par leur nature basique (point isoélectrique compris entre 7 et 10,5), s'associent aux filaments intermédiaires de kératines via des interactions ioniques. La FLG va ainsi faciliter la formation de liaisons entre les filaments de kératines aboutissant à leur agrégation en macrofibrilles très ordonnées qui constituent la matrice fibreuse dense des cornéocytes. De plus, il a été suggéré que l'association des monomères de FLG aux kératines la protégerait d'une protéolyse

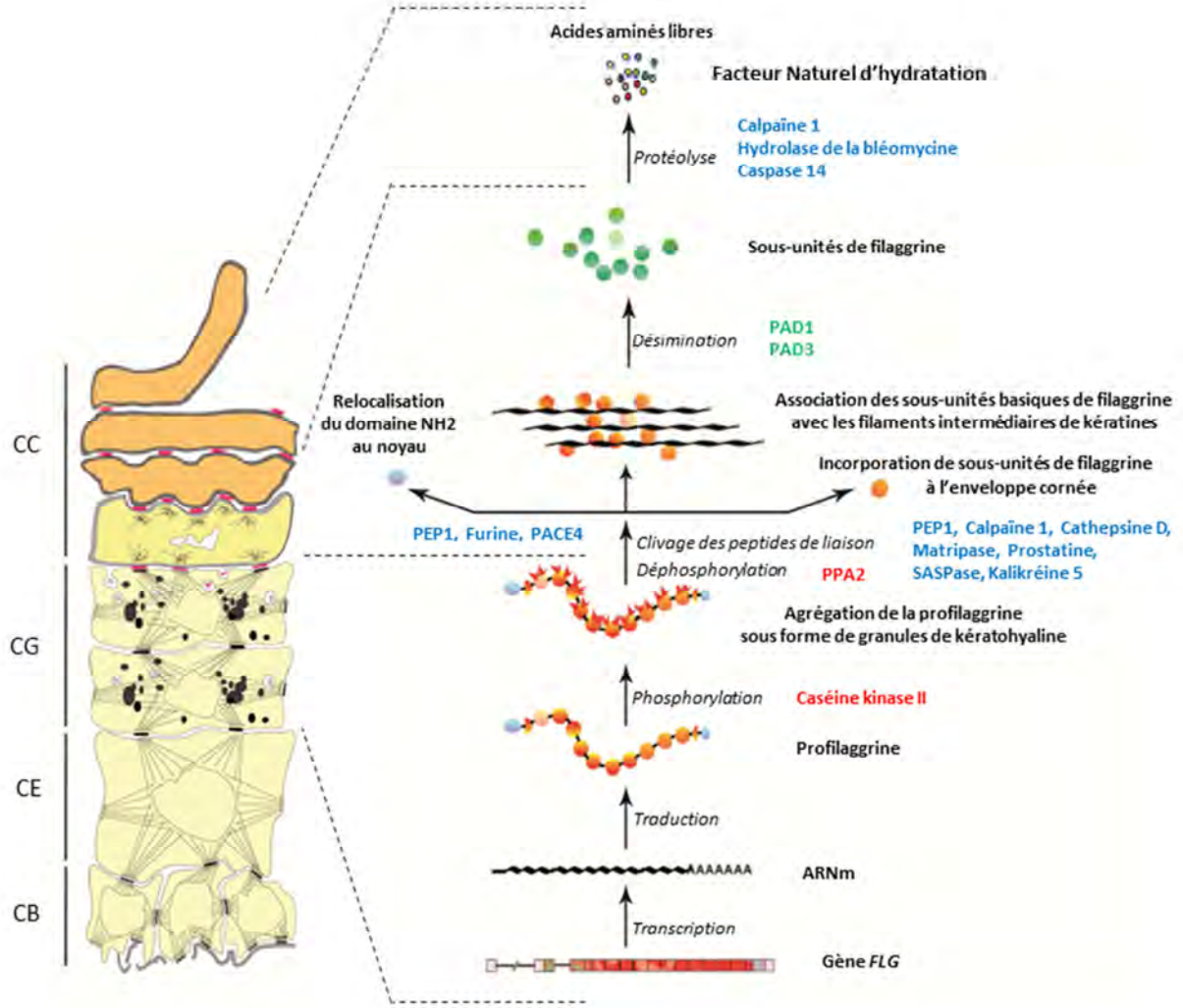


Figure 26 : Modèle actualisé du métabolisme de la filaggrine. Les enzymes impliquées dans le métabolisme de la FLG sont indiquées sur le schéma en bleu (protéases), en rouge (kinases/phosphatases) et en vert (PADs). Adapté de (Méchin *et al.*, 2005).

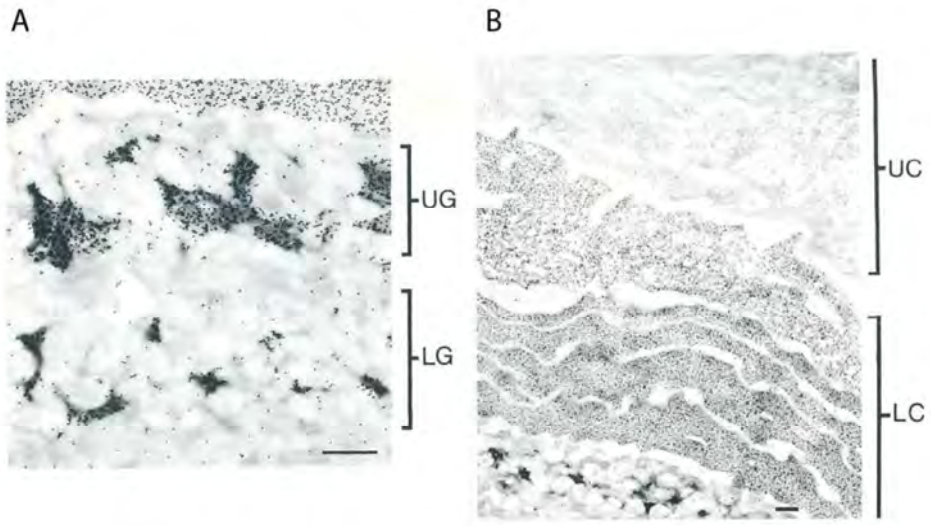


Figure 27 : Localisation de la (pro)filaggrine dans l'épiderme humain normal observée par immunomicroscopie électronique. (A) La proFLG est essentiellement immunodétectée au niveau des granules de kératohyaline de la couche granuleuse. (B) La FLG est également immunodétectée dans l'ensemble de la matrice intracornéocytaire des cornéocytes profonds alors qu'elle n'est plus détectée dans les cornéocytes les plus superficiels. LG : couche granuleuse profonde, UG : couche granuleuse supérieure, LC : couche cornée profonde, UC : couche cornée superficielle. D'après (Manabe *et al.*, 1991).

prématurée (Rawlings et Harding, 2004). Les monomères de FLG ne persistent que dans les assises les plus profondes de la couche cornée (Figure 27B). Ils sont ensuite désiminés par les PADs 1 et/ ou 3. La désimination correspond à la modification post-traductionnelle de résidus arginine en résidus citrulline, ce qui induit une perte de charges positives des monomères (voir paragraphe IV.B). Les monomères de FLG sont riches en arginines puisqu'ils en contiennent en moyenne 11,2 % (soit 36 arginines par monomère de 324 acides aminés ; voir tableau II et annexe 1), ce qui en fait des cibles privilégiées des PADs. Ainsi, les monomères de FLG désiminés sont neutres à acides (Senshu *et al.*, 1996). La désimination de la FLG entraînerait la rupture des liaisons entre kératines et monomères de FLG qui se retrouveraient alors solubles dans le cytoplasme (voir paragraphe IV.F.1.a). Suite à cela, les monomères de FLG sont totalement protéolysés en acides aminés libres entrant dans la composition du FNH.

En outre, une partie mineure des monomères de FLG est incorporée à l'enveloppe cornée (Simon *et al.*, 1996). On ne sait cependant pas encore si les monomères sont incorporés à l'enveloppe cornée sous formes désiminées ou non.

Au cours de la différenciation, le domaine amino-terminal de la FLG libéré par protéolyse est transloqué au noyau grâce à la présence d'un signal de relocalisation nucléaire présent dans le domaine B (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1998 ; Pearton *et al.*, 2002). Il semblerait de plus que ce domaine puisse également être incorporé à l'enveloppe cornée puisque les domaines A et B ont été tous deux détectés en périphérie des cornéocytes par immunomicroscopie électronique (Presland *et al.*, 1997). Le devenir du domaine carboxy-terminal est quant à lui encore inconnu.

3. Kinases et phosphatases impliquées dans la phosphorylation/déphosphorylation de la proFLG

La phosphorylation de la proFLG et la (les) kinase(s) impliquée(s) ont très peu été étudiées. De nombreux sites de phosphorylation ont été mis en évidence sur la proFlg de rat et de souris, 17 à 20 phosphates ont notamment été retrouvés sur chaque sous-unité de Flg. Mais seule la capacité de la caséine kinase II (CK2) à phosphoryler la proFlg de rat et de souris a été démontrée *in vitro* (Haugen-Scofield *et al.*, 1988, Kam *et al.*, 1993). Elle n'est cependant pas responsable à elle seule de la phosphorylation complète de la proFlg puisqu'on trouve seulement deux sites consensus cibles de cette kinase par sous-unité de Flg. De nombreux sites putatifs de phosphorylation ont été mis en évidence *in silico* dans la séquence de la proFLG humaine, au sein des répétitions de FLG et du domaine amino-terminal. Les mêmes séquences consensus cibles de la caséine kinase II, identifiées sur les sous-unités de Flg chez le rat, sont conservées chez l'homme (Sandilands *et al.*, 2009). Aucune donnée expérimentale ne vient cependant confirmer l'existence fonctionnelle de tels sites sur la

proFLG humaine ni l'implication effective de cette kinase. Une étude récente a mis en évidence l'existence de sites de phosphorylation au niveau des sérines adjacentes aux peptides de liaison séparant les différentes sous-unités de la proFLG humaine (Yang *et al.*, 2012).

La phosphorylation de la proFLG la rend hautement insoluble ce qui faciliterait la formation des granules de kératohyaline. Il a de plus été proposé que la phosphorylation de la proFLG aurait pour rôle de la protéger d'une protéolyse précoce, en rendant les sites de clivage inaccessibles aux protéases (Resing *et al.*, 1993), et aussi d'empêcher l'agrégation prématurée des filaments de kératines, la proFLG phosphorylée étant incapable d'agréger les filaments intermédiaires *in vitro* (Lonsdales-Eccles *et al.*, 1982).

Concernant la déphosphorylation de la proFLG, il a été montré qu'elle est totale au niveau des sous-unités de FLG (Lynley et Dale, 1983). Cette déphosphorylation, et en particulier celle du résidu phosphosérine situé juste en amont de chaque peptide de liaison, semble requise pour que la protéolyse de la proFLG puisse se dérouler (Resing *et al.*, 1989). Chez le rat, une phosphatase a été impliquée dans cette déphosphorylation : la sérine/thréonine phosphatase de type 2A (ou PP2A). Elle est exprimée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme de rat et est capable de déphosphoryler *in vitro* la moitié des résidus phosphorylés de la proFlg et notamment ceux phosphorylés par la caséine kinase II (Haugen-Scofield *et al.*, 1988, Kam *et al.*, 1993).

4. Protéases impliquées dans le clivage du domaine amino-terminal

À ce jour, trois protéases ont été impliquées dans la protéolyse du domaine amino-terminal. La première est la profilaggrine endopeptidase 1 ou PEP1, une protéine à sérine à activité de type chymotrypsine. Elle a été identifiée dans l'épiderme de souris et est capable de cliver des fragments de proFLG humaine *in vitro* et de produire le domaine amino-terminal complet (Presland *et al.*, 1997).

Les deux autres sont la « paired basic amino acid cleaving enzyme » (PACE), aussi appelée furine, et la PACE4, deux protéases à sérine dépendantes du calcium qui font partie de la famille des proprotéines convertases. Elles clivent spécifiquement les protéines après le motif RX(R/K)R. Elles sont toutes deux exprimées dans l'épiderme humain et sont capables de cliver *in vitro* le domaine amino-terminal de la proFLG humaine, spécifiquement entre le domaine B et la première sous-unité tronquée de FLG (Pearton *et al.*, 2001). Ces deux protéases ont cependant été décrites comme étant transmembranaires avec un site actif extracellulaire (Denault et Leduc, 1996), leur action sur la proFLG *in vivo* est donc incertaine.

5. Protéases impliquées dans la protéolyse de la profilaggrine

En plus de son rôle dans le clivage du domaine amino-terminal, la PEP1 murine est aussi capable de cliver la proFLG *in vitro* et de produire ainsi des mono- et oligomères de FLG (Resing *et al.*, 1995).

La calpaïne 1, une protéase à cystéine dépendante du calcium, a également été impliquée dans la protéolyse de la proFLG. Elle est exprimée dans la couche granuleuse de l'épiderme humain, avec une localisation cytoplasmique granulaire (Miyachi *et al.*, 1986). Le traitement de kératinocytes humains en culture avec la calpastatine, un inhibiteur spécifique des calpaïnes, entraîne une diminution de la quantité de monomères de FLG. Il n'est cependant pas clairement démontré que cette protéase agisse directement sur la proFLG (Yamazaki *et al.*, 1997).

Il a également été proposé que la cathepsine D participe à la dégradation de la proFLG en monomères. En effet, l'incubation *in vitro* de proFlg de rat avec la cathepsine D induit une protéolyse limitée du précurseur et la production de monomères de Flg (Kashima *et al.*, 1988). Cependant, dans l'épiderme de souris déficientes en cathepsine D, la proFlg ne s'accumule pas mais est au contraire faiblement détectée (Egberts *et al.*, 2004).

La matriptase, une protéase à sérine transmembranaire, joue aussi un rôle dans la protéolyse de la proFLG. En effet, l'épiderme de souris, dont le gène de la matriptase (*St14*) a été inactivé, présente des défauts de protéolyse de la proFLG : alors que le monomère de Flg n'est quasiment plus produit, des formes entières ou partiellement protéolysées de proFlg s'accumulent (List *et al.*, 2003). De plus, il semble que la matriptase soit aussi impliquée dans la protéolyse du domaine amino-terminal puisque, dans l'épiderme des souris déficientes en matriptase, des fragments correspondant aux domaines A et B couplés à une sous-unité tronquée de Flg s'accumulent alors que le domaine amino-terminal entier (A et B) et le domaine A ne sont plus détectés. Enfin, chez l'homme, des mutations faux-sens du gène codant la matriptase sont responsables d'une ichtyose congénitale autosomale récessive (ARCI 11) associée à une hypotrychose (OMIM #602400). Ces mutations, touchant des acides aminés du site actif et résultant en une diminution de l'activité protéolytique de la matriptase, entraînent des anomalies dans la protéolyse de la proFLG, similaires à celles observées dans l'épiderme des souris (Alef *et al.*, 2009).

La prostasine, une autre protéase à sérine, semble aussi impliquée dans la protéolyse de la proFlg. Les souris dont le gène de la « channel-activating protease 1/protease serine S1 family member 8 » (CAP1/Prrs8, homologue murin de la prostasine) a été inactivé présentent une altération de la protéolyse de la Flg similaire à celle observée chez les souris déficientes en matriptase. Deux sites de clivage putatifs par la prostasine ont de plus été identifiés dans la séquence de la proFLG humaine (Netzel-Arnett *et al.*, 2006). Quoiqu'il en soit, la prostasine et la matriptase étant toutes deux des protéases transmembranaires à activité extracellulaire, il semble peu probable que l'une ou l'autre

puisse agir directement sur la proFLG qui elle est cytoplasmique. *In vitro*, la matriptase est capable de cliver la prostasine, ce qui engendre son activation. Ceci, ajouté au fait que les deux modèles de souris déficientes en matriptase et CAP1/Prrs8 présentent des phénotypes similaires, suggère que ces deux protéases appartiennent à une cascade protéolytique commune dans laquelle la matriptase agirait en amont de la prostasine. Ainsi, il a été proposé que la prostasine, activée par la matriptase, stimule le canal sodique ENaC, provoquant un influx de sodium dans la cellule. Cet influx d'ions Na^+ induirait alors une entrée de calcium accrue dans les cellules et activerait des protéases dépendantes du calcium ayant pour substrat la proFLG (Ovaere *et al.*, 2009). Une autre hypothèse serait que, lors de la différenciation terminale kératinocytaire, des changements drastiques de la structure des organelles et de la membrane plasmique permettraient à des protéines normalement situées dans le lumen des organelles ou à la surface de la cellule de se retrouver dans le cytoplasme (List *et al.*, 2003). La matriptase et la prostasine pourraient alors agir directement sur la proFLG. Jusqu'à maintenant, aucune donnée expérimentale n'a cependant mis en évidence une action directe de ces enzymes sur la proFLG.

Plus récemment, le rôle de la SASPase (skin aspatatic protease) dans le clivage de la proFLG a été mis en évidence. La SASPase, exclusivement exprimée dans la couche granuleuse, présente un domaine transmembranaire en position amino-terminal. Son activation nécessite un clivage qui libère alors une forme active de 14 kDa (Bernard *et al.*, 2005). L'épiderme de souris *hairless* déficientes en SASPase présente lui aussi une protéolyse de la proFlg aberrante. Les monomères de Flg ne sont quasiment plus produits alors que des formes correspondant probablement à des dimères et trimères s'accumulent. En immunofluorescence indirecte, la (pro)Flg est détectée jusqu'en haut de la couche cornée alors qu'on la retrouve normalement uniquement au niveau de la couche granuleuse et de la couche cornée profonde. De manière inattendue, la composition en acides aminés libres de la couche cornée n'est cependant pas modifiée. La SASPase recombinante est capable, après auto-activation, de cliver directement *in vitro* une forme recombinante de la proFLG humaine (correspondant à une sous-unité de FLG recombinante couplée à une protéine de liaison au maltose par le peptide de liaison de la proFLG) au niveau du peptide de liaison (Matsui *et al.*, 2011).

Contrairement aux souris dont le gène codant la matriptase, la prostasine ou la SASPase a été invalidé, les souris déficientes pour *Spink5* (codant pour LEKTI, un inhibiteur de protéases à sérine comprenant les KLKs ; voir paragraphe I.D.3), présentent une protéolyse accrue de la proFlg conduisant à l'accumulation de monomères (Descargues *et al.*, 2005). Ceci suggère que l'activité d'une ou plusieurs protéases impliquées dans la dégradation de la proFlg est régulée par LEKTI. La KLK5 et l'élastase 2 semblent être de bonnes candidates.

L'élastase 2, pendant longtemps considérée comme une protéase à sérine spécifique du pancréas, a été mise en évidence dans l'épiderme des souris déficientes en LEKTI, où elle est hyperactive. Des

essais *in vitro* montrent que l'élastase 2 est activée par la KLK5, elle-même sous le contrôle de LEKTI. La surexpression de l'élastase 2 dans l'épiderme de souris transgéniques (Tg- élastase 2) engendre une dégradation accrue de la proFlg mais aussi du monomère de Flg. En accord avec cela, ces souris présentent de plus une diminution de la détection globale de la (pro)Flg en immunohistochimie ainsi qu'une diminution de la taille et du nombre de granules de kératohyaline observés en MET. *In vitro*, l'ajout d'élastase 2 purifiée à un extrait d'épiderme engendre une dégradation accrue de la proFlg ainsi que des monomères de Flg. Enfin, l'élastase 2 colocalise avec la FLG dans l'épiderme humain à la périphérie des granules de kératohyaline (Bonnart *et al.*, 2010). Cette étude suggère donc que l'élastase 2 agit de manière directe sur la proFlg.

Outre son rôle dans l'activation de l'élastase 2, la KLK5 semble aussi être capable de protéolyser la proFLG de manière directe. Tout d'abord la colocalisation de la KLK5 avec la (pro)FLG dans l'épiderme humain a été mise en évidence en immunofluorescence indirecte et en immunomicroscopie électronique. De plus, l'utilisation d'une nouvelle technologie permettant de visualiser les interactions entre protéines, appelée Duolink, démontre une colocalisation extrêmement fine (<40 nm) entre KLK5 et (pro)FLG. Enfin, *in vitro,* la KLK5 recombinante est capable de cliver la proFLG recombinante humaine très probablement au niveau du peptide de liaison, puisque lorsque celui-ci est muté le clivage n'a plus lieu (Sakabe *et al.*, 2013). Cependant, les souris transgéniques surexprimant la KLK5 spécifiquement au niveau de l'épiderme ne présentent pas d'anomalies de protéolyse de la proFlg (Furio *et al.*, 2014), suggérant que le contrôle de la protéolyse de la proFLG par la voie LEKTI-KLK5-élastase 2 est complexe.

Malgré ces travaux, la localisation cytoplasmique de la KLK5 et de l'élastase 2 reste incertaine et controversée. En effet, la KLK5 semble majoritairement être secrétée dans l'espace intercornéocytaire via les corps lamellaires et l'élastase 2 est également secrétée par les kératinocytes de souris Tg-élastase 2 différenciés *in vitro* (Bonnart *et al.*, 2010).

Pour finir, la matriptase et la KLK5 semblent appartenir à une même voie de signalisation protéolytique. En effet, l'inactivation du gène de la matriptase dans l'épiderme des souris déficientes en LEKTI bloque la protéolyse excessive de la proFlg et restaure les granules de kératohyaline. De plus, il a été montré *in vitro* que la matriptase est capable d'activer les KLK 5 et 7 (Sales *et al.*, 2010).

Ainsi un équilibre finement régulé, entre les activités des diverses protéases impliquées dans la protéolyse de la proFLG en monomères de FLG, semble exister et est loin d'être complètement élucidé.

6. Protéases impliquées dans la dégradation de la filaggrine en acides aminés

Quelques protéases ont été spécifiquement impliquées dans la protéolyse des monomères de FLG.

Tout d'abord, la caspase 14, une protéase à cystéine non apoptotique, exprimée et active dans les couches les plus différenciées de l'épiderme, est impliquée dans la protéolyse du monomère de FLG. En effet, des fragments de Flg de taille inférieure à celle du monomère s'accumulent dans l'épiderme des souris déficientes en caspase 14. Ces souris présentent également une forte diminution de la quantité de FNH et en particulier de PCA et d'UCA au niveau de la couche cornée, associée à une perte en eau trans-épidermique élevée et à une hypersensibilité aux rayonnements ultraviolets (Denecker *et al.*, 2007, Hoste *et al.*, 2011). De plus, des essais de protéolyse de la FLG recombinante humaine par la caspase 14 ont permis d'identifier des sites de clivage spécifiques et conservés dans la plupart des sous-unités de FLG (Hoste *et al.*, 2011). La caspase 14 clive ainsi directement les monomères de FLG en fragments peptidiques de plus petites tailles. L'intervention d'autres protéases apparaît nécessaire pour aboutir à la dégradation totale de ces peptides en acides aminés. Par ailleurs, il a récemment été suggéré que la KLK7 interviendrait dans ce processus en activant la caspase 14 par protéolyse de sa proforme (Yamamoto *et al.*, 2012).

La calpaïne 1, en plus de son rôle dans la protéolyse de la proFLG, est aussi impliquée dans la dégradation du monomère en acides aminés libres. Cette protéase calcium-dépendante est en effet capable de cliver les sous-unités de FLG *in vitro*, et ce de manière plus efficace lorsque les sous-unités de FLG sont désiminées. En effet, les monomères de FLG désiminés sont clivés plus rapidement et en peptides de plus petites tailles. Cependant, la calpaïne 1 ne permet pas la dégradation totale des monomères de FLG (Kamata *et al.*, 2009 ; Hsu *et al.*, 2011).

L'hydrolase de la bléomycine est une protéase à cystéine neutre de la famille des papaïnes qui possèdent une activité aminopeptidase préférentiellement après un résidu citrulline. Dans l'épiderme humain, elle est localisée dans les couches granuleuse et cornée profonde. *In vitro*, l'hydrolase de la bléomycine n'est pas capable de dégrader directement le monomère de FLG désiminé entier ni les peptides produits par l'action de la caspase 14. Elle est par contre capable de dégrader les peptides de FLG produits par la calpaïne 1 en acides aminés libres (Kamata *et al.*, 2009). Il semblerait donc que caspase 14, calpaïne 1 et hydrolase de la bléomycine agissent séquentiellement. En accord avec ces résultats, les souris déficientes pour l'hydrolase de la bléomycine présentent un phénotype similaire à celui des souris déficientes en Flg (Schwartz *et al.*, 1999), mettant en évidence le rôle essentiel de cette dernière protéase dans le métabolisme de la FLG (voir paragraphe II.D.1.a).

Enfin, une étude a montré que la FLG peut être protéolysée *in vitro* par la cathepsine D, la cathepsine L et la cathepsine L-like (Kawada *et al.*, 1995a, 1995b). Cependant, l'épiderme des souris déficientes en cathepsine L ne semble pas présenter d'anomalies du métabolisme de la Flg (Benavides *et al.*, 2002). L'intervention de ces protéases est donc incertaine.

7. Régulation de la protéolyse de la filaggrine par le taux d'humidité ambiante

Le taux d'humidité ambiante, en plus de réguler l'expression de la FLG, contrôle aussi la dégradation du monomère de FLG en acides aminés libres.

Une étude menée chez le rat a montré que lors des étapes tardives du développement fœtal, la Flg est produite et s'accumule sur toute l'épaisseur de la couche cornée. Quelques heures seulement après la naissance, c'est-à-dire quelques heures après que les ratons aient quitté le milieu aqueux *in utero* et soient passés dans un environnement plus sec, la détection de la Flg dans les assises les plus superficielles de la couche cornée est déjà perdue alors que la quantité d'acides aminés libres de la couche cornée augmente, démontrant l'initiation de la dégradation de la Flg intracornéocytaire. Par contre cette dégradation de la Flg est fortement inhibée lorsque les nouveau-nés sont maintenus dans une atmosphère saturée en eau. Enfin, si la peau de rats adultes est recouverte d'un film occlusif, la protéolyse de la Flg est de même bloquée (Scott et Harding, 1986). Une seconde étude rapporte que, lorsque des souris adultes élevées dans un environnement présentant une humidité normale (40-70% d'humidité relative) sont transférées dans un environnement sec (<10% d'humidité relative), la détection de la Flg ainsi que la quantité d'acides aminés libres produits diminuent fortement dans les premières 24h après le transfert. Les quantités de Flg et d'acides aminés reviennent ensuite à un niveau normal après quelques jours passés dans ce même environnement sec (Katagiri *et al.*, 2003). La protéolyse de la Flg est ainsi un processus adaptatif, qui semble prendre quelques jours pour se mettre en place chez la souris adulte.

Ce phénomène de régulation de la dégradation de la FLG par le taux d'humidité ambiante n'a cependant jamais été démontré chez l'homme et les mécanismes moléculaires sous-jacents contrôlant ce processus restent inconnus.

D. Implications physiopathologiques de la filaggrine

Le rôle essentiel de la FLG dans l'homéostasie de la barrière épidermique a été mis en évidence par le développement récent de modèles murins et d'épidermes humains reconstruits *in vitro* déficients en Flg/FLG ainsi que par l'étude de l'ichtyose vulgaire et de la dermatite atopique, deux pathologies humaines dans lesquelles la FLG est fortement impliquée.

1. Modèles déficients en filaggrine

a. Modèle murin

Des souris dont le gène *Flg* a été inactivé ont récemment été produites (Kawasaki *et al.*, 2012). Avant la pousse des poils, ces souris exhibent une peau sèche et écailleuse. Au niveau microscopique, le nombre de grains de kératohyaline est fortement diminué, la couche cornée est plus épaisse (hyperkératose) et le cytosquelette de kératines intracornéocytaire présente une organisation anormale. La quantité de FNH détecté dans la couche cornée est aussi fortement diminuée. De plus, la couche cornée de ces souris est plus fragile : le stress mécanique engendré par délaminage au scotch induit une desquamation plus importante que pour les souris contrôles de la même portée. Ces animaux présentent une perte en eau trans-épidermique normale mais une perméabilité de la barrière épidermique de l'extérieur vers l'intérieur augmentée (démontrée à l'aide d'un test de pénétration d'un colorant déposé à la surface de l'épiderme), conduisant à une augmentation de la pénétration d'antigènes à travers leur épiderme en comparaison aux souris sauvages.

b. Epidermes reconstruits humains

Plusieurs modèles d'épiderme humain produits *in vitro* dans lesquels l'expression de la FLG a été inhibée par interférence à l'ARN ont récemment été développés.

Des épidermes reconstruits sur membrane de polycarbonate ont été produits en utilisant des kératinocytes primaires humains traités avec des shRNAs ciblant spécifiquement l'ARNm de la FLG dans mon laboratoire (Pendaries *et al.*, 2014). Au niveau protéique, la quantité de FLG est diminuée de plus de 90% ce qui conduit à une absence de granules de kératohyaline, une perturbation de l'expression de marqueurs de la différenciation épidermique (au niveau des ARNm et des protéines), une désorganisation de la structure de la matrice intracornéocytaire et une diminution de l'épaisseur de la couche cornée. Les épidermes reconstruits déficients en FLG présentent de plus une concentration diminuée en UCA et PCA, associée à une hypersensibilité aux rayons ultraviolets B et à une augmentation de la pénétration d'un colorant (le lucifer yellow), de l'intérieur vers l'extérieur, démontrant une plus grande perméabilité.

Dans un autre modèle où l'épiderme est reconstruit sur un équivalent dermique contenant des fibroblastes en utilisant des kératinocytes traités avec des siRNAs spécifiques de *FLG*, une hypogranulose, un niveau diminué d'UCA associé à une augmentation de l'apoptose induite par les rayons ultraviolets B, et une augmentation de la pénétration de colorant dans l'épiderme sont également mis en évidence. Par contre, la différenciation kératinocytaire et l'organisation des

kératines semblent normales dans ce modèle alors que la formation des corps lamellaires est perturbée (Mildner *et al.*, 2010).

Dans un troisième modèle similaire à celui de Mildner *et al.*, une accumulation d'acides gras libres au niveau des espaces intercornéocytaires conduisant à une perturbation de l'organisation des *lamellae* a été rapportée (Vávrová *et al.*, 2014). De plus, une augmentation de la perméabilité trans-épidermique ainsi qu'une plus forte production de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 par les kératinocytes ont aussi été observées (Küchler *et al.*, 2011).

2. L'ichtyose vulgaire

L'ichtyose vulgaire (OMIM #146700, *ichtyosis vulgaris*) est la plus courante des pathologies cutanées héréditaires (pour revue Thyssen *et al.*, 2013). En 2006, une étude publiée par Smith *et al.* a montré que cette maladie est causée par des mutations non-sens du gène *FLG*. Les mutations initialement décrites, p.R501X et c.2282del4, correspondent à la première sous-unité de FLG et entraînent donc, à l'état homozygote ou hétérozygote composite (deux allèles mutés), une perte totale d'expression de la FLG (Figure 28G-H ; Smith *et al.*, 2006). Depuis, de nombreuses autres mutations ont été découvertes, touchant diverses sous-unités de FLG, entraînant toutes l'expression diminuée d'une forme tronquée de proFLG qui n'est jamais protéolysée en monomères (Sandilands *et al.*, 2009). Cette maladie se transmet selon un mode autosomique semi-dominant. En effet, alors que les patients hétérozygotes simples (n'ayant qu'un allèle muté) présentent un phénotype modéré, les patients hétérozygotes composites ou homozygotes présentent des formes plus sévères de la maladie (Smith *et al.*, 2006). La pénétrance du phénotype semble incomplète puisque certains individus hétérozygotes ou même homozygotes ne présentent aucun symptôme.

L'ichtyose vulgaire est caractérisée par une sécheresse cutanée généralisée, avec formation de fines écailles (ou squames ; « *ichthyos* » signifiant poisson en grec ancien) principalement au niveau des membres et du tronc. Une hyperlinéarité palmoplantaire et une kératose pilaire (défaut de kératinisation localisé au niveau des follicules pileux qui se caractérise par un aspect de « chair de poule » et se localise principalement sur la face dorsale des bras, la face antérieure des cuisses et le visage) sont de plus fréquemment observées chez les patients atteints d'ichtyose vulgaire (Figure 28A-D). Une augmentation de la perte en eau trans-épidermique et du pH cutané et une diminution du FNH sont également observées. Aussi, ces défauts de barrière épidermique induisant un risque augmenté de pénétration d'allergènes et autres agents exogènes (chimiques, polluants, micro-organismes), les patients atteints d'ichtyose vulgaire présentent plus fréquemment une sensibilisation allergique. Alors que le lien de cause à effet entre les mutations du gène *FLG* et l'établissement d'une peau sèche est évident, la présence de l'hyperlinéarité palmoplantaire et d'une

kératose pilaire chez les patients atteints d'ichtyose vulgaire reste incomprise. Une diminution de l'hydratation de la couche cornée induirait une diminution de la desquamation, ce qui explique l'excès de squames sur la peau des patients.

Du point de vue microscopique, l'ichtyose vulgaire se caractérise par une diminution du nombre et de la taille des granules de kératohyaline voire une absence totale de granules et par une légère hyperkératose (Figure 28E-F ; Sybert *et al.*, 1985). La proFLG est faiblement exprimée mais normalement distribuée au niveau de la couche granuleuse et cornée des patients hétérozygotes simples, alors qu'elle est absente dans l'épiderme de certains patients homozygotes ou hétérozygotes composites (Smith *et al.*, 2006). Les mutations de FLG ont été associées à une désorganisation du cytosquelette de kératines, à des anomalies de sécrétion des corps lamellaires, ainsi qu'à une organisation des lipides intercornéocytaires anormale. Les patients présentent enfin une diminution de la densité desmosomale et de l'expression des protéines des jonctions serrées. Il s'agit ici probablement de phénomènes secondaires, peut-être induits par l'augmentation de la production de cytokines suite à la pénétration d'éléments exogènes à travers l'épiderme (Yokouchi *et al.*, 2015).

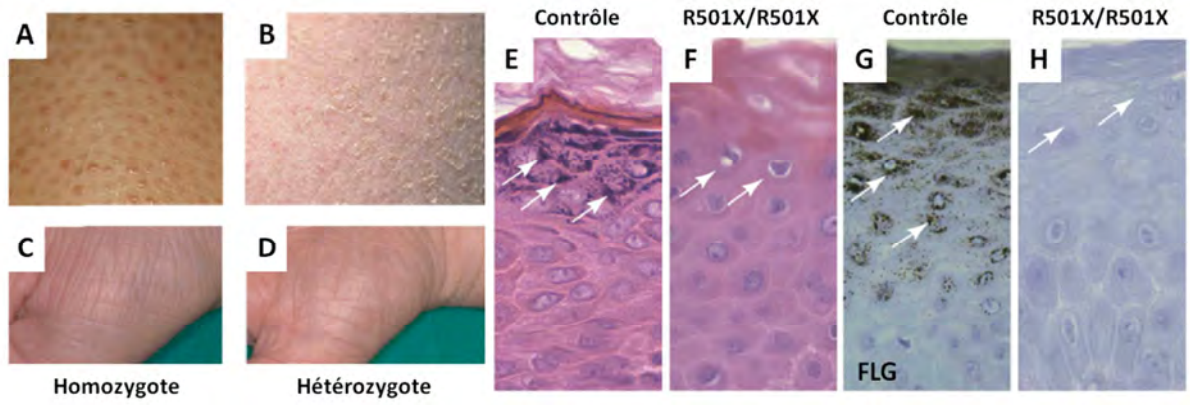


Figure 28 : Caractéristiques cliniques, macroscopiques et microscopiques de l'ichtyose vulgaire. (A) Kératose pilaire. (B) Fines écailles retrouvées au niveau abdominal. (C-D) Hyperlinéarité palmaire plus marquée chez un individu homozygote (C) qu'hétérozygote (D). (E-F) Colorations hémalun-éosine de l'épiderme d'un individu sain (E) et d'un patient homozygote pour la mutation R501X (F), chez lequel on remarque une agranulose. (G-H) Immunomarquage de la FLG dans l'épiderme d'un individu sain (G) et d'un patient homozygote pour la mutation R501X (H). On note une absence totale de la détection de FLG pour ce dernier. D'après (Smith *et al.*, 2006).

3. La dermatite atopique

La dermatite atopique (OMIM #605803 ; *atopic dermatitis*) ou eczéma atopique est une des pathologies inflammatoires cutanées chroniques les plus fréquentes chez l'homme. Dans les pays industrialisés, 15 à 20 % des enfants et 1 à 3 % des adultes en sont atteints et son incidence a augmentée de deux à trois fois durant les trente dernières années. Cette maladie se déclare dans

60% des cas avant l'âge de un an et disparait spontanément à l'adolescence dans 70 % des cas mais peut persister à l'âge adulte (Bieber, 2008).

La dermatite atopique évolue par poussées, en alternant phase aigüe et phase chronique. La phase aigüe est principalement caractérisée par des lésions enflammées érythémateuses (rougeurs de la peau qui traduit une vasodilatation) et suintantes, un prurit (démangeaisons) et la présence de papules et de croûtes (Figure 29A). Cette phase est caractérisée par une inflammation dominée par l'activation des cellules lymphocytaires T vers un phénotype du type T_H2 (« helper » de type 2) qui aboutit notamment à la libération d'histamine en quantité importante par les mastocytes au niveau des lésions participant à la vasodilatation, au prurit et à la formation d'œdèmes. Lors du stade chronique, la peau est sèche, squameuse et présente un aspect lichénifié. Au niveau inflammatoire, cette phase est dominée par une activation modérée de la voie T_H1. Ce concept de déséquilibre de la balance T_H1/T_H2 intervenant dans la dermatite atopique est cependant un peu trop « simpliste » (bien que les cascades de réactions impliquées soient déjà complexes) puisque diverses études montrent aussi l'implication des réponses T_H17 et T_H22 (Gittler *et al.*, 2012).

L'épiderme des patients atteints de dermatite atopique montre de nombreuses anomalies. Au niveau de l'épiderme cliniquement sain (en phase chronique), un infiltrat modéré de lymphocytes T est souvent observé suggérant une inflammation minimale. Au niveau des lésions aigües, des œdèmes intercellulaires sont observés induisant l'apparition de spongiose (espaces intercellulaires apparents), d'une acanthose (hyperplasie de l'épiderme et accentuation des crêtes épidermiques) ainsi que d'une hyperkératose (augmentation du nombre d'assises de cornéocytes) et une parakératose (persistance des noyaux au niveau de la couche cornée ; Figure 29B-C). Un important infiltrat inflammatoire (monocytes-macrophages et éosinophiles, principalement) est également présent au niveau du derme (Figure 29D). Une augmentation de la perte en eau trans-épidermique et du pH ainsi qu'une diminution de l'hydratation de la couche cornée sont rapportées sur l'ensemble de l'épiderme des patients avec un phénotype accentué au niveau des zones lésionnelles. Des

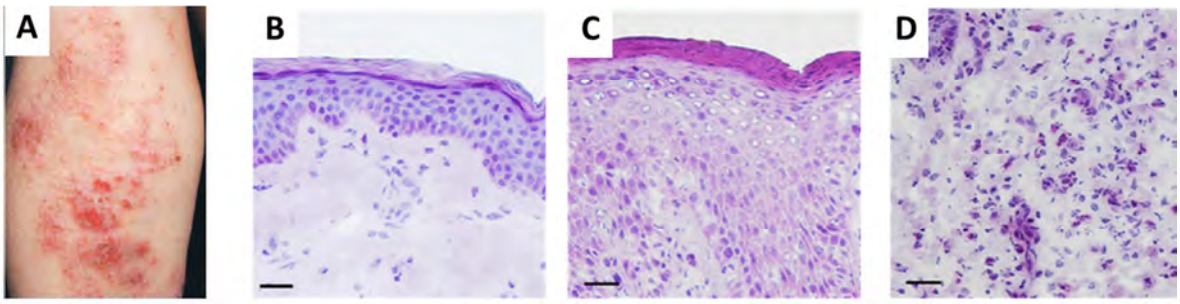


Figure 29 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la dermatite atopique. (A) Lychénification provoquée par le grattage chez l'adulte. D'après (Bieber, 2008). (B-D) Colorations hémalun-éosine d'une peau saine (B) et d'une peau atopique (C-D), au niveau de laquelle on observe une importante acanthose, une spongiose et un œdème intercellulaire, une hyperkératose et une parakératose (C) ainsi qu'un important infiltrat inflammatoire dermique (D). Barres d'échelle = 20 µm. D'après (Pellerin, 2013).

anomalies au niveau des structures de la couche cornée ont aussi été mises en évidence, principalement au niveau des zones lésionnelles telles que : une diminution de la cohésion de la couche cornée, une sécrétion réduite des corps lamellaires et un aspect anormal de la matrice intracornéocytaire et de l'enveloppe cornée, ainsi qu'une altération de la composition des lipides intercornéocytaires (Elias et Wakefield , 2014, Guttman-Yassy *et al.*, 2009, Smeden *et al.*, 2014). De plus, une complication fréquente de la dermatite atopique est la surinfection cutanée virale ou par *Staphylococcus aureus* (retrouvée chez 90% des patients ; Baker, 2006, Tauber *et al.*, 2016), expliquée au moins en partie par l'alcalinisation de l'épiderme des patients, favorable à la croissance de cette bactérie.

La dermatite atopique évolue fréquemment vers l'asthme, la rhinite allergique ou des allergies alimentaires : on parle de « marche atopique » (Spergel, 2010).

37 à 50% des patients atteints d'ichtyose vulgaire ont une dermatite atopique associée et environ 8% des patients atteints de dermatite atopique présentent des signes cliniques d'ichtyose vulgaire. On sait depuis longtemps que dans l'épiderme des patients, la quantité de FLG est diminuée au niveau des zones lésionnelles mais aussi au niveau de l'épiderme cliniquement sain (Seguchi *et al.*, 1996). Mais ce n'est qu'en 2006 que Palmer *et al.* ont démontré une association entre des mutations non-sens du gène *FLG* et la dermatite atopique. Cette étude montre qu'environ la moitié des patients irlandais atteints de dermatite atopique sont porteurs d'une mutation du gène *FLG* (Palmer *et al.*, 2006). Jusqu'alors, la dermatite atopique était décrite comme une maladie immunologique, le défaut de barrière épidermique étant considéré comme une conséquence des anomalies du système immunitaire. L'implication des mutations non-sens de la FLG a marqué un tournant dans la compréhension de cette maladie, suggérant que la présence d'un défaut de la barrière épidermique puisse être, du moins dans certains cas, initiatrice de la pathologie. Depuis cette première publication, de nombreuses études génétiques et méta-analyses ont permis de confirmer le lien entre plus de 50 mutations entraînant une perte de fonction de la FLG et la dermatite atopique, faisant des mutations du gène *FLG* le plus fort facteur de prédisposition à la dermatite atopique connu à ce jour dans les populations européennes et asiatiques (Irvine *et al.,* 2011). Bien que quelques-unes des mutations décrites soient retrouvées aussi bien chez les patients européens qu'asiatiques, elles sont en majorité spécifiques d'une population donnée. De plus, deux études récentes montrent que les mutations non-sens de *FLG* ne sont pas retrouvées chez des patients sud-africains et afro-américains (Thawer-Esmail *et al.,* 2014, Margolis *et al.,* 2014). Ces mutations semblent donc dépendantes de l'origine ethnique des patients.

Même si les mutations de la FLG prédisposent au développement de la dermatite atopique, elles n'expliquent pas à elles seules la survenue de la maladie puisque qu'elles sont retrouvées chez des individus sains ou atteints d'ichtyose vulgaire uniquement et que de nombreux patients atteints de

dermatite atopique ne portent pas de telles mutations du gène *FLG*. De récentes analyses génétiques ont permis de mettre en évidence l'implication de nombreux locus/gènes dans la susceptibilité à la dermatite atopique. La majorité de ces gènes sont associés à la réponse immunitaire (innée et adaptative) et à la fonction de barrière épidermique (*SPINK5, KLK7, filaggrine-2, …*) (pour revues : Barnes, 2010 ; Al-Shobaili *et al.,* 2016). En outre, l'augmentation de la prévalence de la dermatite atopique dans les pays industrialisés souligne l'influence de facteurs environnementaux sur le développement effectif de la maladie. L'excès d'hygiène, en particulier via l'usage excessif de savons et autres détergents fragilisant la barrière cutanée, associé à une exposition croissante à des polluants atmosphériques et allergènes environnementaux sont probablement les causes de cette augmentation.

Cependant, l'implication de la FLG dans la dermatite atopique semble majeure puisqu'une diminution de l'expression de la FLG, et en particulier une diminution de la détection des monomères de FLG, est observée dans l'épiderme des patients atteints de dermatite atopique, qu'ils soient porteurs d'une mutation du gène *FLG* ou non (Pellerin *et al.,* 2013). Cette diminution peut être causée par l'effet des cytokines pro-inflammatoires. En effet, lorsque des kératinocytes humains en culture sont traités avec de l'IL-4, IL-13 ou IL-25, l'expression de la (pro)FLG est très fortement réduite au niveau des taux de transcrits et de la protéine (Howell *et al.,* 2007, Hvid *et al.,* 2011, Pellerin *et al.,* 2013). L'expression d'autres protéines impliquées dans la différenciation épidermique est aussi réduite par ces traitements cytokiniques. Ainsi chez les patients atteints de dermatite atopique non porteurs de mutation de *FLG*, le défaut de FLG semble être dû à la réponse inflammatoire. Il est important de noter que d'autres facteurs peuvent réguler le niveau de (pro)FLG et notamment des facteurs environnementaux (Thyssen et Kezic, 2014). De plus, l'expression et/ou l'activité de la caspase 14 et de la bléomycine hydrolase sont diminuées dans l'épiderme des patients (Yamamoto *et al.,* 2011, Pellerin *et al.,* 2014). Cela suggère qu'en plus du défaut de synthèse de la FLG, une altération de sa protéolyse pourrait participer aux altérations de la barrière cutanée observées dans la maladie.

4. Les multiples fonctions de la filaggrine

De nombreux essais *in vitro,* la génération de modèles déficients en FLG, ainsi que l'étude de l'impact des mutations non-sens de *FLG* chez les patients atteints d'ichtyose vulgaire et de dermatite atopique, ont permis de mettre en évidence diverses fonctions de la protéine. Certaines d'entre elles sont maintenant clairement démontrées alors que d'autres restent putatives ou décryptées de façon incomplète. Un schéma récapitulatif est proposé à la Figure 30.

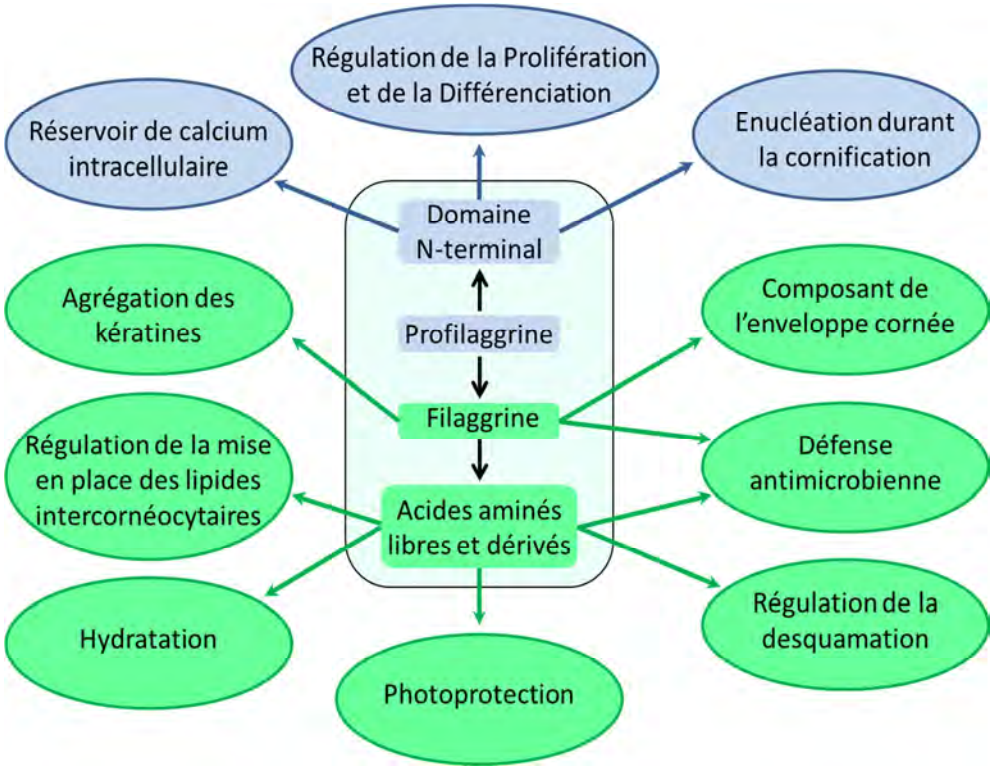


Figure 30 : Les multiples fonctions de la filaggrine dans l'homéostasie épidermique.

a. Rôles des domaines amino- et carboxy-terminaux de la profilaggrine

Une fois clivé, le domaine amino-terminal de la proFLG est, au moins en partie, transloqué au noyau grâce au signal de localisation nucléaire situé dans le sous-domaine B, et les sous-domaines A et B seraient alors séparés (Ishida-Yamamoto et al., 1998). Il a été suggéré que le domaine B, de par sa nature basique et hydrophobe, puisse se lier à l'ADN et agir en tant que facteur de transcription mais cela n'a jamais été démontré (Pearton *et al.*, 2002). En outre, le domaine amino-terminal de la proFLG est capable de fixer le calcium via les domaines EF-hand du sous-domaine A (Presland *et al.*, 1995). L'effet de la fixation du calcium sur ce domaine est inconnu mais il a été supposé que celui-ci constitue un « réservoir » de calcium intracellulaire, élément clé de la régulation de la différenciation épidermique (voir paragraphe I.D.2.c). Ceci pourrait ainsi permettre à la proFLG de réguler sa propre expression et son métabolisme, via la régulation de l'activité des enzymes dépendantes du calcium impliquées telles que les PADs, les TGases et certaines protéases, ainsi que de moduler la transcription de nombreuses protéines de la différenciation épidermique (Sandilands *et al.*, 2009). Une étude récente a montré que la surexpression du domaine amino-terminal dans des peaux reconstruites altère la différenciation épidermique en engendrant notamment une diminution de l'expression de la proFLG ainsi que de la loricrine et de la kératine 10. Cela inhibe de plus la prolifération (Aho *et al.*, 2012). Notons de plus que dans le modèle d'épiderme humain déficient en FLG (dans lequel le domaine amino-terminal de la FLG n'est donc pas produit) généré dans mon

laboratoire, des défauts de différenciation sont observés et l'expression de la loricrine est là aussi diminuée (Pendaries *et al.*, 2014). Le domaine amino-terminal de la FLG semble donc intervenir de manière subtile dans la régulation de la différenciation épidermique.

Le domaine amino-terminal de la proFLG pourrait également jouer un rôle dans la dégradation du noyau qui se produit lors de la transition couche granuleuse/couche cornée. Ceci a été suggéré par le fait que ce domaine colocalise avec de l'ADN fragmenté au niveau des cellules transitionnelles de l'épiderme (Ishida-Yamamoto et al., 1998).

Enfin, une partie des domaines amino-terminaux de la proFLG entrerait dans la composition de l'enveloppe cornée puisque les domaines A et B sont détectés à la périphérie des cornéocytes, même dans les assises les plus superficielles de la couche cornée (Preslands *et al.*, 1997).

Pour sa part, la fonction du domaine carboxy-terminal reste inconnue. Quelques données suggèrent cependant que sa présence est nécessaire pour que la production de la proFLG et de la FLG se déroule normalement. En effet, parmi les mutations du gène *FLG* responsables de l'ichtyose vulgaire, certaines se situent au niveau des régions condant les dernières répétitions de FLG (notamment les mutations c.11033del4 au niveau de la dixième sous-unité de FLG et p.Lys4021Ter au niveau de la sous-unité tronquée de FLG en amont du domaine C-terminal) et devraient en théorie permettre la synthèse d'une proFLG comprenant la majeure partie des sous-unités de FLG. Il a pourtant été montré que ces mutations engendrent une forte diminution du ratio proFLG/FLG (Sandilands *et al.*, 2007 ; Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009).

b. Rôle des monomères de FLG

Comme nous l'avons déjà vu dans le paragraphe consacré à la cornification (paragraphe I.E), les monomères de FLG assurent des fonctions multiples dans l'épiderme :

- Agrégation des filaments intermédiaires de kératines

Les monomères de FLG s'associent aux filaments de kératines et facilitent leur agrégation, essentielle à la formation de la matrice fibreuse intracornéocytaire (voir paragraphe I.E.1.b). Ceci a initialement été démontré *in vitro* : lorsque des filaments intermédiaires de kératines de rat sont incubés avec des monomères de Flg cela induit leur agrégation. En effet, la Flg présentant globalement une charge basique, elle est capable de se lier aux kératines (Figure 31A ; Lonsdale-Eccles *et al.*, 1982). Il semble que ces interactions se fassent principalement via l'établissement de liaisons ioniques formant une sorte de « fermeture éclair ionique » selon Mack *et al*. (Figure 31B). Ces liaisons ioniques se forment principalement entre les charges positives des résidus histidine et arginine et négatives des coudes β de la Flg et les charges positives et négatives régulièrement réparties le long des domaines centraux des kératines (Mack *et al.*, 1993). La proFlg phosphorylée,

beaucoup plus acide que le monomère, est quant à elle incapable d'agréger les filaments de kératines *in vitro* (Lonsdale-Eccles *et al.*, 1982). Cette fonction de la Flg a ensuite été confirmée *in vivo*. L'épiderme de souris pour lesquelles le gène *Flg* a été invalidé présente en effet une désorganisation du cytosquelette de kératines (Kawasaki *et al.*, 2012). De même, d'importants défauts de formation de la matrice intracornéocytaire ont été observés dans les épidermes reconstruits humains déficients en FLG produits dans mon laboratoire (Pendaries *et al.*, 2014). Enfin, des altérations de l'organisation des filaments de kératines, avec notamment une rétraction périnucléaire, ont été mises en évidence dans l'épiderme de patients atteints d'ichtyose vulgaire (Gruber *et al.*, 2011).

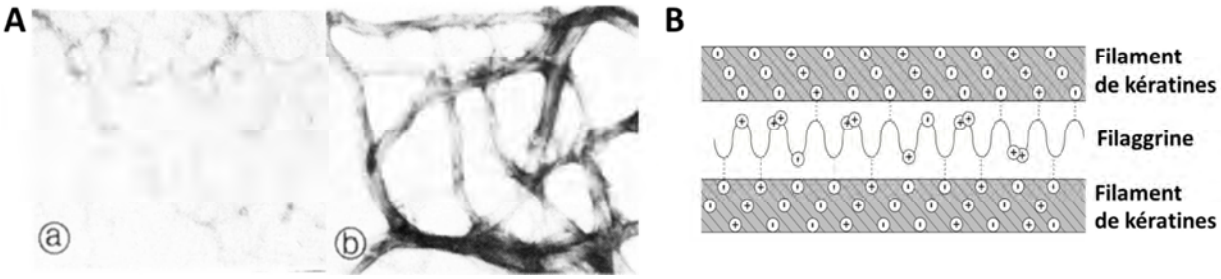


Figure 31 : Agrégation des filaments de kératines par les monomères de filaggrine. (A) Observation en microscopie électronique à transmission de filaments intermédiaires de kératines de rat seuls (a) ou mélangés à des monomères de Flg (b). D'après (Lonsdale-Eccles *et al.*, 1982). (B) Modèle de l'interaction en « fermeture éclair ionique » entre les monomères de Flg et les filaments intermédiaires de kératines. D'après (Mack *et al.*, 1993).

- Production des acides aminés du FNH

Comme décrit plus haut, les acides aminés et dérivés d'acides aminés composant le FNH sont principalement générés par la protéolyse des monomères de la FLG faisant suite à sa désimination. La FLG joue ainsi un rôle majeur dans les diverses fonctions assurées par ces éléments du FNH (voir paragraphe I.E.5.b).

- Composants mineurs de l'enveloppe cornée

Une petite partie des monomères de FLG est incorporée à l'enveloppe cornée et représente environ 7% des protéines totales de celle-ci (voir paragraphe I.E.2.c). La FLG serait principalement liée à la loricrine au sein des enveloppes cornées (Steinert et Marekov, 1995).

- Rôle antimicrobien potentiel

En plus du rôle antimicrobien du FNH et en particulier de l'UCA et du PCA (via l'acidification du *stratum corneum*), la FLG pourrait constituer un réservoir de peptides antimicrobiens. En effet, des peptides recombinants de proFLG humaine (correspondant à des fragments de sous-unités de FLG mais aussi à des fragments des domaines amino- et carboxy-terminaux), ont montré une activité antibactérienne *in vitro* contre des souches d'*Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus* et de *Porphyromonas aeruginosa* (Behrendt *et al.*, 2010).

III. LE FOLLICULE PILEUX ET LA TRICHOHYALINE

Au cours de ma thèse, la mise en place d'une nouvelle collaboration m'a donné l'opportunité de participer à l'étude d'une maladie du cheveu (voir article 3 de la partie « Résultats expérimentaux »). Ainsi, ce troisième chapitre décrit brièvement l'organisation et la différenciation du follicule pileux ainsi que la structure et la fonction de la TCHH, une protéine apparentée à la filaggrine et exprimée dans le follicule pileux.

A. Structure du follicule pileux

Les follicules pileux sont présents sur toute la surface de la peau, à l'exception des zones palmoplantaires, des lèvres et de certaines parties génitales. Chez l'homme, on en dénombre environ 5 millions, dont 100 000 à 150 000 au niveau du cuir chevelu.

Les follicules pileux se forment lors du développement embryonnaire via des interactions entre les cellules ectodermiques et des cellules du mésoderme. Ils s'invaginent dans le derme ou l'hypoderme et sont toujours accompagnés d'une glande sébacée et, dans certains territoires, d'un muscle arrecteur et/ou d'une glande sudoripare apocrine (Figures 32A et 33).

Le follicule pileux présente une structure complexe ; il est formé d'une tige pilaire guidée par des gaines épithéliales concentriques et est entouré d'une gaine conjonctive synthétisée par les fibroblastes et essentiellement constituée de collagènes de types I et III (Figure 32A et B).

La papille dermique est un bourgeonnement d'origine dermique qui se trouve à la base du follicule pileux et qui est en continuité avec la gaine conjonctive. Elle est le point d'ancrage du follicule pileux. Fortement vascularisée et innervée, elle participe à la nutrition des cellules folliculaires et à la régulation du cycle pilaire.

La matrice pilaire, qui constitue la base du follicule pileux, est séparée de la papille dermique par une lame basale. Les cellules de la matrice sont des kératinocytes mitotiquement très actifs. C'est également dans cette zone que l'on trouve les mélanocytes responsables de la synthèse des mélanines donnant sa couleur au cheveu. La différenciation des cellules matricielles va donner naissance aux différents types cellulaires composant le follicule pileux mature. Ces différents types cellulaires sont organisés en couches concentriques que l'on peut décrire en trois compartiments principaux : la tige pilaire, la gaine épithéliale interne et la gaine épithéliale externe (Figure 32).

La tige pilaire, dont le diamètre varie de 50 à 100 µm, est composée de deux à trois couches. De la périphérie vers le centre, on trouve : la cuticule, le cortex et la médulla (lorsque celle-ci existe).

Le cortex représente la majorité de la structure. Il est formé de plusieurs assises de kératinocytes. Une fois différenciées, les cellules corticales sont allongées de manière parallèle à

l'axe de la tige pilaire. Elles sont mortes et majoritairement composées de macrofibrilles de kératines, entre lesquelles on observe quelques rémanents cellulaires. La membrane nucléaire semble notamment devenir insoluble et persister alors que la chromatine a été totalement dégradée (Rogers, 2004). Le cortex confère ainsi à la tige pilaire sa rigidité.

La médulla, lorsqu'elle existe, se retrouve sur une section de 10 à 20 µm au centre du cortex. Elle est abondante dans les poils de barbe et souvent absente dans les poils ou cheveux fins. Les cellules de la médulla suivent un programme de mort cellulaire très spécifique, initié par la formation de granules de TCHH et aboutissant à la formation de cavités entre les cellules. La médulla participe ainsi au rôle d'isolant thermique des poils. Des cellules corticales peuvent par ailleurs se retrouver insérées au sein des cellules médullaires ou partiellement segmenter la médulla (Figure 32C ; Langbein *et al.*, 2010).

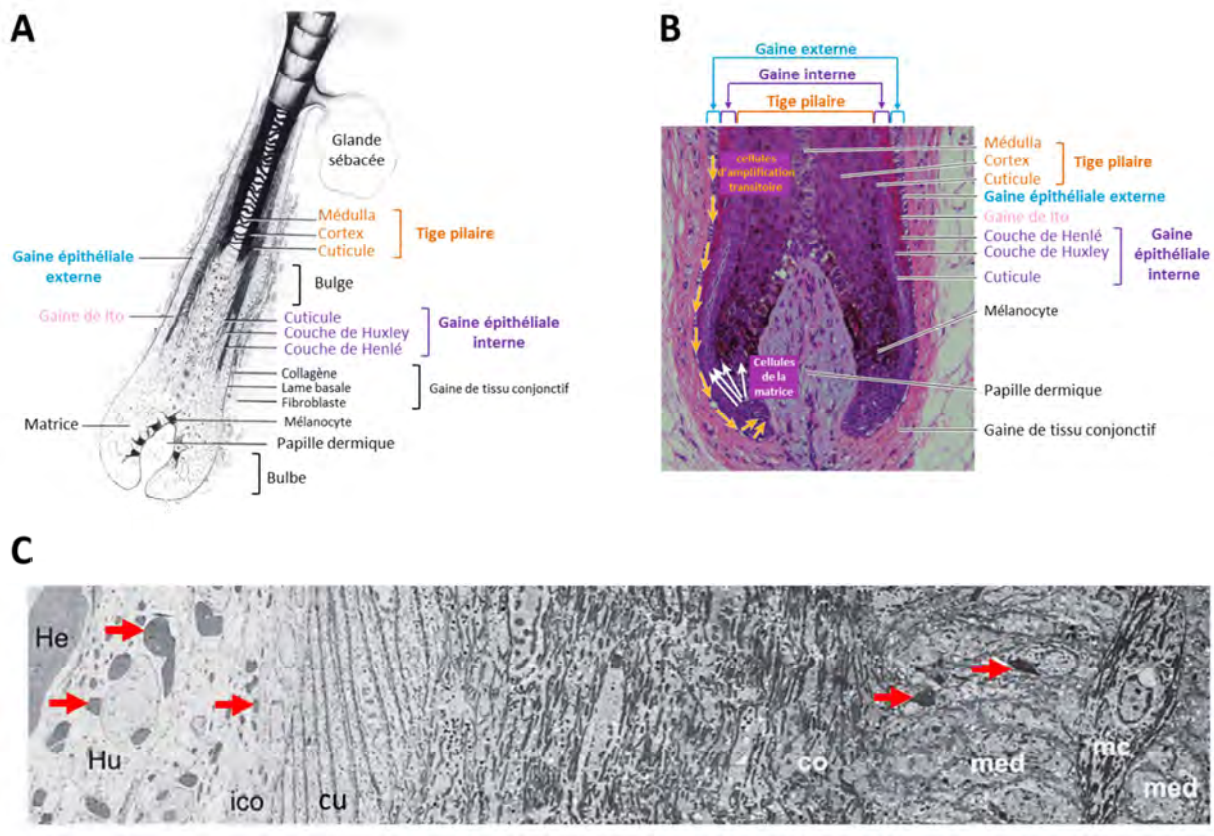


Figure 32 : Structure du follicule pileux. (A) Représentation schématique de la structure d'un follicule pileux anagène. D'après (Parakkal, 1990). (B) Coloration hémalun-éosine d'un follicule pileux anagène. Les cellules d'amplification transitoire provenant de la gaine épithéliale externe au niveau du bulge migrent vers la matrice du follicule pileux afin de renouveler les cellules prolifératives de la matrice. Les cellules de la matrice se divisent puis migrent vers la surface et se différencient pour générer les différentes couches du follicule. D'après (Shimomura et Christiano, 2010). (C) Observation en microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'un follicule pileux en cours de différenciation. Les flèches rouges indiquent la présence de grains de TCHH. He : couche de Henlé, Hu : couche de Huxley, ico : cuticule de la gaine interne, cu : cuticule de la tige pilaire, co : cortex, med : médulla, mc : cellules corticales insérées dans la médulla. D'après (Langbein *et al.*, 2010).

À la périphérie de la tige pilaire, la cuticule est formée de plusieurs assises de kératinocytes aplatis et cornifiés se chevauchant (Figure 32C). Ces cellules cuticulaires différenciées sont bipolarisées et présentent une structure complexe. Sur la face externe de ces cellules, on observe une structure protéique rigide, appelée « couche A », qui fait penser à l'enveloppe cornée épidermique. Elle est recouverte d'une couche lipidique composée d'acides gras libres à longue chaîne. La cuticule est ainsi responsable de l'hydrophobicité de la tige pilaire (Rogers, 2004).

La gaine épithéliale interne est formée de trois couches. De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve la cuticule de la gaine interne, la couche de Huxley et la couche de Henlé. La cuticule de la gaine interne est une monocouche de cellules aplaties disposées en écailles, la couche de Huxley est constituée de plusieurs assises cellulaires et la couche de Henlé est formée d'une assise de cellules cubiques. Avant la cornification des cellules de la gaine, on observe des granules de TCHH en quantité abondante dans leur cytoplasme (Figure 32C). Une fois cornifiée, la gaine épithéliale interne constitue une structure très rigide qui semble jouer un rôle important dans la détermination de la forme de la tige pilaire. Dans la partie supérieure du follicule pileux, les kératinocytes se détachent dans le canal folliculaire au cours d'un processus semblable à la desquamation, libérant ainsi la tige pilaire (Morioka, 2009).

Enfin, la gaine épithéliale externe est en continuité avec l'épiderme interfolliculaire. Elle est séparée de la gaine épithéliale interne par une monocouche de cellules, appelée gaine de Ito ou couche de compagnie. Le bulge est un renflement de la gaine épithéliale externe situé sous l'abouchement du canal sébacé, visible surtout pour les poils de souris, et qui sert de point d'attache au muscle arrecteur du poil. Il héberge une partie des cellules souches qui assurent la croissance et l'auto-renouvellement du follicule pileux. Elles sont capables de donner naissance à des cellules progénitrices folliculaires (ou cellules d'amplification transitoires) qui migrent alors vers la base du follicule pileux afin de renouveler les cellules prolifératives de la matrice (Figure 32B ; Shimorura et Christiano, 2010). En outre, les cellules souches du bulge peuvent aussi générer des cellules progénitrices de l'épiderme interfolliculaire ou des sébocytes afin de renouveler ces structures lors d'une blessure. Elles jouent ainsi un rôle important lors de la cicatrisation. Des expériences de suivi de descendance de ces cellules souches ont cependant montré qu'elles ne participent pas à l'homéostasie de l'épiderme normal, qui possède ses propres cellules souches (Clayton *et al.*, 2007 ; voir paragraphe I.D.1).

B. Le cycle pilaire

Le follicule pileux est une structure dynamique qui subit un processus de renouvellement cyclique. Chez l'homme, chaque follicule pileux engendre une vingtaine de poils ou cheveux durant

une vie. Le cycle pilaire se décompose en trois phases : anagène, catagène et télogène (Fuchs, 2007). La phase anagène correspond à la phase de croissance du poil. Elle est caractérisée par une intense activité mitotique et dure 2 à 8 ans au niveau du cuir chevelu, alors qu'elle est inférieure ou égale à 6 mois dans les autres zones du corps. Plus de 80% de nos cheveux sont ainsi en phase anagène. La phase catagène est une phase de régression durant environ 2 semaines et au cours de laquelle les deux tiers inférieurs du follicule pileux vont subir une apoptose intense conduisant à sa destruction progressive. Enfin, la phase télogène est une phase de latence qui dure 3 à 4 mois. Durant cette phase, la papille dermique est maintenue à proximité du bulge. Lorsqu'un seuil critique de facteurs activateurs est atteint, les cellules progénitrices du bulge s'activent et engendrent le début d'une nouvelle phase anagène. Le follicule, considéré comme mort, finit ainsi par être expulsé par la poussée d'un nouveau poil (Figure 33).

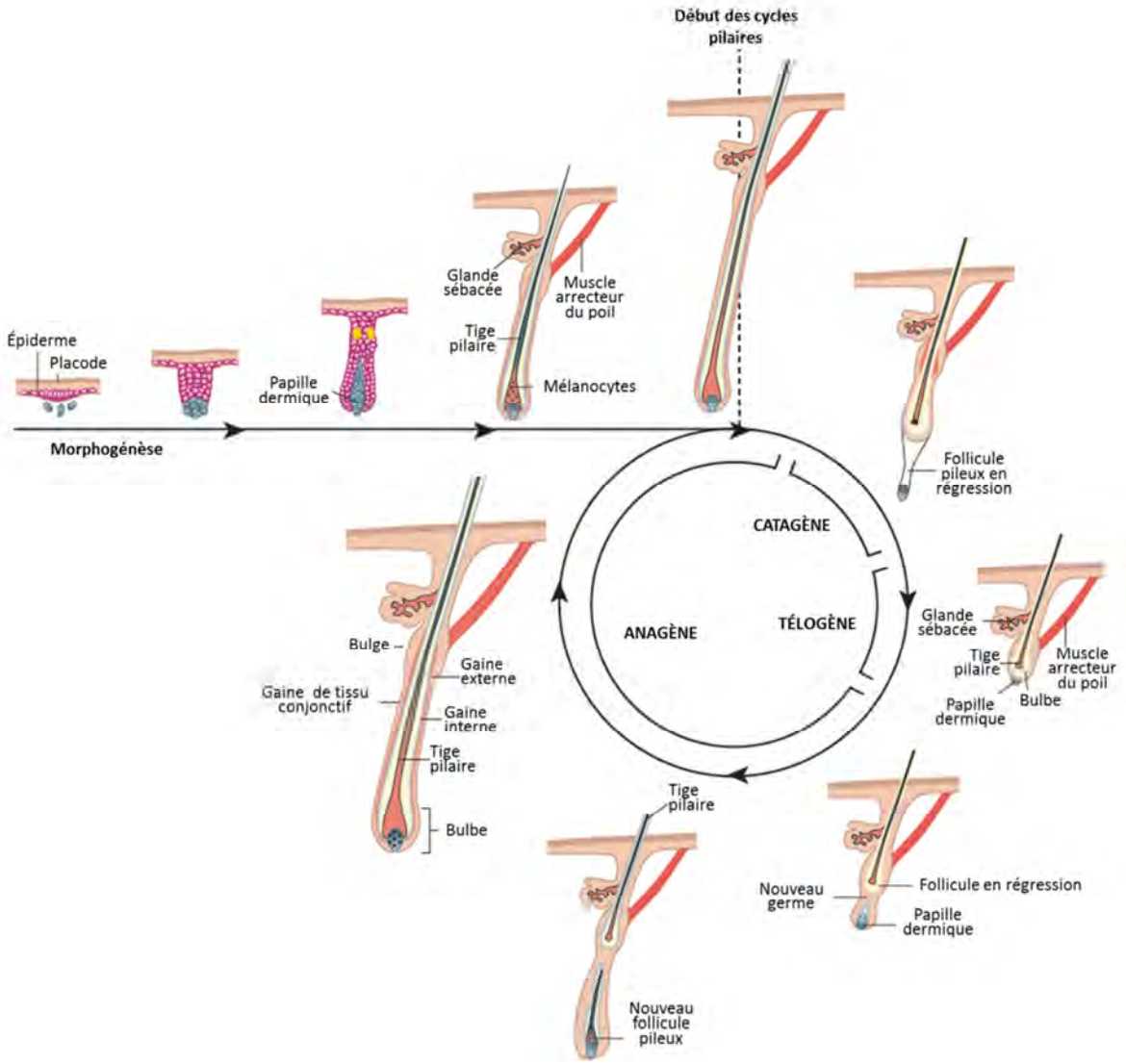


Figure 33 : Le cycle pilaire. Au cours du développement embryonnaire, l'ectoderme et le mésoderme interagissent pour permettre la morphogenèse du follicule pileux. Une fois le follicule pileux mis en place, il va obéir à un cycle dynamique de renouvellement permanent où phases de croissance (anagène), de régression (catagène) et de latence (télogène) s'alternent. D'après (Fuchs, 2007).

C. Les grandes étapes de la différenciation du follicule pileux

Les cellules de la matrice du follicule pileux se divisent de manière active et migrent progressivement vers le haut du follicule. À partir d'une certaine zone, appelé niveau critique ou ligne d'Auber, les cellules, à l'exception de celles de la gaine épithéliale externe, cessent de se diviser et commencent à se différencier. Selon les couches dans lesquelles elles s'engagent, les cellules folliculaires vont subir des processus de différenciation spécifiques et asynchrones (Figure 34). Elles vont notamment exprimer des protéines spécifiques, et en particulier un panel de kératines et de protéines associées aux kératines (des familles riches en souffre, très riches en souffre, et riches en glycine et tyrosine), en fonction de la couche folliculaire dans laquelle elles se trouvent et de leur stade de différenciation (Rogers *et al.*, 2006 ; Langbein *et al.*, 2010). Ceci fait de la différenciation folliculaire un phénomène extrêmement complexe.

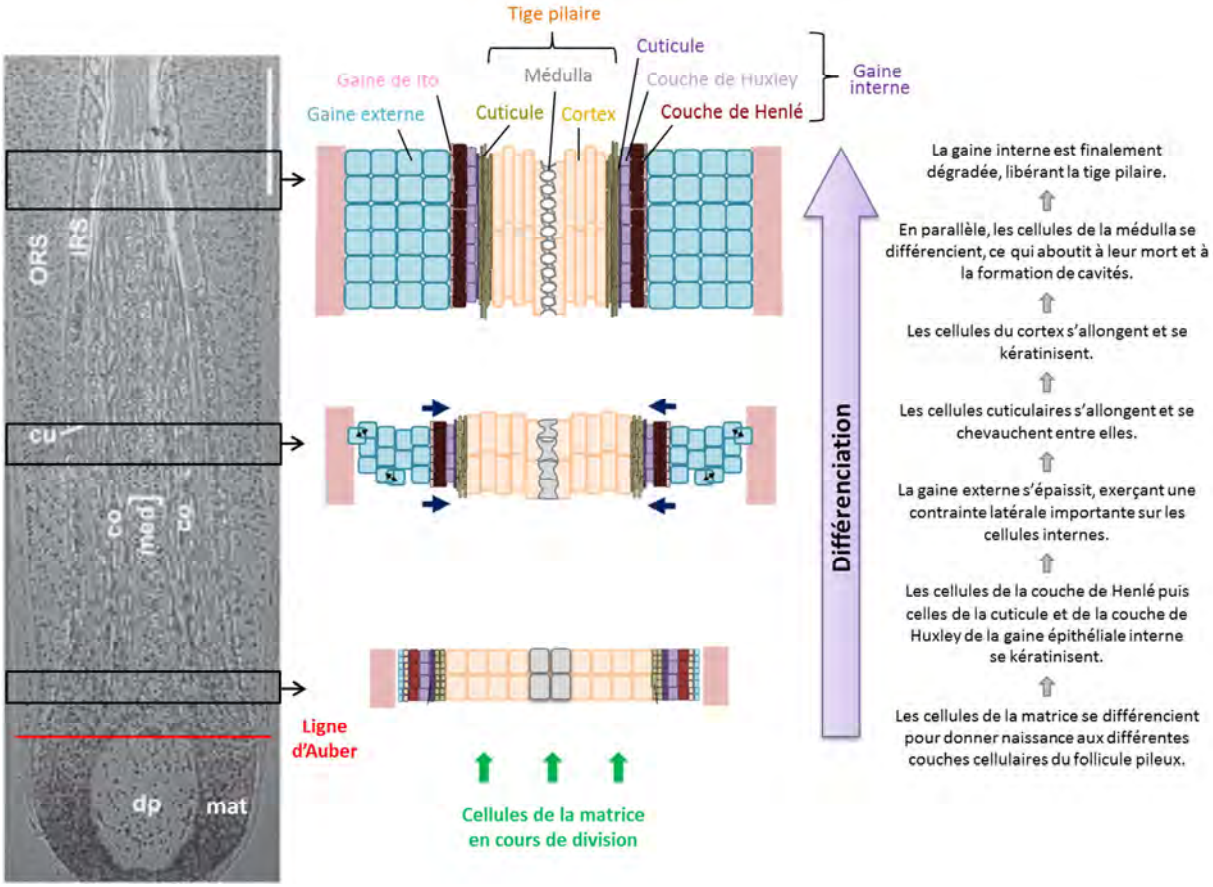


Figure 34 : Différenciation du follicule pileux. Représentation schématique des principales modifications morphologiques subies par les différents types cellulaires du follicule pileux au cours de sa différenciation. ORS : gaine épithéliale externe, IRS : gaine épithéliale interne, dp : papille dermique, mat : matrice, co : cortex, med : médulla. Adapté de (Langbein *et al.*, 2010 ; Barthélémy, 2011).

Au fur et à mesure de leur migration vers la surface cutanée, les cellules corticales et cuticulaires de la tige pilaire s'allongent dans le sens de la pousse. Parallèlement à leur élongation, les cellules cuticulaires se superposent les unes aux autres telles des tuiles. L'élongation de ces cellules coïncide

avec la cornification précoce de la couche de Henlé suivie de celles de la cuticule puis de la couche de Huxley de la gaine épithéliale interne. Dans cette même zone, la gaine épithéliale externe s'épaissit progressivement vers la surface cutanée, comme on l'observe sur le cliché de microscopie électronique à transmission de la Figure 34. La combinaison de ces évènements semble exercer une pression latérale sur les cellules internes, ce qui contribue probablement à leur déformation. En outre, la rigidification de la gaine épithéliale interne via sa cornification, qui a lieu en amont de celle du cortex et de la cuticule de la tige pilaire, semble jouer un rôle majeur dans la détermination de la forme de la tige pilaire.

La différenciation des trois couches de la gaine interne est caractérisée par la synthèse de TCHH qui forme dans un premier temps des granules cytoplasmiques de grandes tailles (Figure 32C). La TCHH se disperse ensuite progressivement et s'associe aux filaments de kératines auxquels elle est liée alors de manière covalente. Une kératinisation semblable à celle du cortex de la tige pilaire se déroule dans ces cellules, avec agrégation et alignement des filaments de kératines parallèlement au sens de la pousse, à la différence que les liaisons covalentes stabilisant la structure sont ici principalement des liaisons isopeptidiques catalysées par les TGases et non des ponts disulfures. Les cellules kératinisées de la gaine épithéliale interne sont finalement éliminées dans la partie supérieure du follicule pileux, avant l'abouchement du canal sébacé, ce qui aboutit à la libération de la tige pilaire. Il semblerait qu'elles soient éliminées via un processus impliquant une activité protéolytique accrue, similaire au phénomène de desquamation épidermique (Rogers, 2004).

Simultanément à leur élongation, les cellules du cortex se différencient puis se kératinisent. Elles expriment dans un premier temps les kératines 35 (type I) et 85 (type II), qui s'assemblent en hétérodimères au sein des filaments intermédiaires (voir paragraphe I.E.1.a), puis celles-ci sont ensuite remplacées par plusieurs autres isoformes de type I et de type II, et diverses protéines associées aux kératines sont exprimées de concert. L'expression de ces kératines et protéines associées aux kératines spécifiques engendre la production intense de filaments intermédiaires, qui s'agrègent progressivement et s'organisent de manière parallèle à l'axe d'élongation à mesure que les cellules migrent vers la surface. L'assemblage de plusieurs centaines de filaments intermédiaires aboutit à la formation des macrofibrilles du cortex. Ces structures sont stabilisées via la formation de liaisons disulfures interchaînes. On compte une dizaine de macrofibrilles par cellule corticale. En fin de kératinisation, la chromatine ainsi que la majorité des organelles sont dégradées, seuls quelques débris de membranes nucléaires insolubles persistent entre les macrofibrilles (Figure 35). Après la kératinisation, le cortex suit une phase de consolidation durant laquelle les filaments adoptent leur arrangement final suite à la déshydratation et à l'oxydation des cellules.

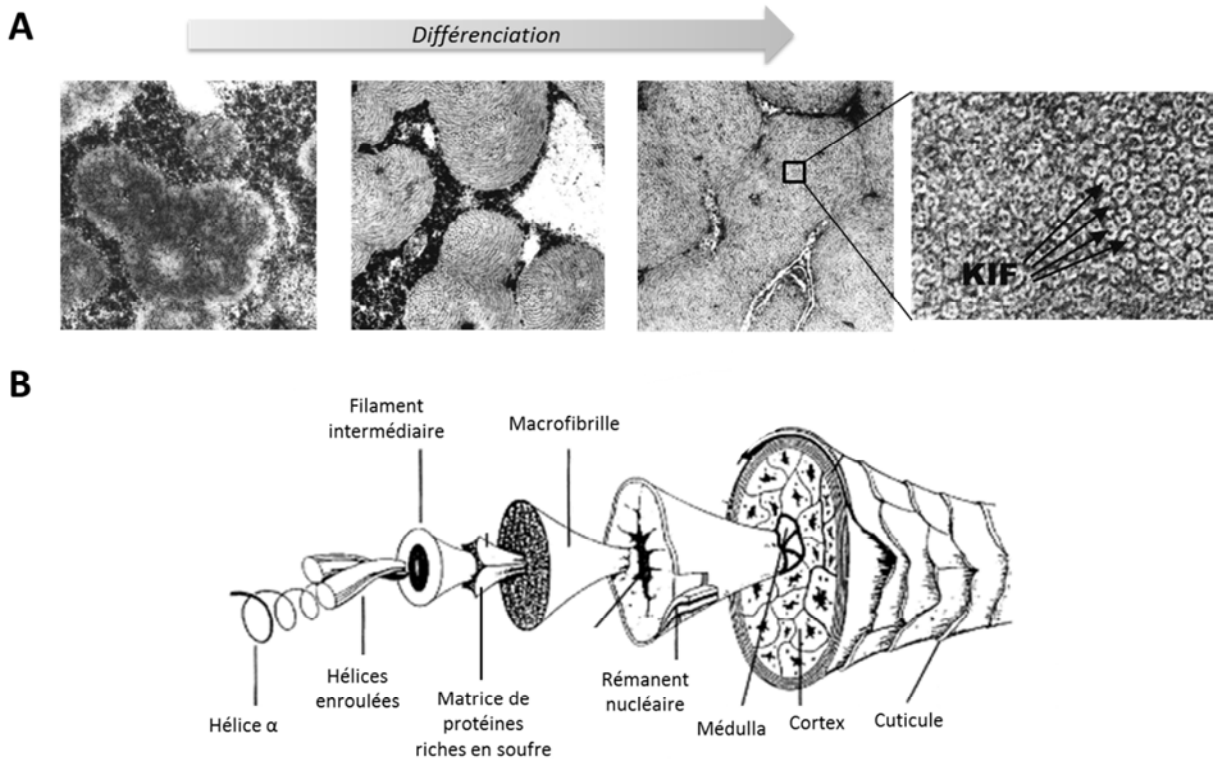


Figure 35 : Différenciation du cortex. (A) Observation en microscopie électronique à transmission du cortex à différents stades de différenciation. Lors de la différenciation, les filaments intermédiaires de kératines (KIF) s'associent les uns aux autres de manière parallèle au sens de la pousse et forment les macrofibrilles. (B) Une fois différenciée, chaque cellule corticale contient une dizaine de macrofibrilles, elles-mêmes composées de l'association de centaines de filaments intermédiaires de kératines. Adapté de (Jones, 2001 ; Wolfram, 2003 ; Rogers, 2004).

Les cellules cuticulaires de la tige pilaire expriment des kératines spécifiques : les kératines 32 et 82. Bien que des systèmes filamentaires puissent être observés durant la phase d'élongation, il n'y a pas de macrofibrilles qui se forment au sein de la cuticule. Par contre, l'apparition de granules coïncide avec l'expression de diverses protéines associées aux kératines spécifiques de la cuticule. Les granules, de petites tailles, s'agrègent dans le cytoplasme le long de la paroi périphérique pour constituer la couche A (une structure semblable à l'enveloppe cornée épidermique). Pendant la phase de kératinisation, les kératines 39 et 40 viennent remplacer les précédentes et se lient à des protéines associées aux kératines riches en soufre, via un dense réseau de liaisons covalentes pour former la structure amorphe et homogène de l'exocuticule. Lorsque l'exocuticule est constituée, les résidus cytoplasmiques se condensent et se regroupent au niveau de la paroi interne de la cellule pour former l'endocuticule (Figure 36).

En parallèle à la différenciation des cellules du cortex et de la cuticule, les cellules de la médulla, lorsqu'elles existent, suivent un programme de mort cellulaire bien particulier. Un des premiers signes de différenciation des cellules de la médulla est la formation de granules de TCHH dans leur cytoplasme. Vient ensuite la formation de pseudopodes (déformation de la membrane plasmique) sur les faces latérales des cellules de la médulla. Simultanément, les cellules corticales forment des

protrusions s'invaginant dans la médulla au niveau de ces pseudopodes. Les cellules de la médulla meurent progressivement et se rétractent pendant que les granules de TCHH qu'elles contiennent se dispersent et forment une matrice amorphe. La rétractation des cellules, associée à l'augmentation de la surface membranaire et à la pression latérale, finit par engendrer la formation de cavités entre les cellules de la médulla (Figure 37 ; Morioka, 2009).

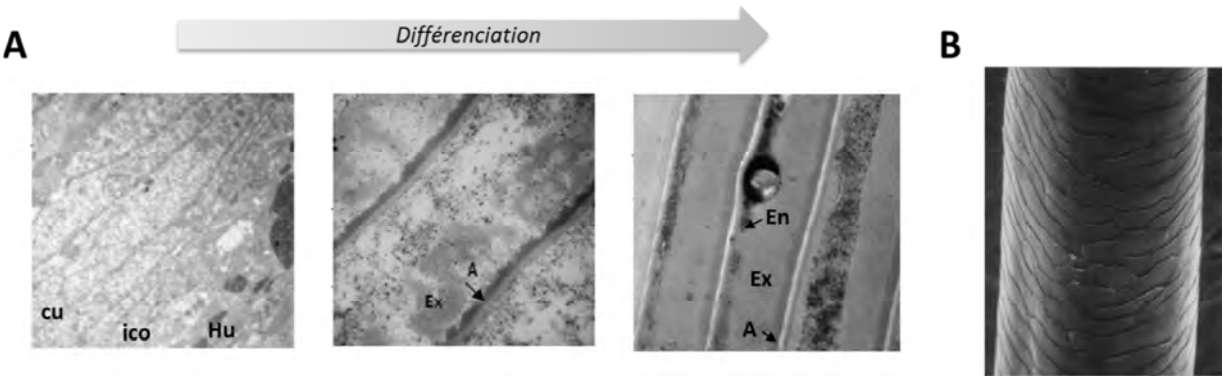


Figure 36 : Différenciation de la cuticule de la tige pilaire. (A) Observation en microscopie électronique à transmission de la cuticule de la tige pilaire à différents stades de différenciation. Lors de la différenciation, la cellule se polarise : la couche A (A) se forme alors que l'exocuticule (Ex) apparaît plus progressivement. Les résidus cytoplasmiques se condensent ensuite et se regroupent au niveau de la paroi interne pour former l'endocuticule (En). Adapté de (Barthélémy, 2011). (B) Observation en microscopie électronique à balayage de la cuticule de la tige pilaire. D'après (Wolfram, 2003).

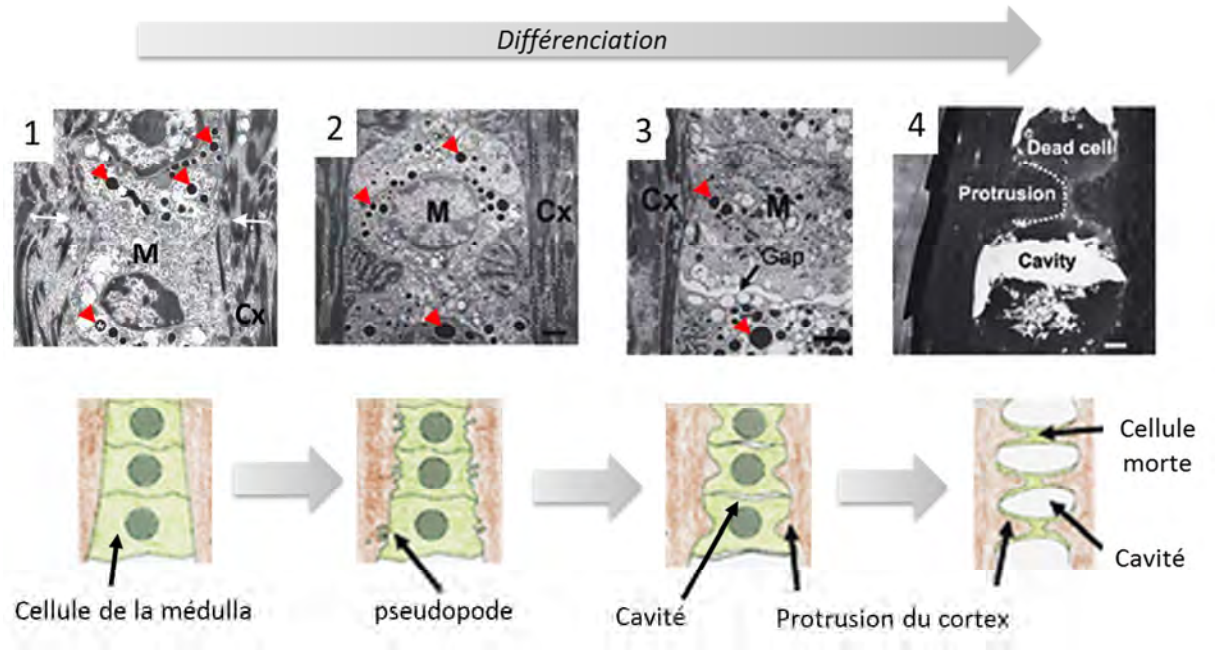


Figure 37 : Différenciation de la médulla. (A) Observation en microscopie électronique à transmission de la médulla à différents stades de différenciation. Des granules de TCHH (têtes de flèche rouges) apparaissent tout d'abord dans le cytoplasme des cellules. Des pseudopodes se forment ensuite au niveau des membranes latérales des cellules. À cause de la pression latérale, des protrusions de cellules corticales s'invaginent dans les cellules corticales au niveau des pseudopodes et des cavités se forment entre les cellules. En parallèle, les cellules corticales meurent et se rétractent, ce qui élargit encore d'avantage les cavités. M : médulla, Cx : cortex. Adapté de (Langbein *et al.*, 2010 ; Morioka, 2009).

D. La trichohyaline

Comme nous venons de le voir, la TCHH est impliquée dans les processus de différenciation de la médulla ainsi que des cellules de Huxley, Henlé et cuticulaires de la gaine épithéliale interne. Cette protéine est d'autre part le premier substrat des PADs à avoir été identifié par Rogers et Taylor en 1977 (Rogers et Taylor, 1977).

1. Structure de la trichohyaline

Comme la FLG, la TCHH appartient à la famille des SFTPs (voir paragraphe II.A). C'est une protéine de haut poids moléculaire (220 kDa) qui est constituée, comme toutes les SFTPs, d'un domaine amino-terminal de type S100 (domaine 1), d'un grand domaine central répétitif et d'un domaine carboxy-terminal (domaine 9). Sa partie centrale a la particularité d'être très riche en acides glutamiques (28,6%), arginines (23,9%) et glutamines (19,3%) (Tableau II). Elle est constituée de quatre sous-domaines répétitifs (domaines 3, 4, 6 et 8) présentant une structure principalement en hélices alpha, séparés par des domaines « linkers » ou « espaceurs » (domaines 2, 5 et 7). Le domaine 6 est constitué de 8 répétitions d'une séquence très conservée de 30 acides aminés, et le domaine 8 de 23 répétitions contenant au plus 26 acides aminés (Figure 38 ; Lee *et al.*, 1993). En outre, sa grande richesse en arginines (voir annexe 1) fait de la TCHH un substrat privilégié des PADs, qui je le rappelle catalysent la conversion des résidus arginine en résidus citrulline appelée désimination (voir paragraphes IV.B et IV.F.2.a). La TCHH présente aussi la particularité de porter 332 résidus glutamine et 104 résidus lysine, pouvant potentiellement être impliqués dans la formation de liaisons ε-(γ-glutamyl)-lysine catalysée par les TGases. De telles liaisons ont été retrouvées sur toute la longueur de la TCHH, hormis dans les domaines amino- et carboxy-terminaux (domaines 1 et 9). Il a été montré que les domaines 6 et 8 de la TCHH sont principalement impliqués dans l'interaction avec les kératines. De plus, les molécules de TCHH sont liées entre elles et à d'autres protéines composant l'enveloppe cornée majoritairement via les résidus glutamine et lysine des domaines 2 à 5 ; la plupart des liaisons intra-TCHH ayant été retrouvées au niveau du domaine 5

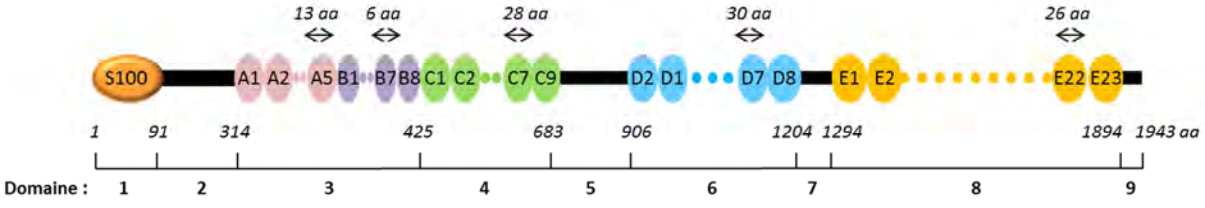


Figure 38 : Structure de la trichohyaline. Schéma réalisé d'après (Lee *et al.*, 1993) et les informations trouvées dans les bases de données NCBI et UniprotKB (NP_009044.2, Q07283).

(Steinert *et al.*, 2003). Cependant, il a été récemment démontré, grâce à l'expression *in cellulo* de formes recombinantes de TCHH entière et tronquées, que le domaine carboxy-terminal de la TCHH est nécessaire pour induire la formation du réseau de filaments intermédiaires de kératines (Takase et Hirai, 2012).

2. Expression et métabolisme de la trichohyaline dans le follicule pileux

La TCHH est exprimée dans les trois types cellulaires de la gaine épithéliale interne ainsi qu'au niveau de la médulla (Figure 39A). Elle est également détectée dans l'épithélium de l'estomac des rongeurs, les papilles filiformes de la langue, le lit de l'ongle et l'épithélium cornifié du palais dur. Elle est de plus parfois détectée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme du prépuce des nouveau-nés, où se formeraient des granules hybrides de TCHH et FLG (Hamilton *et al.*, 1991 ; Manabe et O'Guin, 1994).

Lors de la différenciation des couches de la gaine épithéliale interne, la TCHH néo-synthétisée s'accumule dans des granules amorphes. La TCHH présente à la périphérie des granules est ensuite désiminée par les PADs, ce qui induit une augmentation de sa solubilité (voir paragraphe IV.F.2.a). Ceci permet une meilleure accessibilité de la TCHH aux TGases qui vont alors catalyser la formation de liaisons isopeptidiques intra- et intermoléculaires. La TCHH est ainsi liée à ses partenaires protéiques dont les principaux sont les kératines, et participe ainsi à l'organisation des filaments intermédiaires de kératines en macrofibrilles au sein de la gaine épithéliale interne (Figures 39B et C). Elle est aussi liée à un certain nombre de protéines de l'enveloppe cornée, comme l'involucrine, et servirait ainsi de lien entre les macrofibrilles de kératines et l'enveloppe cornée, renforçant encore la rigidité des cellules de la gaine épithéliale interne (Steinert *et al.*, 2003).

Dans la médulla, la TCHH présente un métabolisme similaire à la différence que, les filaments de kératines y étant peu abondants, la TCHH désiminée est principalement liée à elle-même par les TGases et forme des agrégats amorphes participant à la rétractation des cellules de la médulla et donc à la formation de cavités (Figure 39C ; Tarcsa et al., 1997).

In vitro, il a été montré que le domaine 8 de la TCHH est plus rapidement lié par les TGases lorsqu'il est désiminé, la TGase 3 étant le plus efficace des isotypes. Il a donc été proposé que la TGase 3 soit responsable de la formation des liaisons isopeptidiques entre la TCHH et ses partenaires au sein du follicule pileux, bien que d'autres TGases y soient aussi exprimées (Tarcsa *et al.*, 1997).

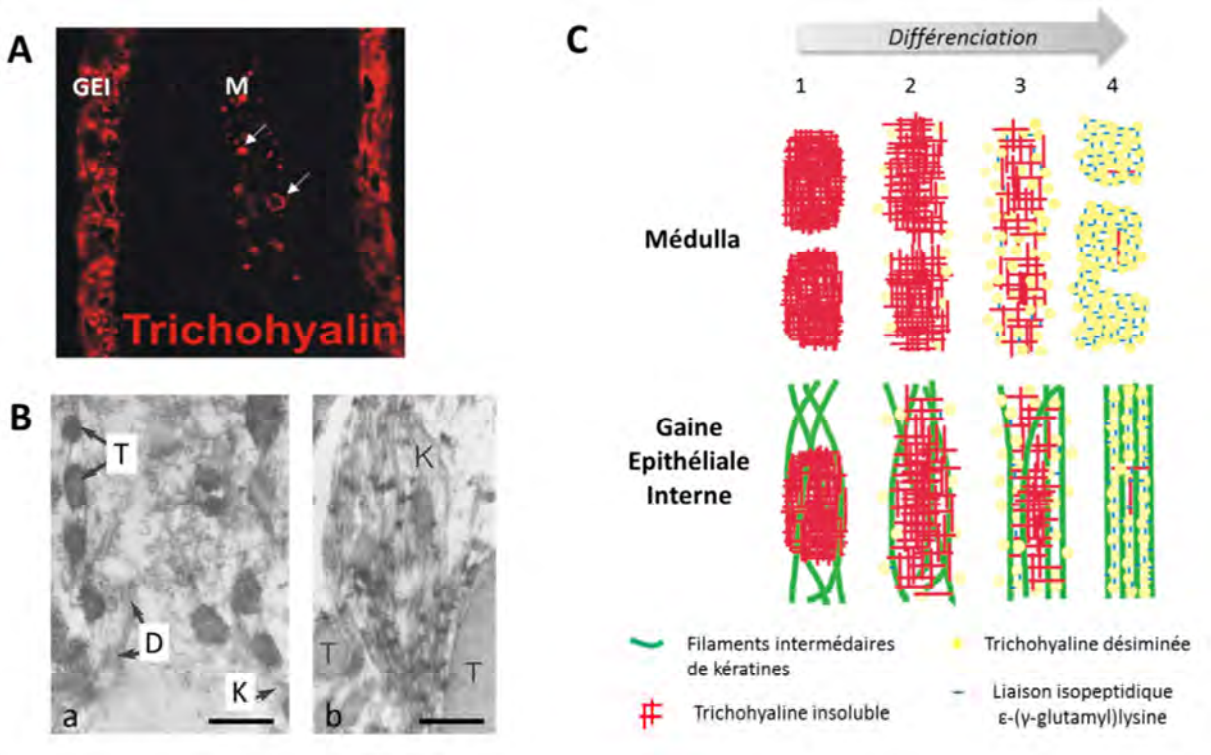


Figure 39 : Localisation de la trichohyaline dans le follicule pileux et modèle de la maturation de la trichohyaline dans la gaine épithéliale interne et dans la médulla. (A) Immunodétection de la TCHH avec l'anticorps AE16 sur une coupe de follicule pileux humain. L'anticorps AE16 reconnaît la TCHH désiminée à la périphérie des granules. GEI : gaine épithéliale interne, M : médulla. D'après (Chavanas *et al.*, 2006). (B) Immunomarquage de la TCHH en microscopie électronique à transmission avec l'anticorps AE15 (a) et AE17 (b). L'anticorps AE15 marque la totalité des granules de TCHH et reconnaîtrait donc principalement les formes non désiminées de la TCHH. L'anticorps AE17 marque uniquement la TCHH associée aux filaments intermédiaires de kératines. D'après (O'Guin *et al.*, 1992). (C) Modèle du métabolisme de la TCHH dans la médulla et dans la gaine épithéliale interne. La TCHH est d'abord stockée au sein de granules. Elle est ensuite désiminée par les PADs, ce qui la rend soluble et accessible aux TGases. Dans la médulla, elle est essentiellement liée à elle-même et forme des agrégats amorphes alors que dans la gaine interne, elle est liée aux filaments de kératines et permet leur association parallèle aboutissant à la formation de macrofibrilles. D'après (Tarcsa *et al.*, 1997).

3. Implications physiopathologiques de la trichohyaline

a. Trichohyaline et forme du cheveu

La TCHH semble jouer un rôle dans la morphologie du cheveu. En effet, une étude d'association pangénomique, portant sur la forme du cheveu (cheveux raides, ondulés ou bouclés) et réalisée à l'aide de trois cohortes australiennes, a montré qu'il existe une association entre la présence d'un polymorphisme du gène de la TCHH (rs11803731 : *TCHH* c.2368T>A ; TCHH p.Leu790Met) et la forme raide. Ces résultats ont depuis été confirmés par une seconde étude réalisée avec deux cohortes européennes. Ce polymorphisme expliquerait ainsi 6 % de la variation de la morphologie capillaire dans les populations étudiées (Medland *et al.*, 2009 ; Pośpiech *et al.*, 2015).

Dans ce variant de la TCHH, un résidu leucine situé dans le domaine 5 de la protéine est substitué par un résidu méthionine. Le domaine 5 est peu structuré et n'est pas organisé en hélice-α. L'impact de cette substitution sur la structure ou la régulation de la TCHH reste inconnu.

Cette découverte est en accord avec l'hypothèse, depuis longtemps proposée par les spécialistes de la biologie du cheveu, selon laquelle la structure de la gaine épithéliale interne joue un rôle prépondérant pour la détermination de la forme de la tige pilaire (Westgate *et al.*, 2013).

b. Trichohyaline et alopecia areata

La TCHH est une des cibles des autoanticorps retrouvés dans l'*alopecia areata* (OMIM #104000 ; Leung *et al.*, 2010). Cette pathologie touche environ 2% de la population mondiale. Elle se caractérise par la perte des cheveux par plaques et peut aller jusqu'à engendrer une absence totale de poils sur toute la surface du corps. Elle s'accompagne parfois d'anomalies au niveau des ongles. Le rôle de ces autoanticorps dans la physiopathologie de la maladie reste encore à explorer.

IV. LES PEPTIDYL-ARGININE DESIMINASES

Comme nous l'avons brièvement aperçu dans les chapitres précédents, les PADs interviennent dans le métabolisme de la FLG ainsi que dans celui de la TCHH. Ces enzymes étant l'un des principaux objets de ma thèse, ce dernier chapitre leur est consacré. Comme vous allez le voir, les PADs sont présentes dans bien d'autres tissus que l'épiderme et le follicule pileux et sont impliquées dans de multiples processus physiologiques et dans diverses pathologies. Ces dernières années, un intérêt croissant pour ces enzymes s'est ainsi développé, comme l'illustre l'importante augmentation du nombre de publications scientifiques à leur sujet (Figure 40).

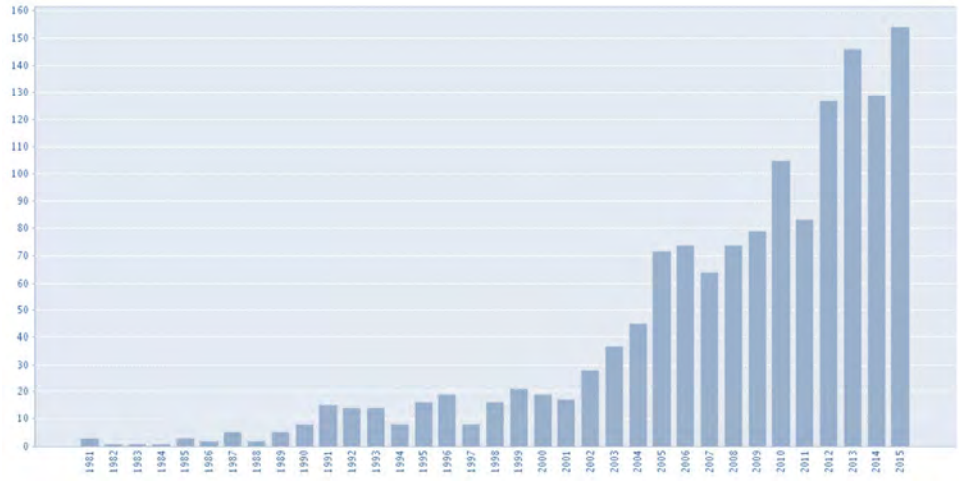


Figure 40 : Nombre de publications concernant les peptidyl-arginine désiminases et la désimination. Citation Report, Web of Science. Mots clés : « deimination » ou « citrullination » ou « peptidylarginine deiminase » ou « protein arginine deiminase ».

Dans ce dernier chapitre, les caractéristiques biochimiques et structurales des PADs seront décrites et une brève revue, non exhaustive, de leurs diverses implications physiologiques et pathologiques sera présentée.

A. De la citrulline libre à la découverte des peptidyl-arginine désiminases

La citrulline est un acide aminé organique non essentiel qui a été isolé pour la première fois sous forme libre (L-citrulline) à partir de jus de pastèque (*Citrullus Vulgaris*) en 1914 par Koga et Ohtake, puis identifié par Wada en 1930 (Fragkos et Forbes, 2011). Dès 1939, la présence de citrulline au sein de la séquence peptidique de protéines, telles que le caséinogène ou l'albumine, a été mise en évidence à l'aide d'un test colorimétrique spécifique permettant sa détection (Fearon, 1939). Comme aucun codon spécifique pour cet acide aminé n'a été découvert, il a été proposé que sa présence au sein d'une séquence peptidique soit due à une modification post-traductionnelle. En 1958, Rogers et Simmonds ont mis en évidence la présence d'une protéine hautement citrullinée (ou désiminée)

dans la laine de mouton (Rogers et Simmonds, 1958). C'est seulement en 1977, près de 20 ans plus tard, que Rogers et Taylor ont décrit, pour la première fois, une activité enzymatique, au sein du follicule pileux de cochon d'Inde, capable de convertir les arginines en citrullines, et ceci de manière calcium-dépendante (Rogers et Taylor, 1977). La cible de cette activité enzymatique a ensuite rapidement été identifiée comme étant la TCHH (Rogers *et al.*, 1977). En 1981, une enzyme catalysant cette conversion a été purifiée à partir d'épiderme de rat et caractérisée pour la première fois. Elle a été nommée « peptidyl-arginine désiminase » ou PAD (E.C.3.5.3.15) car elle est capable de désiminer les arginines présentes au sein d'une séquence peptidique alors que son action sur l'arginine libre est négligeable (Fujisaki et Sugawara, 1981). Depuis, il a été démontré qu'il existe en fait 5 isotypes de PADs chez l'homme.

Notons que la citrulline libre est majoritairement produite par les synthases d'oxyde nitrique (NO-synthases) lors de la synthèse d'oxyde nitrique à partir d'arginine. La citrulline libre peut aussi être produite à partir d'ornithine lors du cycle de l'urée par l'action de l'ornithine carbamyltransférase (Curis *et al.*, 2005). Ces deux familles d'enzymes sont distinctes des PADs, elles ne sont pas calcium-dépendantes, elles ne présentent pas d'homologie de séquence et ne permettent pas de produire de la citrulline au sein d'une chaîne polypeptidique comme peuvent le faire les PADs lors de la réaction de désimination, décrite ci-dessous.

B. La réaction de désimination catalysée par les PADs et ses conséquences

La désimination (aussi appelée citrullination) est une modification post-traductionnelle calcium-dépendante catalysée par les PADs au cours de laquelle un résidu arginine, présent au sein d'une séquence peptidique, est transformé en résidu citrulline (Figure 41A). Cette modification engendre la perte d'une charge positive (la citrulline étant neutre alors que l'arginine est chargée positivement), ainsi qu'une augmentation de masse d'environ 1 Da et la libération d'ammonium. La désimination modifie l'acidité de la chaîne latérale du résidu ainsi que son point isoélectrique : de 11,41 pour l'arginine à 5,91 pour la citrulline (Orgován et Noszál, 2011). En conséquence, la désimination peut provoquer des modifications de la conformation de la protéine cible, de son interaction ou de son affinité avec d'autres molécules partenaires et donc de sa fonction (Figure 41B).

Par exemple, il a été montré par dichroïsme circulaire et spectroscopie de fluorescence que la désimination de formes recombinantes d'un monomère de la FLG et du domaine 8 de la TCHH engendre une diminution de leur organisation structurelle (Tarcsa *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été observé que la FLG est plus rapidement protéolysée par la calpaïne 1 lorsqu'elle est désiminée (Kamata *et al.*, 2009, Hsu *et al.*, 2011). Il est possible que le dépliement de la FLG, engendré par sa désimination, puisse rendre les sites de coupure cibles de la calpaïne 1 plus accessibles. De même, la

désimination de la protéine basique de la myéline (MBP pour « myelin basic protein » en anglais) induit d'importants changements de sa conformation résultant en un dépliement partiel de la protéine. Ceci augmente sa susceptibilité à la protéolyse, notamment par la cathepsine D, et diminue ses interactions avec les lipides de la gaine (Pritzker *et al.*, 2000).

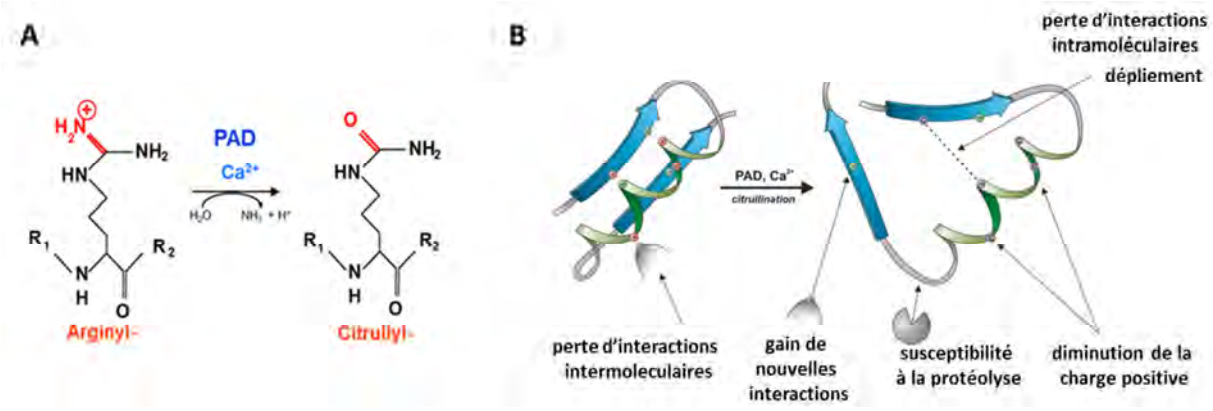


Figure 41 : La désimination et ses conséquences sur les protéines cibles. (A) La réaction de désimination correspond à la transformation des groupements arginyl- en groupement citrullyl- au sein d'une séquence peptidique. Elle est catalysée par les PADs, une famille d'enzymes calcium-dépendantes. (B) La désimination engendre la perte d'une charge positive, ce qui peut engendrer des changements de conformation, d'interactions et donc de fonction de la protéine cible. D'après (Vossenaar *et al.*, 2003).

C. Caractéristiques géniques, biochimiques et structurales des PADs

1. Les gènes *PADI* codant les PADs

Chez l'homme, on trouve 5 isotypes de PADs : les PADs 1, 2, 3, 4 et 6. Pour l'anecdote, la PAD4 a d'abord été désignée PAD5. En effet, lorsque cette PAD a été identifiée chez l'Homme, une Pad4 avait déjà été caractérisée chez le rat. La nouvelle PAD humaine présentant une spécificité de substrats différente de Pad4, il a été pensé à l'époque qu'elle n'était pas l'orthologue de Pad4 de rat mais correspondait à un autre isotype, alors appelé PAD5. Suite aux analyses de séquence du génome, il s'est finalement avéré que la Pad4 de rat et la PAD5 humaine étaient orthologues, la PAD5 a donc été renommée PAD4. Une dernière PAD a ensuite été identifiée chez l'homme et elle a alors été nommée PAD6 pour que cela ne porte pas à confusion.

Les 5 isotypes de PADs sont codés par 5 gènes dénommés *PADI*. Ces gènes sont localisés au sein d'un même locus situé sur le chromosome 1 en position p35-36 et s'étendent sur 355 kb (Figure 42 ; Chavanas *et al.*, 2004). Les 5 gènes *PADI* possèdent une longueur variable mais sont tous composés de 16 exons. Les séquences codantes des gènes *PADI* sont conservées puisque les protéines correspondantes présentent entre 59 à 71% d'homologie entre elles, la PAD6 étant l'isotype le moins conservé (Chavanas *et al.*, 2006 ; Tableau 4 ; voir annexe 2). Un alignement multiple des séquences peptidiques des 5 PADs humaines a en outre mis en évidence la présence de multiples insertions dans la séquence de la PAD6, faisant de celle-ci le plus grand des isotypes (Méchin *et al.*, 2007).

Chez la souris et le rat, 5 gènes *Padi* sont aussi retrouvés, regroupés sur des régions d'environ 240 kb respectivement en position 4E1 et 5q36 (Vossenaar *et al.*, 2003). Les protéines Pads de souris présentent une forte homologie entre elles et avec leurs orthologues humains, de 82 à 96% d'homologies, montrant une grande conservation de ces gènes entre les deux espèces (Foulquier, 2007 ; Tableau 4). Les données génomiques disponibles ont permis de démontrer l'existence de ces 5 gènes *Padi* chez tous les mammifères alors qu'on en retrouve 3 chez les oiseaux (*Gallus gallus*) et seulement 1 chez les amphibiens (*Xenopus laevis*) et les poissons (*Danio rerio, Takifugu rubripes* et *Tetraodon nigroviridis*). La construction d'un arbre phylogénétique, basé sur la comparaison des séquences des gènes *PADI* entre ces différentes espèces, a révélé que le gène *PADI2* est le premier à avoir divergé d'un ancêtre commun et a probablement conservé sa fonction biologique ancestrale. Lors de l'évolution des espèces, les autres gènes *PADI* auraient acquis des spécificités d'expression tissulaire ainsi que de nouvelles fonctions biologiques (Balandraud *et al.*, 2005, Chavanas *et al.*, 2004).

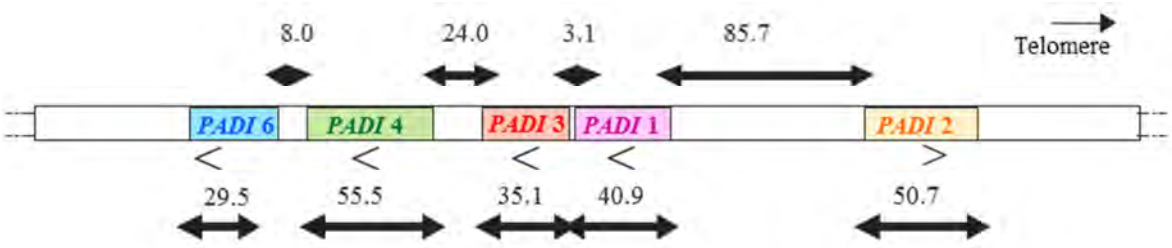


Figure 42 : Organisation génomique du locus *PADI* chez l'Homme (1p35-36). La taille des gènes (en-dessous) et des régions intergéniques (au-dessus) est indiquée en kb. Les flèches ouvertes représentent la direction de transcription de chaque gène. D'après (Chavanas *et al.*, 2004 ; Méchin *et al.*, 2007).

Tableau 4 : Pourcentage d'homologie entre les séquences protéiques des paralogues humains des PADs et des orthologues humains et de souris

(%)	*Paralogues humains*					*Orthologues de souris* (Pads)
	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4	PAD6	
PAD1	100	65	68	71	59	85
PAD2		100	67	65	59	96
PAD3			100	68	60	93
PAD4				100	61	85
PAD6					100	82

D'après (Méchin *et al.*, 2007 ; Foulquier, 2007).

2. Structure des PADs

La structure cristallographique de la PAD4 humaine puis plus récemment celles des PADs 2 et 1 ont été résolues par analyses de diffraction aux rayons X (Arita *et al.*, 2004 ; Slade *et al.*, 2015 ; Saijo *et al.*, 2016). Ces données cristallographiques ont permis de mettre en évidence le repliement des PADs en deux domaines : un domaine amino-terminal composé de deux sous-domaines « immunoglobulin-like » et un domaine carboxy-terminal comprenant le site actif. Le domaine

carboxy-terminal, qui est la partie la plus conservée entre les différents isotypes, est composé de 5 modules ββαβ et les premiers feuillets β de chaque module forment un sillon qui renferme le site catalytique (Figure 43A).

L'analyse de la structure cristallographique du complexe PAD4 - BAA (ou N-α-benzoyl-L-arginine amide ; un substrat synthétique des PADs) a permis de mettre en évidence l'implication d'au moins neufs acides aminés de la PAD4 dans la formation du site actif et l'interaction avec le substrat (Arita *et al.*, 2004 ; Figure 43E). En particulier, les quatre résidus Cys-645, His-471, Asp-350 et Asp-473 de la PAD4 sont essentiels à l'activité catalytique puisque la substitution de l'un ou l'autre de ces acides aminés par une alanine (D350A, H471A, D473A et C645A) engendre une perte d'activité de l'enzyme (Arita *et al.*, 2004 ; Knuckley *et al.*, 2007). Alors que les résidus Cys-645 et His-471 sont directement impliqués dans le mécanisme catalytique, les résidus Asp-350 et Asp-473 interagissent avec les atomes d'azote de la chaîne latérale de l'arginine cible via des liaisons hydrogènes, permettant de maintenir le substrat dans la poche du site actif (voir paragraphe IV.3.a). Les autres acides aminés, également impliqués dans l'interaction avec le substrat, sont les résidus Trp-347 et Val-469, qui interagissent avec la portion aliphatique de la chaîne latérale de l'arginine via des liaisons hydrophobes, et les résidus Arg-372, Arg-374 et Arg-639 qui interagissent avec les atomes d'oxygène et d'azote des liaisons peptidiques du substrat via des liaisons hydrogènes (l'une d'entre elles étant médiée par une molécule d'eau ; Figure 43E). Selon un alignement multiple des séquences primaires des 5 PADs humaines, la plupart de ces acides aminés sont conservés entre les différents isotypes, en particulier les quatre acides aminés essentiels à l'activité catalytique (Tableau 5). A l'inverse, il est intéressant de noter que les résidus Arg-374 et Arg-639 de la PAD4 sont peu conservés, ce qui pourrait en partie expliquer la différence de spécificité de substrat entre les isotypes de PADs (voir paragraphe IV.3.b).

Tableau 5 : Alignement de 9 acides aminés impliqués dans le site catalytique de la PAD4 avec les autres séquences paralogues

PAD1	Trp-349	Asp-352	Arg-374	Arg-376	Val-470	His-472	Asp-474	Leu-639	Cys-645
PAD2	Trp-348	Asp-351	Arg-373	Gly-375	Val-469	His-471	Asp-473	Phe-641	Cys-647
PAD3	Trp-347	Asp-350	Arg-372	Gly-374	Val-468	His-470	Asp-472	Leu-640	Cys646
PAD4	**Trp-347**	**Asp-350**	**Arg-372**	**Arg-374**	**Val-469**	**His-471**	**Asp-473**	**Arg-639**	**Cys-645**
PAD6	Trp-356	Asp-359	Gln-371	Ala-373	Thr-478	His-480	Asp-482	Glu-670	Ala-676*

Sur la base d'un alignement multiple réalisé avec le logiciel Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin) et les séquences de référence (numéros d'accession suivants : NP_037490.2, NP_031391.2, NP_057317.2, NP_036519.2, AAR38850.1 pour les PAD1, 2, 3, 4 et 6 respectivement (voir annexe 2)), sont indiqués en rouge les quatre acides aminés essentiels à l'activité catalytique, en bleu les autres acides aminés importants pour la fixation du substrat par la PAD4 (en gras). *Dans la séquence de la PAD6, deux cystéines encadrent le résidu Ala-676 (Cys675 et Cys677). D'après (Arita *et al.*, 2004 ; Méchin *et al.*, 2007 ; Slade *et al.*, 2015 ; Saijo *et al.*, 2016).

Les PADs, qui sont calcium-dépendantes, présentent des sites de fixation au calcium. La PAD4 possède 5 sites de liaison : Ca1 à Ca5. Ca1 et Ca2 sont présents dans la région carboxy-terminale, à proximité du site actif, alors que Ca3, 4 et 5 sont localisés dans une même région du domaine amino-terminal, à distance du site actif. Alors que la PAD2 présente un site de fixation du calcium supplémentaire (Ca6), situé dans le domaine amino-terminal, la PAD1 ne présente que 4 sites fixant le calcium (le site Ca5 décrit pour la PAD4 n'étant pas retrouvé pour cet isotype). La fixation des ions calcium au niveau de ces sites induit un changement de conformation important des PADs. La poche comprenant le site actif se resserre, ce qui est important pour la sélectivité des substrats. Un réagencement des acides aminés du site actif a lieu, nécessaire à l'activation enzymatique (Figures 43D et 49 ; Liu *et al.*, 2013).

Au sein des cristaux, la PAD4 et la PAD2 forment des homodimères qui s'associent de manière antiparallèle : le domaine amino-terminal d'une molécule interagit avec le domaine carboxy-terminal de la seconde (Figure 43B). Cette dimérisation semble jouer un rôle important dans la régulation de l'activité enzymatique de ces PADs. En effet, des formes mutées de PAD4 incapables de s'associer en dimère présentent une activité enzymatique réduite en comparaison à la forme sauvage (Liu *et al.*, 2011). Cependant, à l'heure actuelle, on ne sait pas sous quelle(s) forme(s) existe(nt) ces deux isotypes *in vivo*. Le cristal de la PAD1, quant à lui, ne présente pas cette organisation dimérique. Une analyse de diffusion des rayons X aux petits angles montre de plus que la PAD1 existe sous forme monomérique en solution (Saijo *et al.*, 2016). Même si la PAD1 présente une structure dans l'ensemble très proche de celles des PADs 4 et 2, son extrémité amino-terminale, moins repliée et précédée d'une boucle plus allongée que les autres isotypes, pourrait prévenir la formation de dimère (Figure 43C). De plus, l'arginine en position 8, décrite comme jouant un rôle clé dans la stabilité du dimère de PAD4, n'est pas conservée dans la séquence de la PAD1 (le résidu 8 est une glutamine), ce qui suggère encore que la PAD1 n'existe que sous forme monomérique (Liu *et al.*, 2011). Bien que la structure cristallographique de la PAD3 n'ait pas été résolue, plusieurs données laissent penser que cet isotype existe sous forme dimérique. En effet, les principaux résidus impliqués dans la formation et la stabilité du dimère de PAD4 sont conservés ou substitués par des acides aminés homologues dans la séquence de la PAD3 (par exemple : en position 435, la tyrosine est remplacée par une leucine, ces deux résidus étant hydrophobes ; Liu *et al.*, 2011). En outre, une analyse de diffusion des rayons X aux petits angles de la PAD3 en solution révèle aussi une association en dimère de cet isotype (Saijo *et al.*, 2016).

Enfin, la PAD4 est le seul isotype à présenter un signal de nucléarisation, dont la fonctionnalité a été démontrée dans des cellules HL-60 en culture (Nakashima *et al.*, 2002).

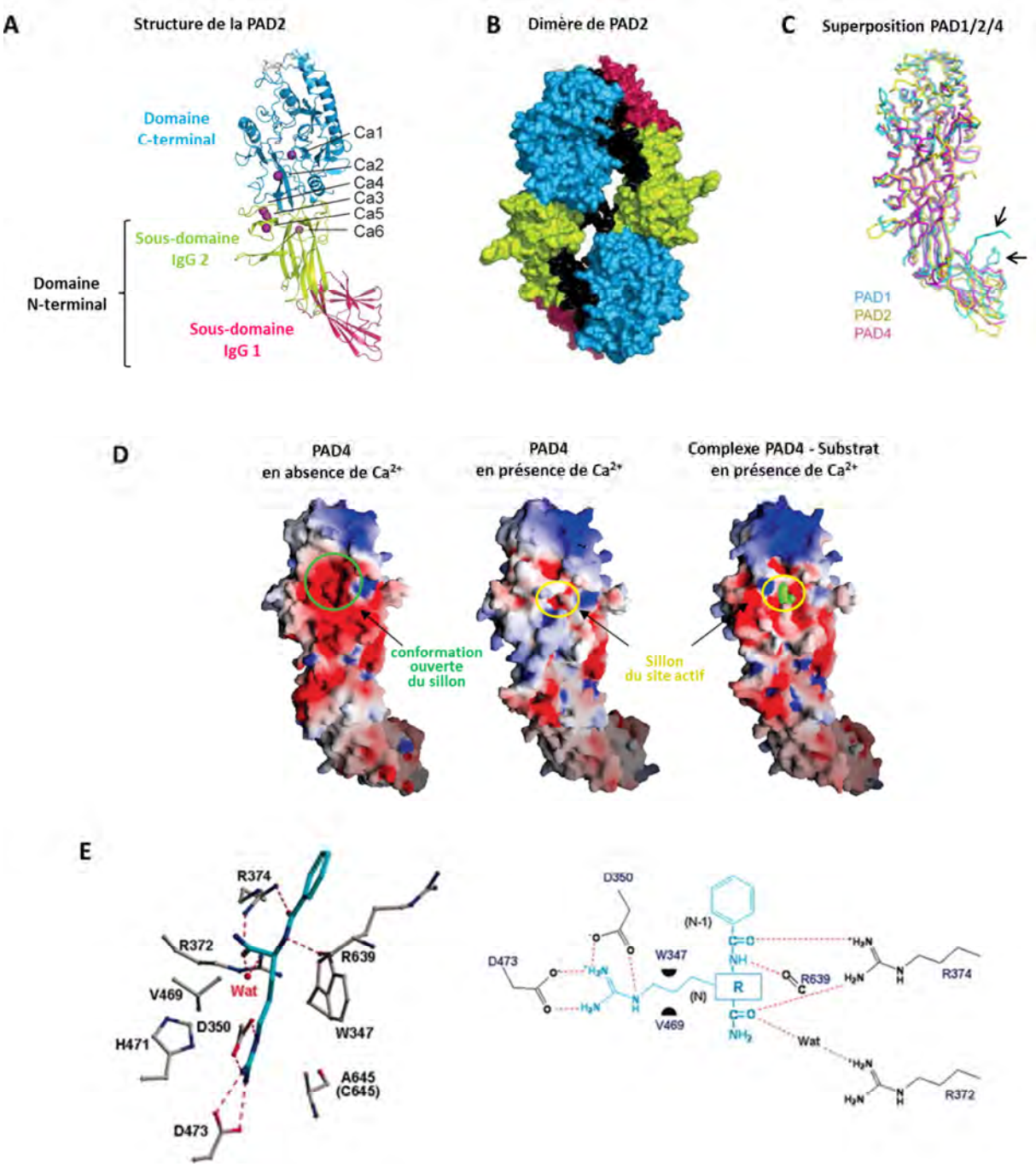


Figure 43 : Structures cristallographiques des PADs. (A) Structure cristallographique de la PAD2 sur laquelle sont positionnés les 6 sites de liaisons du calcium (Ca1-6). Comme toutes les PADs, la PAD2 est constituée d'un domaine carboxy-terminal et d'un domaine amino-terminal composé de deux sous-domaines « immunoglobin-like » (IgG1 et IgG2). D'après (Slade *et al.*, 2015). (B) Homodimère formé par l'association tête-bêche de deux PAD2. D'après (Slade *et al.*, 2015). (C) Superposition de la structure cristallographique des PADs 1, 2 et 4. Ces trois PADs présentent une structure très semblable. Cependant, la PAD1 présente une extrémité amino-terminale plus détendue, qui est précédée par une boucle plus allongée par rapport aux deux autres isotypes (structures indiquées par les flèches). D'après (Saijo *et al.*, 2016). (D) Conformation de la PAD4 en absence de calcium, en présence de calcium, et en présence de calcium et d'un substrat synthétique, le N-α-benzoyl-L-arginine amide (BAA). La fixation du calcium engendre un changement important de la conformation de la PAD avec en particulier la formation de l'étroit sillon refermant le site actif. D'après (Arita *et al.*, 2004). (E) Focus sur les acides aminés de la PAD4 impliqués dans la liaison au substrat de la structure cristallographique du complexe PAD4 inactivée (A645) – BAA. D'après (Arita *et al.*, 2006).

3. Mécanisme catalytique et spécificité d'action des PADs

a. Mécanisme catalytique des PADs

La résolution de la structure cristallographique de la PAD4 complexée à un substrat synthétique, le BAA, a permis à Arita *et al.* de proposer un mécanisme catalytique des PADs (Figure 44 ; Arita *et al.*, 2004). Dans ce modèle, la réaction de désimination commence par une attaque nucléophile du groupement thiolate de la Cys-645 sur le carbone Cζ de la chaîne latérale du résidu arginine (ou peptidyl-arginine). Ceci aboutit à la formation d'un intermédiaire tétraédrique, qui est stabilisé de manière transitoire par la donation d'un proton par l'His-471. La liaison chimique entre le carbone Cζ et l'azote Nη2 de l'arginine est ensuite clivée, générant la libération d'une molécule d'ammoniac. Une seconde attaque nucléophile a lieu, faisant intervenir cette fois-ci une molécule d'eau, préalablement activée par l'His-471 (qui agit comme une base en déprotonant la molécule d'eau). Il en résulte la formation d'un second intermédaire tétrahédrique et finalement du résidu citrulline (peptidyl-citrulline), le produit majeur de la réaction. Les résidus Asp-350 et Asp-473 sont pour leur part absolument nécessaires au bon positionnement de la peptidyl-arginine au sein du site catalytique.

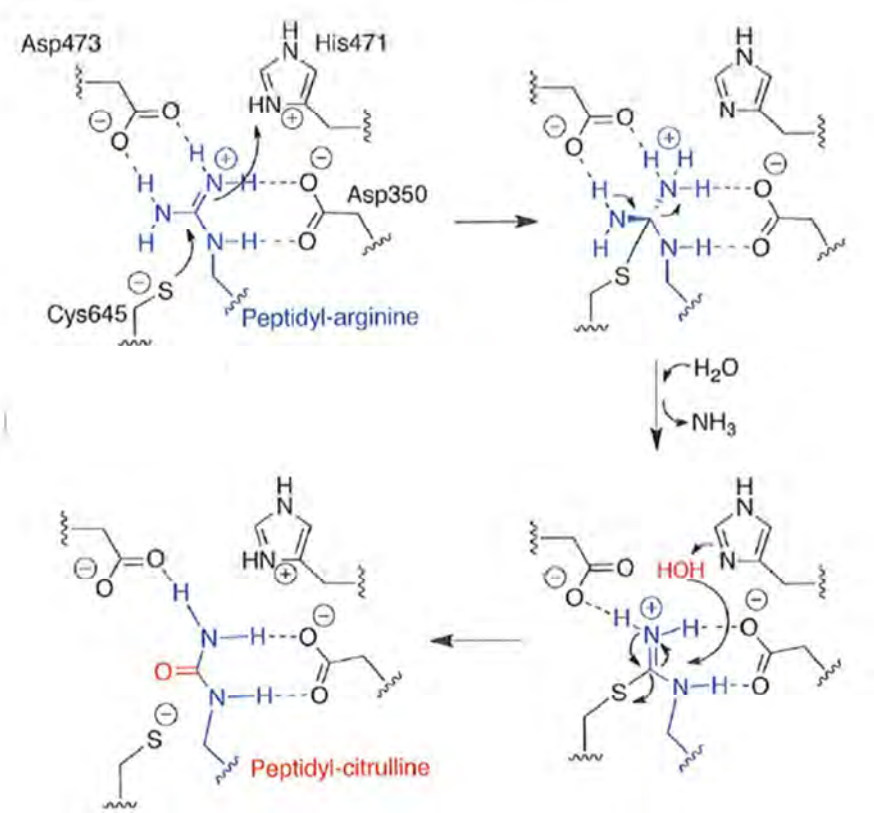


Figure 44 : Mécanisme catalytique proposé pour la réaction de désimination, en utilisant la PAD4 comme modèle. D'après (Arita *et al.*, 2004 ; Subramanian *et al.*, 2004).

Les sites actifs des PADs 1, 2 et 3 contiennent aussi ces quatres acides aminés essentiels à la réaction catalytique (voir tableau 5). Leur mécanisme d'action est donc très probablement identique.

Concernant la PAD6, malgré sa forte homologie de séquence avec les autres PADs, cet isotype ne semble pas posséder d'activité enzymatique (Raijmakers *et al.*, 2007). Elle contient trois des quatre acides aminés essentiels du site actif (Asp351, His472, Asp474) mais le résidu cystéine est manquant. En effet, lorsque les séquences des PADs 4 et 6 sont alignées, la Cys-645 de la PAD4 s'aligne avec l'Ala-676 de la PAD6. Cependant, l'Ala-676 est encadrée par deux cystéines, Cys675 et Cys677 (Méchin *et al.*, 2007), l'une des deux pouvant potentiellement intervenir dans la réaction mais cela n'a jamais été mis en évidence.

b. Spécificité d'action des PADs

Chaque isotype de PADs possède sa propre spécificité de substrats. Celle-ci dépend notamment de la nature des acides aminés adjacents à l'arginine cible, qui va influencer l'interaction avec l'enzyme. Cela a été démontré par diverses études menées *in vitro* utilisant aussi bien des substrats synthétiques, des substrats naturels sous formes recombinantes ou des peptides synthétiques (pour revue : Méchin *et al.*, 2007 ; Kizawa *et al.*, 2008, Knuckley *et al.*, 2010, Darrah *et al.*, 2012, Assohou-Luty *et al.*, 2014, Saijo *et al.*, 2016), ainsi que par l'analyse de la structure cristallographique de la PAD4 complexée à divers peptides (Arita *et al.*, 2006).

Une de ces études *in vitro* a notamment été ménée dans mon laboratoire en utilisant des formes recombinantes actives des PADs 1, 2 et 3 humaines et des substrats synthétiques dérivés de l'arginine, tel que le BAEE (N-α-benzoyl L-arginine ethyl ester ou Bz-L-Arg-O-Et), souvent utilisé comme substrat de référence des PADs (Méchin *et al.*, 2005). Ces substrats sont des composés de la chaîne latérale de l'arginine entourée de différents groupements chimiques, mimant ainsi l'encombrement plus ou moins important que peuvent engendrer les résidus adjacents au sein d'une séquence peptidique. Par exemple, alors que la PAD1 est l'isotype qui semble présenter la spécificité la plus large, elle agit difficilement sur le Tos-L-Arg-O-Me, sur lequel la PAD2 agit plus efficacement (Figure 45).

La résolution de la structure cristallographique de la PAD4 complexée à des peptides correspondant à la région de la partie N-terminale des histones H3 et H4 (cibles de la PAD4, voir paragraphe IV.G.1.c) a permis de mettre en évidence qu'en plus des acides aminés décrits dans le Tableau 5 qui interviennent dans l'interaction avec la chaîne latérale de l'arginine et les deux liaisons peptidiques adjacentes, d'autres acides aminés de la PAD4 jouent un rôle dans l'interaction avec les substrats via des liaisons formées avec les atomes d'oxygène des liaisons peptidiques situées jusqu'en position N-2 et N+2 de l'arginine cible (Arita *et al.*, 2006).

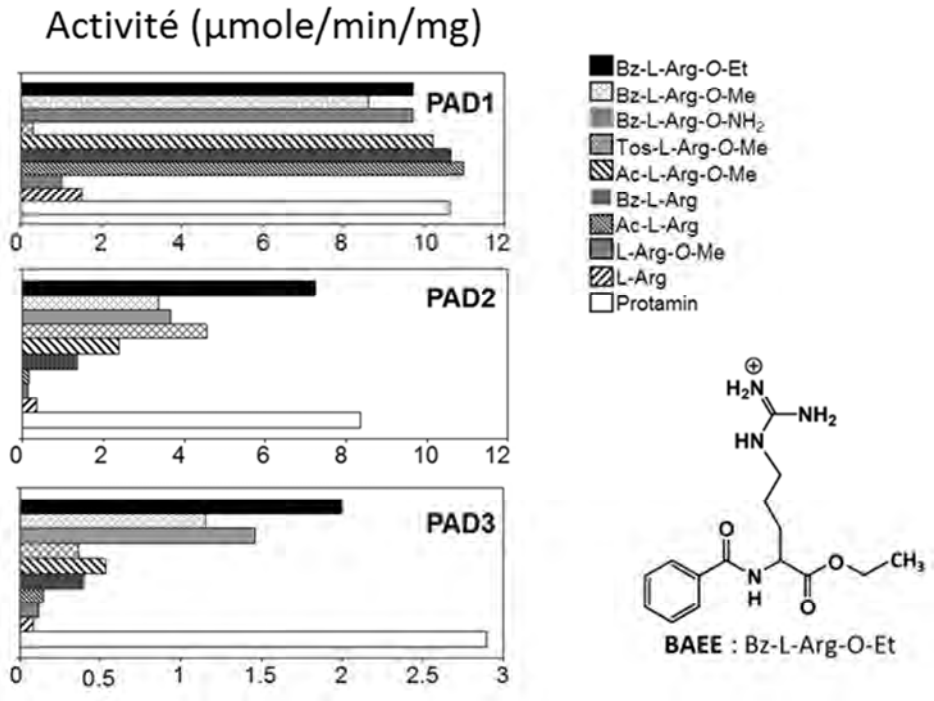


Figure 45 : Spécificité de substrats des PADs 1, 2 et 3. Les PADs humaines recombinantes ont été incubées dans les mêmes conditions en présence de 10 mM de $CaCl_2$ et de 10 mM de divers dérivés de L-Arg, dont le Bz-L-Arg-O-Et (BAEE), ou de 10 mg/ml de protamine. L'activité est exprimée en quantité de citrulline (en µmol) produite par minute et par milligramme d'enzyme recombinante. D'après (Méchin *et al.*, 2005).

Récemment, Assohou-Luty *et al.* ont de plus démontré, en désiminant *in vitro* des peptides synthétiques par les PADs 2 et 4 recombinantes, que la nature des acides aminés encadrant l'arginine cible jusqu'à 4 acides aminés de part et d'autre (position N-4 à N+4, comme pour les protéases) est déterminante pour la spécificité d'action des PADs ; certains acides aminés étant favorables ou au contraire défavorables à l'action de l'un ou l'autre des isotypes (Figure 46).

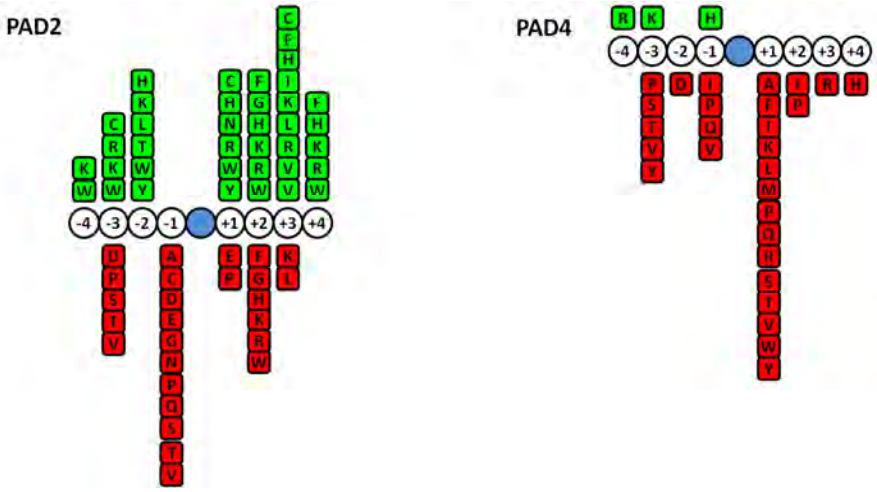


Figure 46 : Spécificité de substrats des PAD2 et PAD4. L'efficacité de désimination des PADs2 et 4 humaines a été mesurée sur le peptide DSQFAF**R**GASASD, utilisé comme référence. Les résidus de ce peptide ont été substitués un à un par les 19 autres acides aminés. En bleu, est indiqué la position de l'arginine cible. En rouge, sont indiqués les résidus pour lesquels l'efficacité relative de la désimination de l'arginine est inférieure ou égale à la moitié de l'efficacité observée sur le peptide de référence. En vert, sont indiqués les résidus pour lesquels l'efficacité relative est au moins deux fois plus grande. D'après (Assohou-Luty *et al.*, 2014).

Ainsi, pour un même substrat naturel, ce ne sont pas les mêmes résidus qui sont prioritairement désiminés par l'une ou l'autre des PADs. Cela suggère une possible complémentarité d'action de différents isotypes pour la désimination de certaines protéines cibles. Ces différences de spécificités de substrats peuvent probablement en grande partie être expliquées par les différences de structures entre les différents isotypes de PADs. De plus, la plus large spécificité de la PAD1 pourrait être expliquée, au moins en partie, par son existence sous forme monomérique, présentant moins de contraintes structurales comparativement aux formes dimériques des autres isotypes (Saijo *et al.*, 2016).

D. Distribution tissulaire et cellulaire des PADs

Des PADs ont été détectées dans la grande majorité des tissus testés. Elles présentent cependant chacune une distribution tissulaire spécifique (Tableau 6).

Tableau 6 : Distribution tissulaire et cellulaire des PADs chez l'homme

	Expression protéique ***ARNm/EST**
PAD1	**Epiderme, follicule pileux, glande sudoripare, muscle arrecteur du poil, utérus** *cerveau, colon, épiderme, pancréas, peau, placenta, poumon, prostate, rate, rétine, testicule, thymus, utérus, vagin
PAD2	**Cerveau, cellule de Schwann, épiderme, follicule pileux, glande salivaire, glande sudoripare, leucocyte, macrophage, moelle épinière, monocyte, muscle arrecteur du poil, neutrophile, oligodendrocytes, pancréas, poumon, prostate, rate, utérus** *aorte, cerveau, cœur, colon, épiderme, foie, glande salivaire, glande sudoripare, intestin grêle, leucocyte, macrophage, moelle épinière, moelle osseuse, monocyte, muscle squelettique, oreille interne, ovaire, pancréas, peau, placenta, poumon, prostate, rate, rein, rétine, sein, testicule, thymus, utérus, vagin
PAD3	**Cerveau fœtal, cellule de Schwann, épiderme, follicule pileux, moelle épinière fœtale** *épiderme, foie, intestin grêle, pancréas, peau, poumon, prostate, rein, testicule, thymus
PAD4	**Eosinophile, leucocyte, macrophage, moelle osseuse, monocyte, neutrophile, glande mammaire** *cerveau, cœur, éosinophile, foie, intestin grêle, leucocyte, macrophage, moelle osseuse, monocyte, neutrophile, oreille interne, pancréas, placenta, poumon, prostate, rate, rein, testicule, thymus
PAD6	**Ovocyte** *foie, leucocyte, macrophage, monocyte, muscle squelettique, ovaire, poumon, rate, rein, testicule

D'après : (Vossenaar *et al.*, 2003 ; Nachat *et al.*, 2005a ; Moelants *et al.*, 2012 ; U *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2016).

La PAD1 est cytoplasmique et elle est principalement exprimée dans la peau : elle est présente dans toutes les couches de kératinocytes de l'épiderme, dans le follicule pileux ainsi que dans le muscle arrecteur du poil et les glandes sudoripares (Nachat *et al.*, 2005a, 2005b). En effet, l'ADNc de la PAD1 a initialement été cloné à partir d'épiderme de souris (Ishigami *et al.*, 1998 ; Rus'D *et al.*,

1999), puis d'homme (Guerrin *et al.*, 2003). La PAD1 a aussi été retrouvée dans l'utérus et son ARNm a de plus été détecté dans d'autres organes tels que la prostate, les testicules, le placenta, la rate et le thymus (Guerrin *et al.*, 2003).

La PAD2 est l'isotype le plus ubiquiste. Initialement cloné chez la souris et le rat puis chez l'homme (Watanabe et Senshu, 1989 ; Tsuchida *et al.*, 1991, 1993 ; Ishigami *et al.*, 2002), son ARNm a été largement retrouvé dans tous les tissus testés (Nachat *et al.*, 2005a). Son expression protéique a ensuite été mise en évidence dans de nombreux tissus et types cellulaires. Elle est en particulier très abondante dans le système nerveux central (cerveau et moelle épinière) et est aussi retrouvée dans certaines cellules myéloïdes (monocyte, macrophage, neutrophile) ainsi que dans l'épiderme et le follicule pileux (Nachat *et al.*, 2005a, 2005b ; Vossenaar *et al.*, 2004). La PAD2 est majoritairement cytoplasmique mais il semblerait qu'elle puisse se localiser dans le noyau bien qu'elle ne possède pas de signal de relocalisation nucléaire. Elle a notamment été détectée dans le noyau de cellules épithéliales de glande mammaire humaine et de cellules souches neurales en culture (Cherrington *et al.*, 2012 ; U *et al.*, 2014). Ces nouvelles données doivent cependant être confirmées par d'autres équipes.

La PAD3 présente une expression plus restreinte et est principalement cytoplasmique. Son ADNc a initialement été cloné à partir d'épiderme de rat et de souris (Nishijyo *et al.*, 1997 ; Ruds'D *et al.*, 1999) puis à partir de kératinocytes humains en culture (Kanno *et al.*, 2000). Au niveau protéique, elle semble essentiellement présente dans les couches les plus différenciées de l'épiderme et du follicule pileux (Nachat *et al.*, 2005a, 2005b). Récemment, la PAD3 a été détectée dans des cellules de Schwann humaines en culture (Keilhoff *et al.*, 2008) ainsi que dans le cerveau fœtal et la moelle épinière fœtale, son expression diminuant ensuite avec le développement (U *et al.*, 2014). De plus, comme la PAD2, la PAD3 est elle aussi détectée dans le noyau de cellules souches neurales en culture bien qu'elle ne possède pas de signal de relocalisation nucléaire. Enfin, la PAD3 est détectée dans les glandes mammaires murines lors de la lactation (Li *et al.*, 2016).

L'ADNc de la PAD4 a été cloné pour la première fois chez le rat puis la souris à partir de cellules épidermiques (Ishigami *et al.*, 1998 ; Yamakoshi *et al.*, 1998 ; Rus'd *et al.*, 1999), puis chez l'homme, dans des lignées HL-60 différenciées en granulocytes (Nakashima *et al.*, 1999). Au niveau protéique, la PAD4 est principalement exprimée dans les cellules myéloïdes telles que les granulocytes (éosinophiles et neutrophiles) et les monocytes, et très faiblement exprimée dans les macrophages (Foulquier *et al.*, 2007). Cet isotype est essentiellement localisé dans le noyau des cellules, ce qui est cohérent avec le fait qu'elle possède un signal de nucléarisation (Nakashima *et al.*, 2002).

La PAD6 a quant à elle une expression tissulaire très restreinte. Son ADNc a été d'abord cloné chez la souris puis chez l'homme, à partir de banques d'ADNc d'ovaire dans les deux cas (Wright *et al.*, 2003 ; Chavanas *et al.*, 2004). Sa forme protéique a uniquement été détectée au niveau des

ovocytes et blastocystes chez la souris et tout récemment dans les ovocytes humains (Wright *et al.*, 2003 ; Esposito *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2016). Chez l'homme, son ADNc a de plus été retrouvé dans des cellules lymphocytaires et monocytaires, mais pas sa forme protéique (Foulquier *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la présence extracellulaire des PADs 2 et/ou 4 ainsi que de protéines citrullinées a été observée au niveau de certains tissus, en corrélation avec le niveau d'inflammation (Foulquier *et al.,* 2007 ; Badillo-Soto *et al.,* 2016). Par exemple, les PADs 2 et 4 sont retrouvées dans le liquide et le panus synoviaux des articulations enflammées des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. La PAD2 a aussi été retrouvée au niveau extracellulaire dans le poumon de fumeurs. La présence extracellulaire de ces enzymes peut être expliquée par l'hypothèse suivante : suite à l'inflammation, une quantité importante de cellules de l'immunité (telles que les neutrophiles) est recrutée au niveau du tissu. Après leur mort (induite par nécrose et/ou NETose), les PADs seraient alors libérées dans l'espace extracellulaire (Méchin *et al.*, 2007 ; Spengler *et al.*, 2015 ; voir paragraphe IV.G.1.e).

E. Régulation de l'expression et de l'activité des PADs

1. Régulation de l'expression des PADs

L'analyse de l'expression des gènes *PADI 1* à *4* a permis de montrer qu'ils sont régulés, comme de nombreux gènes, par la liaison de divers facteurs de transcription au niveau de leur promoteur minimal, long respectivement de 195, 132, 129 et 348 pb. Les facteurs ubiquistes Sp1/Sp3 apparaissent nécessaires à l'expression de ces différents gènes et régulent l'activité de chaque promoteur, en coopération avec d'autres facteurs ubiquistes, tels que MZF1 (myeloid zinc finger) pour le promoteur de *PADI1*, NF-Y pour le promoteur de *PADI3*, et NF-Y ainsi que des facteurs de la famille AP-1 pour le promoteur de *PADI4* (Dong *et al.*, 2005, 2006, 2007a, 2007b ; Figure 47).

L'étude d'une séquence non codante intergénique conservée entre l'homme et la souris a de plus permis l'identification de sites de contrôle à longue distance des gènes *PADI1* et *PADI3* (Figure 48A). Un activateur transcriptionnel (de type « enhancer »), nommé PIE (pour « *PADI* intergenic enhancer ») et localisé à 86 kb du promoteur de *PADI3*, est notamment capable d'activer la transcription de ce gène en présence d'une concentration élevée de calcium, via la formation d'une très large boucle chromatinienne (> 80 kb) et la fixation des facteurs c-Jun et c-Fos de la famille AP-1 (Chavanas *et al.*, 2008 ; Figure 48B). De plus, deux autres activateurs transcriptionnels à longue distance, nommés PIE-S1 et PIE-S2, peuvent agir en synergie pour activer la transcription de *PADI3* et probablement celle de *PADI1*. En fonction de l'état de différenciation des kératinocytes (directement lié à la présence de calcium dans le milieu), la fixation différentielle de c-Jun et Jun D sur le site AP-1 de PIE-S2 permet la régulation de *PADI3*. Dans les kératinocytes les plus différenciés, la fixation de c-Jun sur le site PIE-S2

active la transcription de *PADI3* en interagissant de manière concomitante avec des facteurs de transcription MIBP1/RFX1 recrutés sur le site PIE-S2 et avec la boîte TATA du promoteur minimal de *PADI3*. Dans les kératinocytes prolifératifs, la fixation de Jun D au site PIE-S2 empêche cette activation (Adoue *et al.*, 2008 ; Figure 48C). Par ailleurs, une étude a mis en évidence la régulation de l'activité du promoteur de *PADI1* via la fixation des sous-unités p50 et p65 de la famille des facteurs de transcription NF-kB au niveau d'un site localisé dans le premier intron du gène. Une fois fixé, l'hétérodimère p50/p65 interagit avec des éléments du promoteur en formant une boucle chromatinienne et augmente ainsi son activité (Ying *et al.*, 2010). Aussi, dans des lignées cellulaires d'astrocytome (cancer du système nerveux central), le facteur de transcription p53, l'un des suppresseurs de tumeurs les plus importants, est capable d'accroître l'expression du gène *PADI4* en se fixant sur une séquence située dans le premier intron de *PADI4* et nommée p53BS-A (Tanikawa *et al.*, 2009).

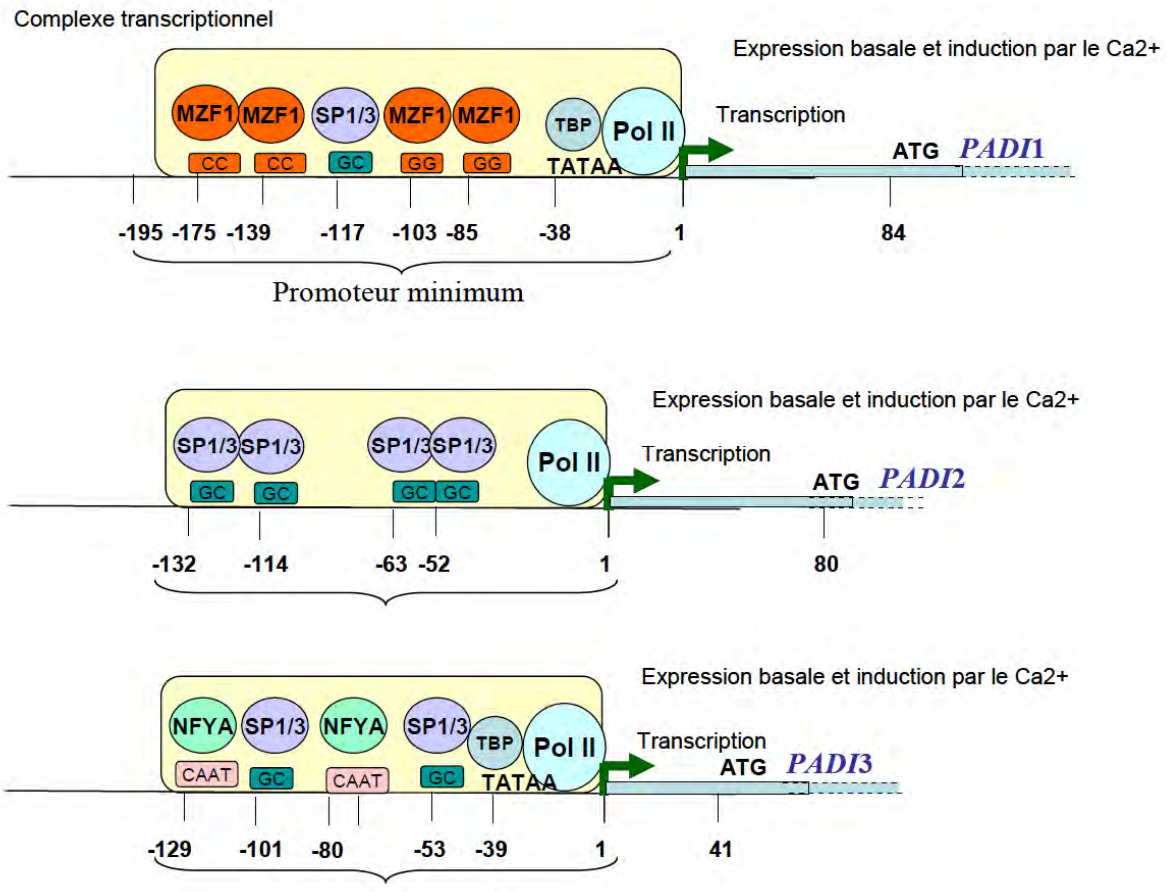


Figure 47 : Promoteurs minimums des gènes *PADI* 1, 2 et 3 et les facteurs de transcription capables de s'y lier. D'après (Adoue, 2008).

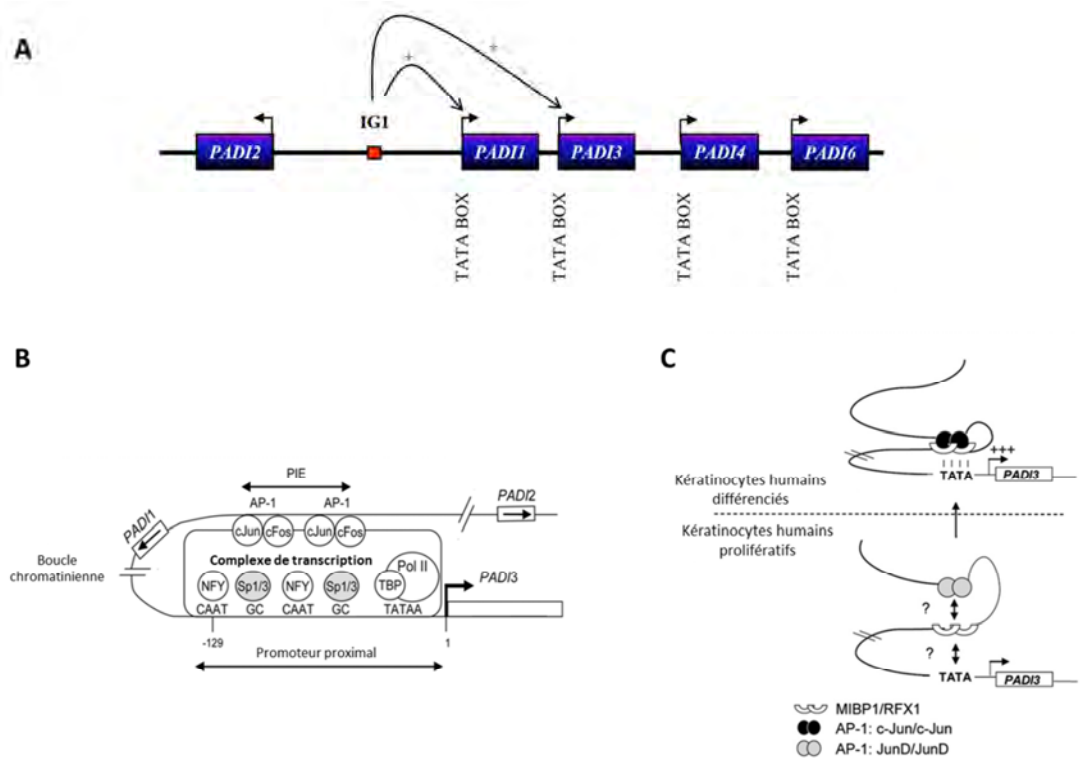


Figure 48 : Régulation transcriptionnelle à longue distance des gènes *PADI1* et *PADI3.* (A) Région intergénique IG1 non codante et conservée entre l'homme et la souris contenant des sites de contrôle à longue distance des gènes *PADI1* et *PADI3*. (B) Modèle schématique de régulation à longue distance du gène *PADI3* par l'activateur transcriptionnel PIE : une stimulation calcique des kératinocytes en culture induit la fixation de c-Jun et/ou cFos sur les sites AP-1 de PIE qui par repliement de la chromatine interagissent avec le complexe de transcription fixé sur le promoteur proximal de *PADI3*, stimulant la transcription du gène. (C) Modèle schématique de régulation à longue distance du gène *PADI3* par la coopération des activateurs PIE-S1 et PIE-S2 : dans les kératinocytes prolifératifs (faible concentration en calcium), JunD se lie à PIE-S1 sans augmentation d'activité du promoteur de *PADI3* alors que dans les kératinocytes différenciés (haute concentration en calcium), c-Jun remplace JunD sur PIE-S1 augmentant ainsi l'activité du promoteur de *PADI3* probablement via une interaction avec le complexe MIBP1/RFX1 lié à PIE-S2 et avec la boîte TATA du promoteur proximal. D'après (Adoue, 2008 ; Chavanas *et al.*, 2008 ; Adoue *et al.*, 2008).

En outre, d'autres facteurs tels que le calcium, la vitamine D ou encore les œstrogènes sont impliqués dans la régulation de l'expression transcriptionnelle des gènes *PADI*.

Diverses études ont montré que le calcium, qui régule la différenciation épidermique, induit une augmentation de l'expression des gènes *PADI* 1, 2 et 3 dans des kératinocytes primaires humains en culture monocouche. En effet, dès 24 heures de culture en présence de 1,2 ou 1,5 mM $CaCl_2$ (contre 0,2 mM pour la condition contrôle), les taux d'ARNm des PADs 1, 2 et 3 sont augmentés (Dong *et al.*, 2005, 2006, 2007a ; Chavanas *et al.*, 2008 ; Adoue *et al.*, 2008). Une de ces études a de plus montré qu'il faut cultiver les kératinocytes à haute concentration calcique pendant au moins 96 heures pour observer une augmentation de la détection de PAD1 en western blot (Dong *et al.*, 2007a). L'expression protéique des PADs 2 et 3 n'a jamais été analysée dans ces conditions.

De même, un traitement de 24h à la vitamine D, qui régule la différenciation épidermique en agissant en synergie avec le calcium (voir paragraphe I.D.2.c), stimule l'expression des gènes *PADI 1, 2* et *3* dans des kératinocytes primaires humains en culture mais n'est pas non plus suffisant pour

induire la synthèse des protéines (Méchin *et al.*, 2010). Par contre, la densité cellulaire, autre modèle d'induction de la différenciation des kératinocytes, augmente le taux d'ARNm et de protéines des isotypes 1 et 3 alors qu'elle ne modifie pas l'expression de la PAD2 (Méchin *et al.*, 2010). Dans les kératinocytes, l'expression des PADs semble donc être corrélée au taux de différenciation des cellules, ce qui est en accord avec leur profil d'expression épidermique (voir paragraphe IV.F.1.b).

Par ailleurs, dans les cellules tumorales mammaires MCF-7, l'expression de *PADI4* est induite par les œstrogènes, via la fixation du récepteur aux œstrogènes ER-α sur deux éléments situés en amont du promoteur du gène *PADI4*, et également via une augmentation de la fixation des facteurs de transcription AP-1, Sp1 et NF-Y sur le promoteur minimal du gène (Dong *et al.*, 2007b). De plus, il a été démontré qu'une injection d'œstradiol à des souris ayant subi une ovariectomie augmente la quantité d'ARNm des Pads 1 et 2 de manière dose dépendante (Takahara *et al.*, 1992).

Les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de *PADI6* n'ont été que peu explorés. Néanmoins, le facteur de transcription Sp1 semble nécessaire à son expression dans les ovaires des truies (Xia *et al.*, 2016).

2. Régulation de l'activité des PADs

Comme nous l'avons vu lors de la description de la structure des PADs (paragraphe IV.C.2), le calcium est indispensable à leur activité. De plus, une étude *in vitro* réalisée par Méchin et al. a montré que les 3 PADs exprimées dans l'épiderme ne présentent pas la même sensibilité au calcium. L'isotype nécessitant le moins de calcium pour être efficace à 100% est la PAD1 alors que celui qui en exige le plus est la PAD2 (Méchin *et al*., 2005). De manière intrigante, la concentration en calcium nécessaire pour activer les PADs *in vitro* est très forte en comparaison à la concentration calcique intracellulaire. Slade *et al.* ont montré dans leur analyse de la structure cristallographique de la PAD2 que les sites de fixation du calcium Ca3-5, regroupés au sein d'une région du domaine amino-terminal, présentent une affinité pour le calcium bien plus faible que les sites Ca1 et Ca6. Ces derniers gouverneraient ainsi l'ensemble de la dépendance au calcium de la PAD. Il a été proposé que d'autres protéines puissent se lier à cette région et agir comme co-activateurs en augmentant l'affinité de ces sites pour le calcium *in vivo* (Slade *et al.*, 2015). En accord avec cette hypothèse, une étude a démontré que la fixation d'un auto-anticorps anti-PAD4 sur une région proche des sites Ca3-5 de la PAD4 diminue significativement la concentration en calcium nécessaire à son activation *in vitro* (Darrah *et al.*, 2013).

La température et le pH influencent aussi l'activité des PADs *in vitro*. La PAD3 est particulièrement sensible au pH puisqu'une élévation trop importante de celui-ci (au-dessus de 8) engendre une diminution significative de son activité (Méchin *et al.*, 2007).

D'autre part, les PADs 1 à 4 sont capables de s'auto-désiminer *in vitro*, ce qui réduit leur efficacité (Méchin *et al.*, 2010 ; Andrade *et al.*, 2010). L'auto-désimination de la PAD4 a aussi été observée *in vivo* (Andrade *et al.*, 2010). Une approche *in silico,* utilisant un modèle tridimensionnel de la PAD3 (généré en utilisant les coordonnées atomiques de la structure cristallographique de la PAD4) sur lequel les arginines les plus accessibles ont été substituées par des citrullines, a permis de montrer que l'auto-désimination de cet isotype induit des changements structuraux discrets, en particulier au niveau du site actif, qui sont probablement responsables de la réduction d'activité observée (Méchin *et al.*, 2010 ; Figure 49). Une autre étude rapporte de même un changement de la position d'acides aminés clés du site actif suite à l'auto-désimination de la PAD4 par modélisation *in silico*. Les auteurs proposent ensuite, suite à des analyses de cinétique enzymatique, que l'auto-désimination de la PAD4 ne change pas son activité ni sa sensibilité au calcium, mais réduit son affinité pour certaines protéines cibles (Slack *et al.*, 2011b), ce qui a pour conséquence de réduire son efficacité. L'auto-désimination pourrait donc jouer un rôle clé dans la régulation des PADs.

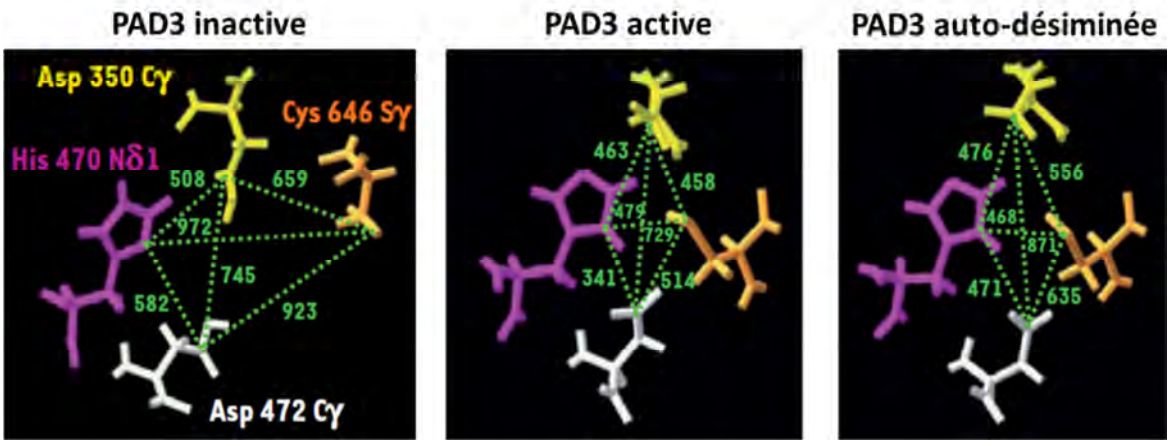


Figure 49 : Effet de l'auto-désimination sur la conformation du site actif de la PAD3. Modèle tridimensionnel du site actif de la PAD3 généré *in silico*. À gauche : forme inactive en absence de calcium, au milieu : forme active en présence de calcium et sans auto-désimination, à droite : forme active auto-désiminée. L'auto-désimination engendre une modification de la position des quatre acides aminés majeurs pour l'activité catalytique et induit un élargissement du site actif. Les distances séparant les différents acides aminés du site actif sont indiquées en picomètres. D'après (Méchin *et al.*, 2011).

Enfin, un inhibiteur cellulaire de la PAD4 a tout récemment été identifié. Il s'agit de PTPN22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22). Dans des macrophages de souris déficientes en Ptpn22, le taux de désimination des protéines est fortement augmenté comparativement à celui des macrophages de souris sauvages. De plus, il a été montré que la surexpression d'une forme recombinante de PTPN22 humaine dans ces cellules inhibe l'activité de la PAD4 en interagissant avec celle-ci, et son action est indépendante de son activité phosphatase (Chang *et al.*, 2015). À ce jour, on ne sait pas si PTPN22 régule l'activité des autres PADs *in vivo*, ni s'il est exprimé dans les kératinocytes.

F. Implications physiologiques et pathologiques des PADs dans la peau

1. Rôles physiologiques des PADs dans l'épiderme

a. Substrats épidermiques des PADs

Dans l'épiderme, les protéines déiminées sont détectées uniquement au niveau de la couche cornée (Figure 50A). Seuls 4 substrats épidermiques ont pour l'instant clairement été identifiés. Il s'agit des kératines 1 et 10, de la FLG et de l'hornerine, une autre SFTP composant de l'enveloppe cornée (Senshu *et al.*, 1996 ; Hsu *et al.*, 2016 ; Figure 50B). Ceci a notamment été démontré en réalisant des électrophorèses bidimensionnelles suivies d'immunodétections avec un antisérum spécifique des protéines déiminées, appelé AMC pour « anti-modified citrulline ». Cet antisérum, purifié par affinité, reconnait spécifiquement les résidus citrulline des protéines après que ceux-ci aient été modifiés chimiquement (Senshu *et al.*, 1995). On peut noter sur les figures 50B.c et 50B.i que de nombreuses formes de FLG et d'hornerine, présentant différents points isoélectriques, sont détectées. Elles correspondent à des formes plus ou moins déiminées, les plus déiminées présentant les points isoélectriques les plus faibles (puisque la déimination engendre la perte d'une charge positive ; Figure 50B.c et 50B.i). On observe de plus que les formes les plus déiminées présentent un poids moléculaire apparent plus élevé que les formes non déiminées. La déimination change en effet les propriétés de migration des protéines dans les gels de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (Méchin *et al.*, 2005).

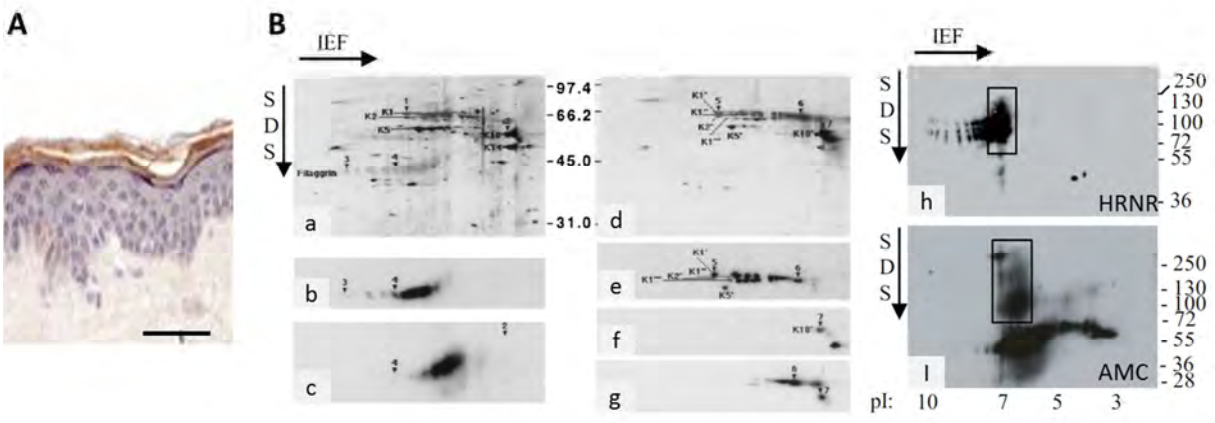


Figure 50 : Distribution et identification de protéines déiminées dans l'épiderme. (A) Détection des protéines déiminées sur coupe de peau humaine par immunohistochimie en utilisant l'anticorps AMC. (B) Caractérisation des protéines déiminées dans un extrait épidermique effectué en tampon urée (a-c, h-i) ou en tampon urée/2-ME (d-g) par électrophorèse bidimensionnelle. (a, d) Coloration des protéines totales. (b) Immunodétection de la FLG. (e) Immunodétection des kératines de type II. (f) Immunodétection des kératines de type I. (h) Immunodétection de l'hornerine (HRNR). (c, g, i) Immunodétection des protéines déiminées (AMC). D'après (Senshu *et al.*, 1996 ; Hsu *et al.*, 2016).

Les kératines 1 et 10 ne sont détectées sous formes désiminées que dans les assises les plus superficielles de la couche cornée (Ishida-Yamamoto *et al.*, 2002). Il a été montré que les sites préférentiellement désiminés de la kératine 1 se trouvent dans les sous-domaines V1 et V2 de celle-ci (Senshu *et al.*, 1999). Le rôle de la désimination de ces deux kératines n'est pas connu mais il a été proposé qu'elle engendre une relaxation de la matrice fibreuse intracornéocytaire.

La FLG est une protéine très riche en arginines (qui représentent 11,2% des acides aminés composant sa partie centrale ; voir annexe 1) et est un des substrats majeurs des PADs dans l'épiderme. Comme nous l'avons vu, la désimination est une étape importante de son métabolisme (voir paragraphe II.C.2). Outre le fait que la désimination de la FLG engendre une diminution de son organisation structurale (Tarcsa *et al.*, 1996), deux fonctions majeures de la désimination de la FLG ont été démontrées. Tout d'abord, la désimination de la FLG diminue son affinité avec les filaments de kératines (Harding et Scott, 1983 ; Figure 51A). De plus, il a également été démontré *in vitro* que la FLG est plus rapidement protéolysée par la calpaïne 1 lorsqu'elle est désiminée (Kamata *et al.*, 2009 ; Hsu *et al.*, 2011 ; Figure 51B).

Concernant l'hornerine, il a été montré que sa désimination facilite, tout comme pour la FLG, sa protéolyse par la calpaïne 1. De plus, elle la rend aussi plus susceptible à l'action des TGases 1 et 3 ; il semblerait donc que l'hornerine soit incorporée sous forme désiminée à l'enveloppe cornée (Hsu *et*

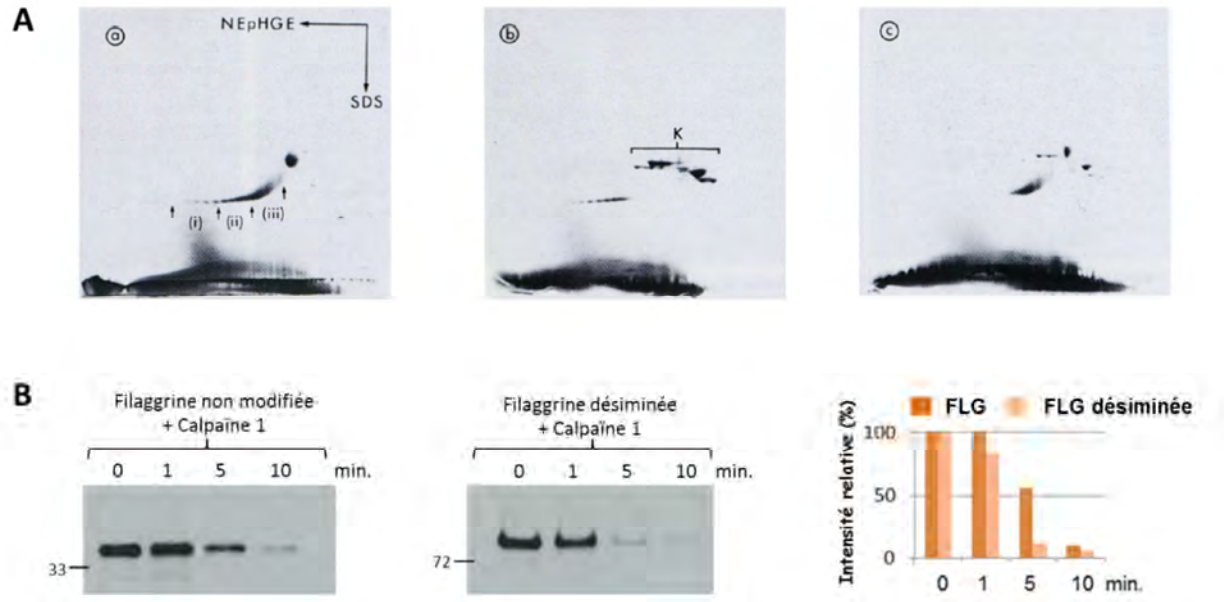


Figure 51 : Lorsqu'elle est désiminée, la filaggrine n'est pas capable d'interagir avec les filaments de kératines et est plus rapidement protéolysée par la calpaïne 1. (A) Formation *in vitro* de macrofibrilles, en incubant des kératines de cochon d'Inde et de la FLG humaine, analysée par électrophorèse bidimensionnelle en présence de SDS. (a) FLG humaine partiellement purifiée. (b) Culot insoluble obtenu après incubation de la FLG humaine et des kératines de cochon d'Inde, correspondant donc aux macrofibrilles insolubles. K = kératines. On remarque que seules les formes les plus basiques de FLG sont présentes dans ce culot. (c) Surnageant correspondant aux protéines non-agrégées. Les formes acides de FLG, correspondant aux formes désiminées, n'ont pas interagi avec les kératines et sont restées solubles. D'après (Harding et Scott, 1983). (B) Suivi par western blot de la protéolyse *in vitro* par la calpaïne 1 de la FLG recombinante non désiminée et de la FLG désiminée, en fonction du temps. D'après (Hsu *et al.*, 2011).

al., 2016). Par ailleurs, la filaggrine-2 (une autre SFTP) pourrait aussi être désiminée. Cette protéine semble présenter un métabolisme similaire à celui de la FLG, et tout comme la FLG, sa désimination *in vitro* facilite sa protéolyse par la calpaïne 1 (Hsu *et al.*, 2011). Cependant, il n'a pour l'instant pas été démontré que cette protéine est désiminée *in vivo*.

b. Expression et activité des PADs dans l'épiderme

Aux niveaux ARN et protéine, seuls trois isotypes de PADs sont exprimés dans l'épiderme humain : les PADs 1, 2 et 3 (Nachat *et al.*, 2005a ; Méchin *et al.*, 2005). En immunofluorescence indirecte, la PAD1 est détectée dans le cytoplasme de tous les kératinocytes vivants avec un gradient d'intensité croissante depuis la couche basale vers la couche granuleuse. En immunomicroscopie électronique, elle est de plus retrouvée dans toute la couche cornée, au sein de la matrice intracornéocytaire (Figures 52 et 53A). La PAD2 est retrouvée dans le cytoplasme des kératinocytes épineux et à la périphérie des kératinocytes granuleux (Figure 52). La PAD3 est quant à elle détectée dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux en immunofluorescence indirecte et est aussi détectée dans la matrice des assises profondes de cornéocytes de la couche cornée en immunomicroscopie électronique (Figures 52 et 53B).

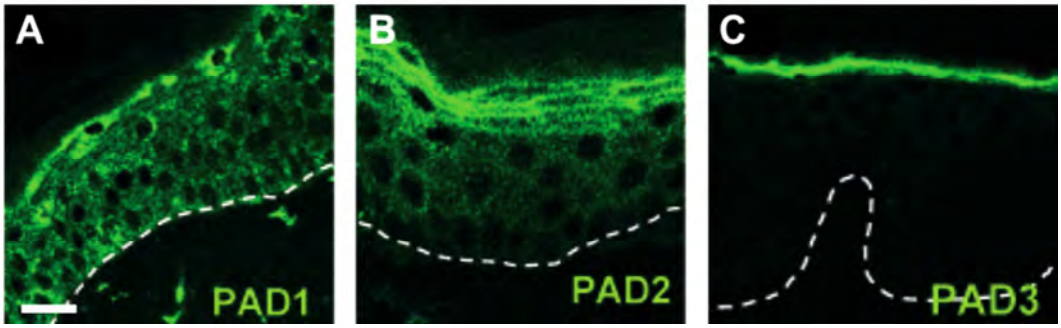


Figure 52 : Localisation des PADs 1, 2 et 3 dans l'épiderme humain. Les PADs ont été détectées par immunofluorescence indirecte avec des anticorps anti-peptides spécifiques de chaque isotype et observées en microscopie confocale. Barre d'échelle = 20 µm. D'après (Nachat *et al.*, 2005a).

Bien que les protéines désiminées soient détectées uniquement au niveau de la couche cornée, les PADs 1 et 2 sont détectées dans les couches basale et/ou épineuse. On peut donc supposer qu'elles n'y sont pas actives, peut-être du fait d'une trop faible concentration en calcium intracellulaire. En effet, nous avons vu précédemment que la concentration en calcium suit un gradient d'intensité croissante de la couche basale vers la couche granuleuse, où elle atteint un maximum, et diminue ensuite au sein de la couche cornée (voir paragraphe I.D.2.b). Les PADs seraient ainsi actives uniquement au niveau des couches granuleuse et cornée, où la concentration en calcium est la plus forte.

In vitro, les trois isotypes de PADs épidermiques sont capables de désiminer la FLG. Néanmoins, la PAD2 étant détectée uniquement en périphérie des cellules granuleuses et étant absente de la couche cornée, il est peu probable que cet isotype participe à la désimination de la FLG *in vivo*. Par contre, des analyses en immunomicroscopie électronique ont montré que la PAD1 et la PAD3 colocalisent partiellement avec la (pro)FLG au niveau des granules de kératohyaline de la couche granuleuse et dans la matrice fibreuse des cornéocytes les plus profonds (Figures 53A.b, 53A.d, 53B.b et 53B.c). De plus, les marquages de la FLG et de la PAD3 disparaissent simultanément au niveau de la couche cornée superficielle (Figure 53B.a). Ceci suggère que la PAD1 et la PAD3 sont responsables de la désimination de la FLG *in vivo*. En outre, la PAD1 étant le seul isotype détecté jusqu'en haut de la couche cornée, elle semble donc être la meilleure candidate pour la désimination des kératines 1 et 10 dans les assises les plus superficielles de cornéocytes.

Les fonctions de la PAD2 et ses cibles dans l'épiderme n'ont à ce jour pas été mises en évidence. Les souris dont le gène *Padi2* a été invalidé ne présentent aucun phénotype cutané remarquable. L'absence de Pad2 ne modifie ni le profil d'expression, ni le taux de protéines désiminées dans l'épiderme. Pourtant aucune compensation par les autres isotypes de Pad n'a été mise en évidence. Chez ces souris, la différenciation épidermique ainsi que la fonction barrière ne sont pas altérées (Coudane, 2009). Il semble donc que cet isotype ne joue pas de rôle en condition normale dans l'homéostasie épidermique, chez la souris tout du moins.

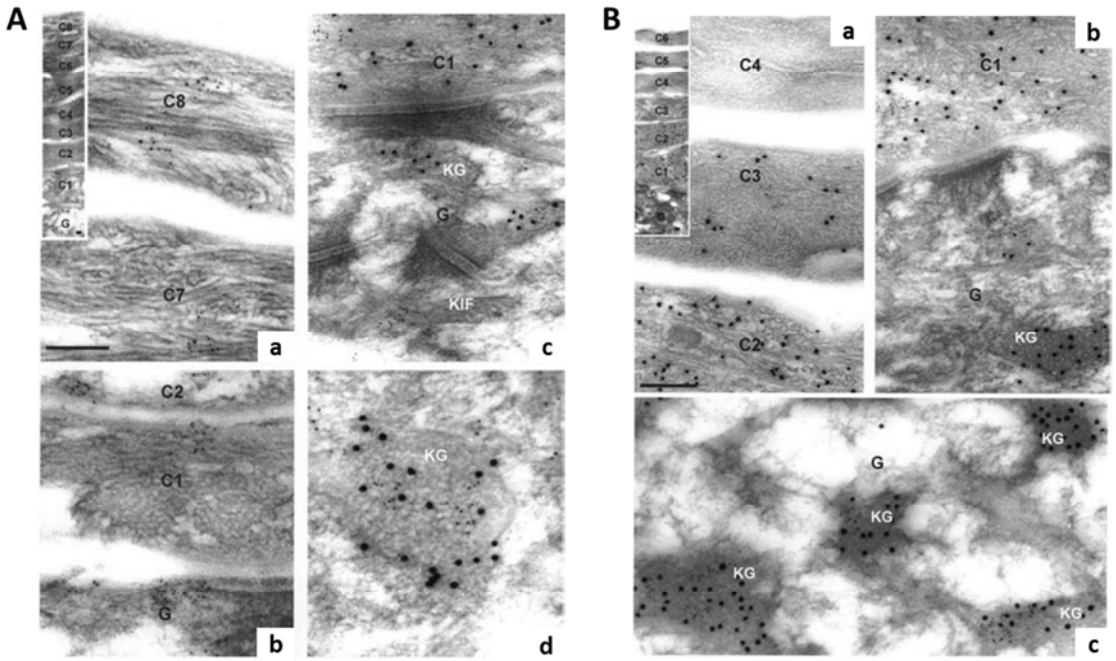


Figure 53 : Localisation des PADs 1 et 3 dans les couches granuleuse et cornée et colocalisation avec la filaggrine. Double immunodétection de la FLG (billes d'or de 10 nm) et de la PAD1 (A) ou de la PAD3 (B) (billes d'or de 5 nm) et observation en microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle = 0,1 µm (A.a, b et d), 0,2 µm (A.c et D). C1-C8 : différentes assises de cornéocytes de la couche cornée, G : couche granuleuse, KG : granules de kératohyaline, KIF : filaments intermédiaires de kératines. D'après (Méchin *et al.*, 2005).

2. Rôles physiologiques des PADs dans le follicule pileux

a. Substrats des PADs dans le follicule pileux

Dans le follicule pileux, les protéines désiminées sont détectées dans toutes les couches de la gaine épithéliale interne : couche de Henlé, cuticule et couche de Huxley, ainsi que dans la médulla et la cuticule de la tige pilaire (Nachat *et al.*, 2005b ; Figure 54).

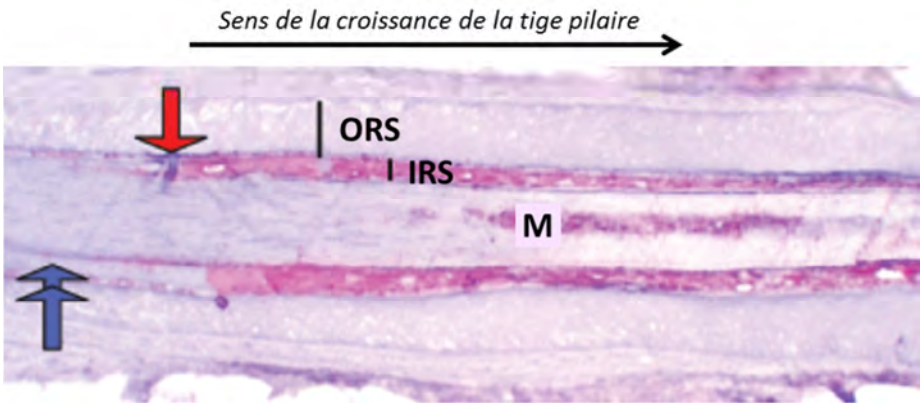


Figure 54 : Localisation des protéines désiminées dans le follicule pileux. Détection des protéines désiminées sur cryosection longitudinale de follicule pileux humain par immunohistochimie (AMC). La flèche rouge indique la couche de Henlé. La double flèche bleue indique la cuticule de la gaine épithéliale interne. ORS : gaine épithéliale externe, IRS : gaine épithéliale interne, M : Médulla. D'après (Nachat *et al.*, 2005b).

Plusieurs substrats folliculaires des PADs ont été identifiés. Il s'agit de la TCHH et de la protéine S100A3 ainsi que de certaines kératines de la gaine interne (Rogers et Taylor, 1977 ; Kizawa *et al.*, 2008 ; Steinert *et al,* 2003).

La TCHH est le premier substrat des PADs à avoir été mis en évidence et est le substrat des PADs prédominant du follicule pileux. Ceci est notamment expliqué par le fait que la TCHH est très riche en arginines, qui représentent 23,9% des acides aminés composant son domaine répétitif central (voir annexe 1). Comme décrit précédemment, la TCHH est exprimée dans les trois couches de la gaine épithéliale interne ainsi que dans la médulla et joue un rôle important dans le processus de différenciation de ces compartiments (voir paragraphe III.D.2). Comme pour la FLG, la désimination de la TCHH semble avoir deux fonctions majeures pour son métabolisme. Elle va engendrer une diminution de son organisation structurelle, et en particulier un dépliement de nombreuses hélice-α de son domaine répétitif central, ce qui provoque l'augmentation de sa solubilité d'une part et, d'autre part, de sa susceptibilité à l'activité des TGases et en particulier de la TGase 3. Un plus grand nombre de glutamines deviendrait accessible aux TGases pour la formation de liaisons ε-(γ-glutamyl)-lysine, sans doute du fait d'une diminution de l'organisation structurale de la TCCH. Ceci a été démontré *in vitro* en utilisant une forme recombinante du domaine 8 de la TCHH (Tarcsa *et al.*, 1997).

La protéine S100A3 appartient à la famille des protéines S100, c'est donc une protéine qui fixe le calcium. S100A3 est une petite protéine, de 11 kDa, qui a la particularité d'être riche en cystéine et de présenter des sites de fixation au zinc. En outre, elle contient seulement quatre résidus arginine. S100A3 est fortement exprimée dans les cellules de la cuticule de la tige pilaire et semble jouer un rôle important dans la différenciation de cette couche (Kizawa *et al.*, 1998). Une fois la cuticule différenciée, S100A3 est localisée au niveau de l'endocuticule. Il a été démontré que cette protéine est progressivement désiminée au cours de la différenciation cuticulaire. Dans la cuticule immature, S100A3 est présente sous forme de dimère. Lors de la différenciation cuticulaire, sa désimination (et en particulier celle de l'arginine 51) engendre sa tétramérisation, ce qui semblerait accroître sa capacité à fixer le calcium (Kizawa *et al.*, 2008). Cette protéine pourrait donc servir de réservoir de calcium dans la cuticule. Récemment, une étude a montré une corrélation positive entre le taux de désimination de S100A3 et la résistance de la cuticule. Ceci suggère que S100A3 participe au renforcement de la cuticule et que sa désimination est essentielle à cette fonction (Takahashi *et al.*, 2015).

b. Expression différentielle des PADs dans le follicule pileux

Les PADs 1, 2 et 3 sont exprimées dans le follicule pileux. Elles semblent toutes trois être présentes dans les trois couches de la gaine interne (couches de Henlé, Huxley et cuticule) ainsi que dans la cuticule de la tige pilaire. De plus, la PAD1 est aussi détectée dans la gaine de Ito, la PAD3 est le seul isotype présent au niveau de la médulla (Nachat *et al.*, 2005b ; Figure 53), et les PADs 1 et 2 ont parfois aussi été détectées dans le cortex de la tige pilaire (Kanno *et al.*, 2000 ; Figure 55B).

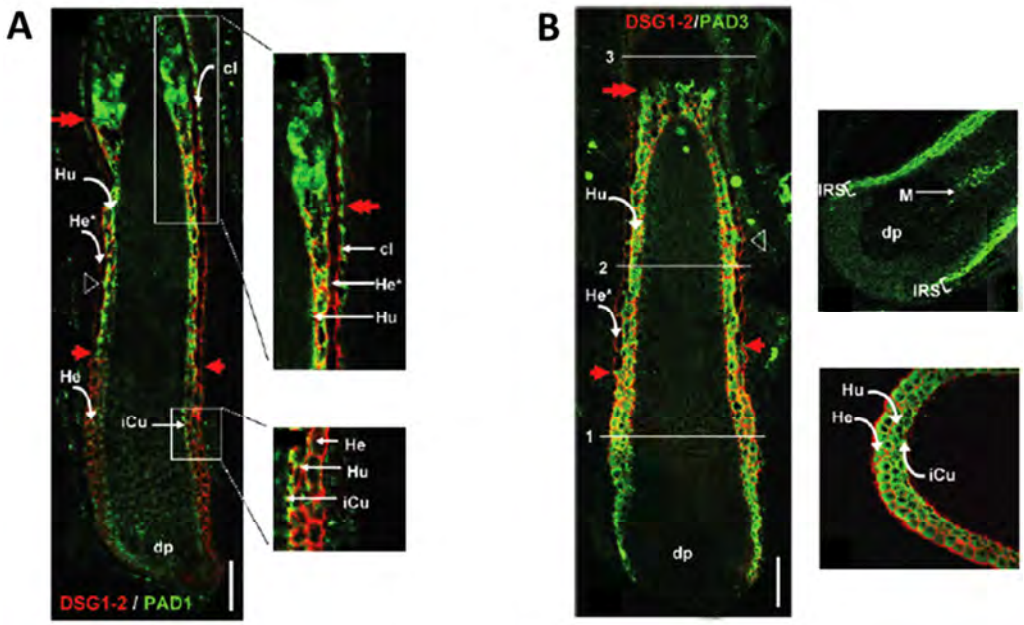


Figure 55 : Localisation des PADs 1 et 3 dans le follicule pileux. Détection des PADs 1 (A) ou 3 (B) et des desmogléines (DSG1-2) sur cryosections longitudinales de follicule pileux humain par immunofluorescence indirecte. He : couche de Henlé, He* : couche de Henlé cornifiée, Hu : couche de Huxley, iCu : cuticule de la gaine interne, IRS : gaine interne, M : médulla, cI : gaine de Ito, dp : papille dermique. D'après (Nachat *et al.*, 2005b).

Dans la médulla, seule la PAD3 est détectée. Cet isotype semble donc être responsable de la désimination de la TCHH dans cette couche. Il a de plus été montré que la PAD3 colocalise avec la TCHH dans la médulla ainsi que dans la gaine épithéliale interne (Nachat *et al.*, 2005b ; Figure 56A et 56B). La PAD3 est donc la meilleure candidate pour la désimination de la TCHH. On ne peut cependant pas exclure l'intervention des PADs 1 et 2 au niveau de la gaine interne.

D'autre part, les trois PADs colocalisent avec la protéine S100A3 au niveau de la cuticule de la tige pilaire (Figure 56C). *In vitro*, les trois PADs modifient de manière différentielle la protéine S100A3 recombinante. Les PADs 1 et 2 sont capables de convertir les quatre arginines de S100A3 en citrulline alors que la PAD3 agit uniquement sur l'arginine 51. Or la protéine S100A3 semble être majoritairement désiminée au niveau de l'arginine 51 *in vivo*, et c'est la désimination de ce résidu qui induit sa tétramérisation. L'activité spécifique de la PAD3 sur cette arginine en fait donc la meilleure candidate pour la désimination de S100A3 *in vivo* (Kizawa *et al.*, 2008).

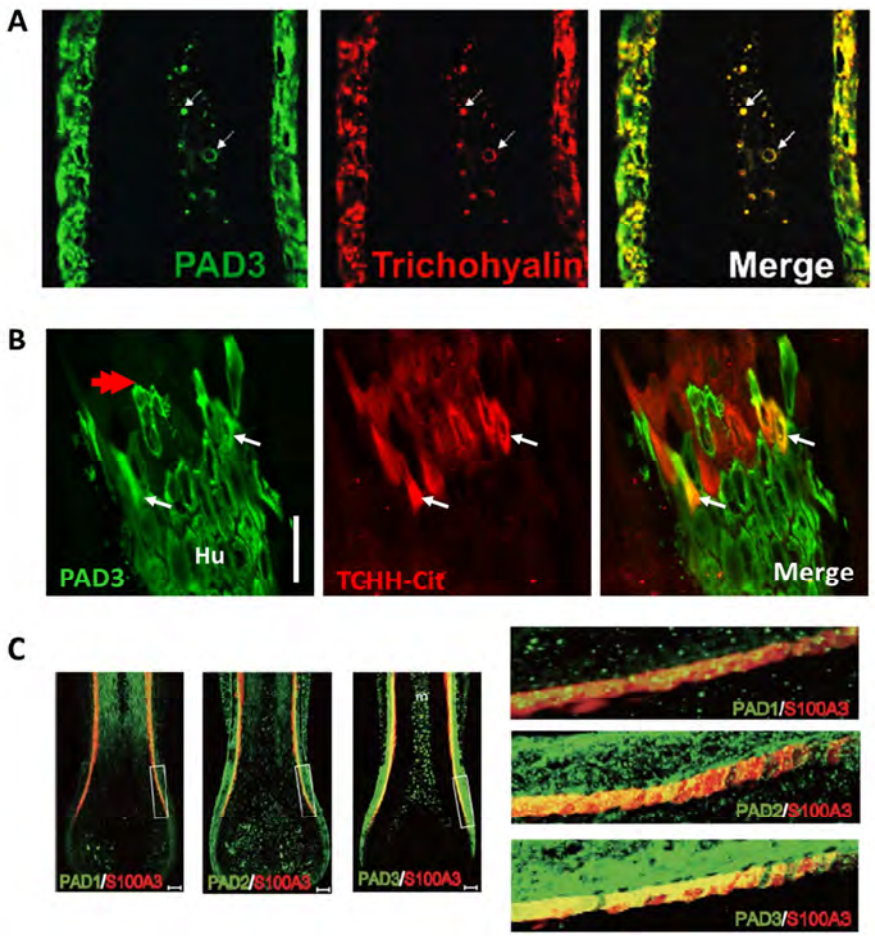


Figure 56 : Localisation des protéines désiminées dans le follicule pileux. (A-B) Double marquage de la PAD3 et de la TCHH sur cryosections de follicules pileux humains en immunofluorescence indirecte. Hu : Couche de Huxley. Barre d'échelle = 150 µm. D'après (Nachat *et al.*, 2005b ;Chanavas *et al.*, 2006). (C) Double marquages des Pads 1, 2 ou 3 et de la protéine S100A3 sur des coupes de follicules pileux humains fixés. Barre d'échelle = 50 µm. D'après (Kizawa *et al.*, 2008).

3. PADs et pathologies cutanées

Une diminution de la déimination des protéines, et en particulier de la kératine 1, a été observée dans l'épiderme de patients atteints de psoriasis (OMIM #177900) ou d'érythrodermie ichtyosiforme congénitale bulleuse (OMIM #113800) (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1992, 2000). Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique et multifactorielle, touchant en moyenne 2% de la population dans les pays occidentaux. Elle se caractérise par l'apparition par poussées de plaques érythémateuses et squameuses, un infiltrat de cellules pro-inflammatoires dans le derme et l'épiderme, et par une hyperprolifération et une altération de la différenciation des kératinocytes. L'érythrodermie ichtyosiforme congénitale bulleuse est une génodermatose autosomique rare, caractérisée par la formation de cloques et d'érythèmes à la naissance suivie du développement d'une hyperkératose s'aggravant avec l'âge. Par ailleurs, une étude préliminaire réalisée dans notre laboratoire tend à montrer une diminution du taux de protéines déiminées dans l'épiderme de patients atteints de dermatite atopique (Daunes-Marion *et al.*, 2012). Cependant le lien entre la diminution du taux de déimination épidermique et le développement de ces pathologies restent à élucider.

G. Autres implications physiologiques et pathologiques des PADs

Du fait de la très large distribution tissulaire des PADs et du nombre toujours grandissant de protéines déiminées identifiées dans divers tissus et compartiments subcellulaires, la déimination est probablement impliquée dans de très nombreux processus physiologiques. Les rôles précis de chaque isotype dans les différents tissus où elles sont exprimées ainsi que l'effet de la déimination des divers substrats identifiés restent cependant encore largement inconnus. Les fonctions de la déimination et des PADs dans quelques processus physiologiques commencent tout de même à être élucidées. Les PADs sont de plus impliquées dans divers processus pathologiques, dont un bref aperçu sera donné ici (Figure 57).

1. Rôles physiologiques des PADs

a. Homéostasie du système nerveux central

Dans le système nerveux central, la MBP est déiminée en condition normale. Cette protéine est synthétisée par les oligodendrocytes ; c'est un des composants majoritaires de la gaine de myéline, une gaine multi-lamellaire protéo-lipidique entourant la plupart des axones et facilitant le passage de l'influx nerveux. La formation et la stabilité de cette gaine résident dans l'établissement

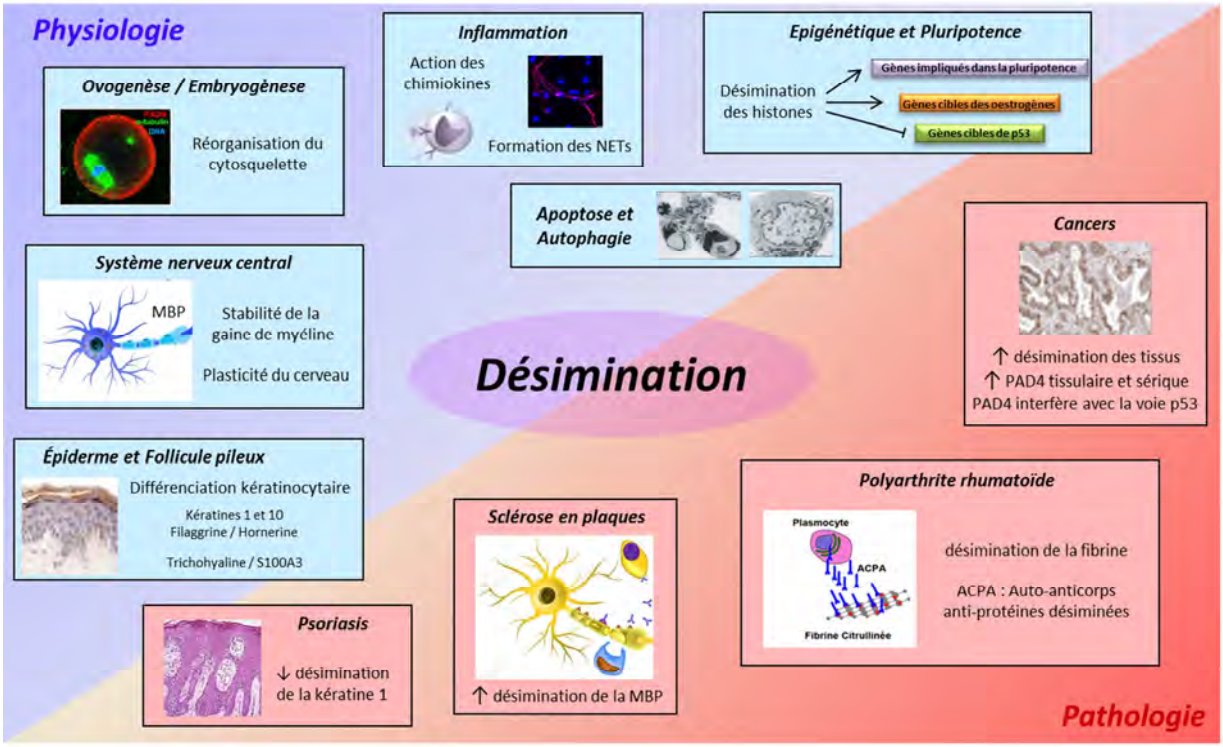


Figure 57 : Vue d'ensemble des implications physiologiques et pathologiques des PADs. Voir le texte pour détails. Adapté de (Baka *et al.*, 2012).

d'interactions entre les protéines basiques la composant, notamment la MBP, et les phospholipides chargés négativement. La MBP peut subir un certain nombre de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la méthylation ou la désimination. La PAD2 est l'isotype principalement retrouvé dans le système nerveux central mais on y détecte aussi la PAD4 (Wood *et al.*, 2008). La PAD2 est en particulier fortement exprimée par les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules microgliales. C'est donc elle qui semble principalement responsable de la désimination de la MBP. La désimination de la MBP engendre une diminution de ses interactions avec les phospholipides de la gaine. En effet, alors que la MBP non modifiée forme des gaines de myéline très compactes, la MBP désiminée semble se complexer plus rapidement aux lipides mais de manière moins ordonnée (Beniac *et al.*, 2000). De plus, la désimination de la MBP la rend plus susceptible à la protéolyse (Pritzker *et al.*, 2000). La désimination de la MBP semble donc jouer un rôle crucial dans la plasticité et l'homéostasie du système nerveux central. En accord avec cela, dans le système nerveux central des jeunes enfants (présentant une plus grande plasticité que celui de l'adulte), la quasi-totalité de la MBP est désiminée alors qu'à l'âge adulte, le taux de désimination de la MBP est d'environ 20% (Moscarello *et al.*, 1994). Les souris déficientes en Pad2 présentent une forte diminution de la désimination des protéines du cerveau, y compris de la MBP, démontrant le rôle prépondérant joué par cet isotype. De manière surprenante, ces souris ne présentent cependant pas d'anomalie majeure de développement du système nerveux central, la structure et la stabilité des gaines de myéline ne semblant pas perturbées (Raijmakers *et al.*, 2007).

La protéine fibrillaire acide des cellules gliales (GFAP pour « glial fibrillary acidic protein » en anglais) semble aussi être désiminée dans le cerveau humain en condition normale (Nicholas et Whitaker, 2002). La GFAP est une protéine faisant partie de la famille des composants des filaments intermédiaires de type III et est exprimée par les cellules gliales et les astrocytes. La désimination de cette protéine pourrait jouer un rôle dans la polymérisation/dépolymérisation de ces filaments.

De plus, la PAD3 est co-exprimée avec la PAD2 dans des cellules de Schwann humaines en culture, dans le système nerveux central fœtal humain (son expression diminuant au fur et à mesure du développement alors que celle de la PAD2 augmente), ainsi que dans des cellules souches neurales en culture (Keilhoff *et al.*, 2008 ; U *et al.*, 2014). Dans ces dernières, il semblerait que la PAD3 joue un rôle important dans la régulation de la balance entre survie et mort cellulaire par apoptose (voir paragraphe IV.G.1.d).

b. Ovogenèse et embryogenèse

La PAD6 est le seul isotype exprimé dans les ovocytes (Wright *et al.*, 2003 ; Chavanas *et al.*, 2004). Bien qu'aucune activité enzymatique de cet isotype n'ait été démontrée *in vitro*, elle semble jouer un rôle important dans la maturation de l'ovocyte et les premiers stades du développement embryonnaire. Ceci a été démontré grâce à l'étude de souris invalidées pour le gène *Padi6*. Ces souris sont viables et produisent des ovocytes qui peuvent être fécondés. Cependant, le développement embryonnaire s'arrête très précocement, au stade 2 cellules, à cause d'une désorganisation importante du cytosquelette (Esposito *et al.*, 2007).

Dans l'ovocyte et l'embryon à un stade de développement précoce, la Pad6 est localisée au niveau d'une structure du cytosquelette encore mal caractérisée, appelée « maille cytoplasmique de l'ovocyte » (ou « oocyte cytoplasmic lattices » en anglais, qui semble contenir des filaments de tubulines, de l'ARN et des ribosomes). Cette structure du cytosquelette est désorganisée dans les ovocytes des souris invalidées pour le gène *Padi6*, ce qui montre que la Pad6 est essentielle à la formation et l'accumulation de cette structure unique. De plus, il a été rapporté que l'α-tubuline s'associe à la Pad6 et que la déplétion de Pad6 altère dramatiquement la polymérisation, la stabilité et l'activité motrice des microtubules. Ainsi, la redistribution médiée par les microtubules de certaines organelles (réticulum endoplasmique et mitochondries notamment) durant la maturation de l'ovocyte est altérée en l'absence de Pad6 (Kan *et al.*, 2011).

Tout récemment, des mutations du gène *PADI6* ont été identifiées chez des femmes souffrant d'infertilité due à un arrêt précoce du développement embryonnaire (Xu *et al.*, 2016 ; Maddirevula *et al.*, 2016). Cette découverte démontre le rôle majeur de la PAD6 dans l'embryogenèse chez l'homme.

c. Régulation de l'expression génique et pluripotence

Dans le noyau, l'ADN des eucaryotes est compacté sous forme de chromatine, dont l'unité de base est le nucléosome. Il est composé d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones constitué de deux copies de H2A, H2B, H3 et H4. Cette structure est régulièrement répétée pour former le nucléofilament. Une cinquième histone, non nucléosomale, l'histone H1, interagit avec l'ADN entre les nucléosomes, et permet la formation du chromosome compacté. La compaction de la chromatine joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription et de la réplication de l'ADN. Les extrémités amino-terminales des histones accessibles à la surface du nucléosome sont les cibles de diverses modifications post-traductionnelles telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation ou encore la désimination. Celles-ci contrôlent l'état de condensation de la chromatine et régulent ainsi l'expression génique. On parle du « code des histones » ou d'épigénétique (Lacoste et Côté, 2003).

La désimination des histones joue un rôle prépondérant dans la régulation de la transcription de certains gènes. Alors que les œstrogènes activent l'expression du gène *PADI4* (voir paragraphe IV.E.1), la désimination des histones H3 et H4 par la PAD4 réprime l'expression de certains gènes cibles des œstrogènes, en s'opposant à la méthylation de ces histones. En effet, les mêmes arginines des histones peuvent être méthylées ou désiminées. Alors que les arginines désiminées des histones H3 et H4 ne peuvent pas être méthylées par la méthyltransférase CARM1, les arginines monométhylées peuvent, elles, être directement désiminées par la PAD4 (Cuthbert *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). Ces travaux, publiés par deux équipes distinctes, ont démontré pour la première fois que la méthylation des arginines (mono-méthyl-arginine) des histones est réversible, grâce à l'action de la PAD4.

Depuis, il a par exemple été montré que la PAD4 s'associe et collabore avec l'histone déacétylase 1 (HDAC1) au niveau du promoteur du gène de pS2, un suppresseur de tumeurs, exprimé par les cellules de la muqueuse gastrique, sous contrôle des œstrogènes. Ceci aboutit à une condensation de la chromatine et à la répression de la transcription du gène pS2, l'ADN polymérase II ne pouvant plus se lier au promoteur (Denis *et al.*, 2009).

La PAD2 pourrait elle aussi moduler l'expression de certains gènes en désiminant les histones. En particulier, il a été montré dans des cellules MCF-7 que l'estradiol stimule le recrutement de la PAD2 au niveau du promoteur de ses gènes cibles. La PAD2 (ne possédant pas de signal de relocalisation au noyau) serait transloquée au noyau via son interaction directe avec le récepteur aux œstrogènes ERα. Le complexe PAD2/ERα se fixe ensuite aux éléments de réponse aux œstrogènes des promoteurs des gènes cibles, et la PAD2 y désimine spécifiquement l'arginine 26 de l'histone H3. Cette modification de l'histone H3 semble alors engendrer une décondensation de la chromatine et une activation de la transcription (Zhang *et al.*, 2012).

Il semble donc que la désimination des histones engendre dans certains cas une compaction de la chromatine et dans d'autres cas une décompaction de celle-ci. Cela dépend de l'arginine (des arginines) ciblée(s) par les PADs sur les différentes histones, et donc de la PAD et/ou des cofacteurs impliqués, eux-mêmes dépendants du type cellulaire, et de la nature du stimulus déclencheur.

Plusieurs études ont aussi montré une action antagoniste de la PAD4 et de p53, un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires telles que le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore l'autophagie. Alors que p53 est capable d'activer l'expression du gène *PADI4* en se fixant à une région intronique de celui-ci, la PAD4 est recrutée sur les promoteurs de certains gènes cibles de p53 et régule leur expression. Dans diverses études menées *in vitro* dans des lignées cellulaires (U2OS, MCF-7 et HTC116 notamment), la PAD4 fonctionne comme un corépresseur de p53 en s'opposant à la méthylation des histones au niveau du promoteur de gènes cibles de p53 tels que *p21, PUMA, GADD45* et *OKL38*, ce qui réprime leur expression. Ainsi, l'activité de la PAD4 est associée à une répression de l'activité de p53, induisant une hyperprolifération de ces cellules (Yao *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été montré que la PAD4 coopère avec l'histone déacétylase 2 (HDAC2) pour réprimer l'expression des gènes *p21, PUMA* et *GADD45*. Après une lésion de l'ADN, PAD4 et HDAC2 se dissocient de leur promoteur, ce qui induit l'expression des gènes et l'entrée en apoptose. En outre, dans ces mêmes cellules, l'inhibition de l'activité de la PAD4 avec le Cl-amidine, un inhibiteur des PADs (voir paragraphe IV.H), induit une augmentation de l'expression des gènes cibles de p53 et aboutit à l'apoptose (Li *et al.*, 2010b). Ceci démontre bien le rôle primordial de l'activité de la PAD4 dans ces mécanismes complexes de mort cellulaire tel que l'apoptose. À l'inverse, dans d'autres lignées cellulaires (lymphocytes T immortalisés Jurkat et cellules leucémiques HL-60 notamment), la surexpression expérimentale de la PAD4 active la voie p53 et aboutit à une induction de l'apoptose (Liu *et al.*, 2006). Ces divergences de résultats peuvent être dues aux différences entre les types cellulaires utilisés mais aussi au fait que dans un cas c'est l'expression de la PAD4 endogène et son inhibition qui sont étudiées et dans l'autre cas c'est l'effet de la surexpression d'une PAD4 recombinante qui est analysé. Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces études montre que la désimination des histones par la PAD4 régule finement l'expression des gènes cibles de p53.

Récemment, Christophorou *et al.* ont montré que le niveau d'expression du gène *Padi4* est plus élevé dans des cellules pluripotentes, telles que les cellules souches embryonnaires (cellules ES) et des cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS), que dans des cellules multipotentes de souris, telles que les cellules souches neurales NSO4G, l'expression de *Padi4* étant fortement corrélée à celle de gènes impliqués dans la pluripotence (*Nanog, KLf2, Tcl1, Tcfap2* et *Kit*). Le traitement d'embryons au stade 8-cellules avec un inhibiteur de PADs, le Cl-amidine, entraîne à forte dose (200 µM) un arrêt complet du développement, et à faible dose (10 µM) une diminution de la

citrullination des histones (notamment de l'histone H3) ainsi qu'une diminution du nombre de cellules multipotentes. De plus, les auteurs ont montré que dans les cellules ES, les différents variants d'histone H1 sont citrullinés au niveau d'une arginine conservée et impliquée dans la liaison à l'ADN. La surexpression de la Pad4 dans les cellules neurales NSO4G ou dans des cellules différenciées induit une augmentation de la citrullination de l'histone H1 et sa dissociation de l'ADN ainsi qu'une décondensation globale de la chromatine. L'ensemble de ces résultats démontre que la Pad4 joue un rôle clé dans le maintien de la pluripotence en assurant la conservation d'une structure ouverte de la chromatine via la citrullination de l'histone H1 (Christophorou *et al.*, 2014 ; Figure 58).

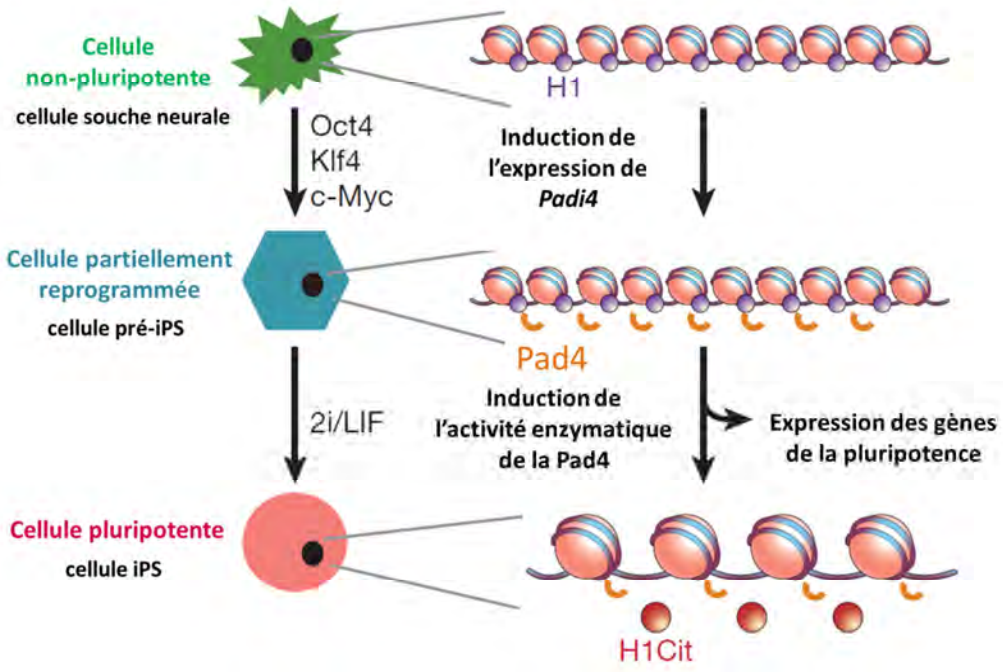


Figure 58 : Implication de la Pad4 dans le maintien de la pluripotence. Voir le texte pour détails. D'après (Christophorou *et al.*, 2014).

d. Apoptose et autophagie

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la PAD4 est impliquée dans l'induction de l'apoptose via sa capacité à réguler l'expression des gènes cibles de p53.

Par ailleurs, il a été suggéré que l'influx calcique induit lors de l'apoptose engendre une augmentation globale de la désimination au sein de la cellule (l'activité des PADs étant dépendante du calcium), ce qui faciliterait la dégradation des protéines intracellulaires. En effet, l'induction de l'apoptose dans des macrophages murins et humains en culture par un ionophore du calcium provoque la désimination de la vimentine, le composant des filaments intermédiaires des cellules mésenchymateuses, ce qui aboutit à une désorganisation du cytosquelette. La désimination de la vimentine empêche sa phosphorylation et bloque ainsi sa polymérisation. La vimentine serait en conséquence plus accessible aux protéases (Inagaki *et al.*, 1989 ; Asaga *et al.*, 1998 ; Vossenaar *et al.*,

2004). De plus, lors de l'induction de l'apoptose dans des kératinocytes de rat en culture par un ionophore du calcium, une protéine de 70 kDa localisée à la périphérie des noyaux est également déiminée. Ceci pourrait provoquer le désassemblage de la matrice nucléaire, une des étapes les plus tardives du processus apoptotique (Mizoguchi *et al.*, 1998).

La PAD3 a aussi été impliquée dans la régulation de la balance entre survie et mort cellulaire par apoptose dans les cellules souches neurales humaines. En effet, lorsque l'expression de la PAD3 est inhibée par interférence à l'ARN dans ces cellules, l'induction de l'apoptose par la thapsigargine (molécule provoquant la libération de calcium intracellulaire depuis le réticulum endoplasmique vers le cytosol) est fortement réduite. Cet effet n'est pas observé lors de l'inhibition de l'expression de la PAD2. La thapsigargine induit une augmentation de l'expression de la PAD3 (alors que l'expression de la PAD2 n'est pas modifiée) et une désorganisation du cytosquelette, probablement due à une augmentation de la citrullination de la vimentine. De plus, la thapsigargine engendre la translocation au noyau du facteur induisant l'apoptose (AIF pour « apoptosis inducing factor » en anglais, une protéine localisée au niveau de la membrane des mitochondries). Lorsque les cellules sont traitées avec le Cl-amidine en plus de la thapsigargine, le facteur AIF n'est pas transloqué au noyau et l'organisation du cytosquelette est normale. En outre, il a été montré que la PAD3 interagit directement avec le facteur AIF et que le facteur AIF est déiminé lors de l'induction de l'apoptose. Il semblerait donc que la déimination de AIF induise sa dissociation du cytosquelette, permette sa translocation au noyau et induise ainsi l'apoptose dans les cellules souches neurales humaines (U *et al.*, 2014).

Aussi, la déimination a récemment été impliquée dans la régulation de l'autophagie dans des cellules cancéreuses. L'autophagie (ou macroautophagie ; qui signifie « qui se mange soi-même »), dont les voies de régulation se recoupent largement avec celles de l'apoptose, peut à la fois constituer un mécanisme de survie cellulaire, en permettant le recyclage des protéines et organites cellulaires, ou de mort cellulaire, via la dégradation massive des organelles ; on parle dans ce cas de mort autophagique. Dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome (U2OS) et de cancer du sein (MDA-MB-231), l'inhibition de la PAD4 avec l'inhibiteur spécifique YW3-56 (voir paragraphe IV.H) induit une augmentation de l'autophagie aboutissant à une diminution de la viabilité cellulaire. Il a été montré que ce mécanisme passe par la voie p53. Le composé YW3-56 induit une augmentation de l'expression de la sestrine 2 (SESN2), une cible de p53, qui inhibe la voie mTORC1 et induit ainsi une augmentation de l'autophagie (Wang *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015). Ce composé agit en inhibant la déimination des histones au niveau du promoteur du gène *SESN2,* ce qui augmente la fixation de p53 et induit l'expression de *SESN2* (Wang *et al.*, 2012). De plus, le traitement avec YW3-56 des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 agit sur la voie de réponse au stress du réticulum endoplasmique et induit notamment une augmentation de l'expression de ATF4, lui aussi capable

d'induire l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'autophagie tel que *SESN2* (Wang et al., 2015). En opposition à cela, une autre étude a démontré qu'une surexpression de la PAD4 dans des lignées de carcinome hépatocellulaire augmente la résistance des cellules à la chimiothérapie via une induction de l'autophagie, qui protège cette fois-ci la cellule cancéreuse contre le stress dû au traitement (Fan *et al.*, 2014).

e. Formation des NETs et autres rôles dans l'inflammation

Comme l'apoptose, la formation des « pièges extracellulaires des neutrophiles » (NET pour « neutrophil extracellular trap » en anglais), ou NETose, est un phénomène induit par le calcium dans lequel la désimination semble jouer un rôle majeur. Les polynucléaires neutrophiles (ou neutrophiles), qui représentent environ 75% des globules blancs, forment la première ligne de défense contre les micro-organismes pathogènes, via la libération de protéases, la production de dérivés réactifs de l'oxygène ou la phagocytose. Récemment, une réponse immunologique unique des neutrophiles a été caractérisée : la NETose suicidaire, durant laquelle les neutrophiles meurent et libèrent leur chromatine sous forme décondensée associée à des protéines et peptides antimicrobiens (Figure 59). Cette chromatine forme une sorte de filet qui va capturer les pathogènes et induire leur mort. Il a été suggéré que ce mécanisme constitue une voie de défense alternative des neutrophiles lorsque les pathogènes sont trop gros pour être phagocytés (Masuda *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont démontré que la PAD4 joue un rôle crucial dans la formation des NETs. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induit l'activation de la PAD4 qui va engendrer une hypercitrullination des histones résultant en une décondensation spectaculaire de la chromatine (Figure 59). L'inhibition des PADs par le Cl-amidine inhibe la formation des NETs aussi bien *in vitro* dans des granulocytes HL-60 (Wang *et al.*, 2009) que *in vivo* dans divers modèles murins

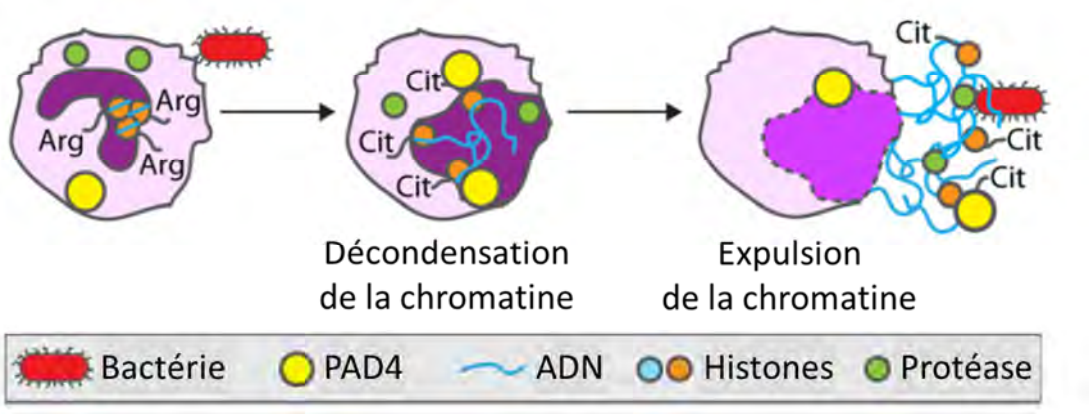


Figure 59 : Implication de la PAD4 dans la formation des NETs. Voir le texte pour détails. D'après (Slade *et al., 2014).*

comme par exemple dans un modèle de lupus érythémateux disséminé ou de septicémie (Knight *et al.*, 2013 ; Biron *et al.*, 2016). Ceci démontre que la désimination des histones est une étape clé de la NETose. De plus, des souris déficientes en PAD4 présentent un défaut de formation des NETs lors de l'infection par le streptocoque du groupe A (*Streptococcus pyogenes ;* Li *et al.*, 2010a), prouvant l'implication majeure de la PAD4 dans ce processus de défense. En outre, une étude récente suggère que la PAD2 jouerait un rôle similaire dans des macrophages isolés de tissu adipeux de la glande mammaire, où son activation induirait la formation de « pièges extracellulaires des macrophages » (MET pour « macrophage extracellular traps » en anglais) (Mohanan *et al.*, 2013).

Plusieurs chimiokines sont désiminées *in vivo* et leur désimination semble diminuer leur activité chimiotactique. Les chimiokines sont des protéines solubles capables d'attirer les leucocytes lors d'une inflammation. CXCL10 est la première cytokine dont la désimination *in vivo* a été rapportée. Il a été montré que sa désimination diminue son chimiotactisme et réduit sa capacité à fixer l'héparine (Loos *et al.*, 2008). L'interleukine 8 (IL-8 ou CXCL8) est également désiminée *in vivo*. Sa désimination semble diminuer sa capacité à attirer les neutrophiles sur le site de l'inflammation dans un modèle murin et augmenter sa capacité à induire le relargage des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang circulant (Proost *et al.*, 2008 ; Loos *et al.*, 2009). La désimination de CXCL12 inhibe également ses propriétés inflammatoires et en particulier son potentiel antiviral. En effet, il a été montré dans des cellules T leucémiques MT-4 que lorsqu'elle est désiminée, CXCL12 n'est plus capable de se fixer à son partenaire CXCR4 et donc de prévenir l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (Struyf *et al.*, 2009). Les PADs 2 et 4 étant toutes deux exprimées dans les cellules mononuclées du sang périphérique, elles sont l'une et/ou l'autre responsable(s) de la désimination de ces chimiokines. Par ailleurs, il existe un lien entre désimination des chimiokines et NETose puisque l'IL-8 active la formation des NETs dans certaines conditions de culture (Marcos *et al.*, 2010).

2. Implications des PADs en pathologies

a. Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (OMIM #180300) est une maladie auto-immune touchant 0,5 à 1 % de la population mondiale. Elle est caractérisée par une inflammation chronique des articulations synoviales qui peut aboutir à une érosion ostéo-cartilagineuse douloureuse et handicapante. Plus précisément, l'inflammation du tissu synovial de l'articulation engendre son bourgeonnement, on parle alors de panus synovial, et s'accompagne, comme toute inflammation, d'une infiltration tissulaire de cellules immunitaires.

De nombreux auto-anticorps sont présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Parmi eux, on distingue une population hautement spécifique de la maladie : les auto-anticorps anti-protéines citrullinés (ACPAs pour « anti-citrullinated proteins autoantibodies » en anglais), présents chez environ 70% des patients. Les ACPAs apparaissent très précocement dans le sérum des patients, parfois plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques, et sont actuellement utilisés pour le diagnostic de la maladie.

Les principaux auto-antigènes reconnus par les ACPAs dans l'articulation synoviale correspondent à des formes désiminées des chaînes Aα et Bβ de la fibrine. La fibrine est une protéine insoluble, impliquée dans le processus de coagulation. Elle est formée à partir du fibrinogène, glycoprotéine soluble majoritairement synthétisée par les hépatocytes et présente dans le plasma, sous l'action de la thrombine. La thrombine initie la polymérisation de la fibrine en clivant les régions amino-terminales des chaînes Aα et Bβ du fibrinogène, ce qui provoque une modification de leur charge et permet leur interaction. Les polymères de fibrine sont ensuite stabilisés par des liaisons covalentes sous l'action d'une TGase, le facteur XIIIa. Comme dans toute inflammation, un dépôt de fibrine est observé dans les articulations rhumatoïdes suite à l'extravasation de plasma au niveau du tissu enflammé. Le conflit antigène/anticorps entre le dépôt extravasculaire de fibrine désiminée et les ACPAs participe ainsi à l'auto-entretien de la maladie (Figure 60). Dans le tissu synovial rhumatoïde, les PADs 2 et 4 sont présentes et leur expression est corrélée à l'intensité de l'inflammation (Foulquier *et al.*, 2007). Elles sont donc probablement toutes deux responsables de la désimination de la fibrine. Cependant, la fibrine est désiminée lors de la cicatrisation de la peau des souris dont le gène *Padi*2 a été inactivé ; dans ce cas, la présence de Pad2 ne semble donc pas nécessaire pour que la fibrine soit correctement désiminée (Coudane *et al.*, 2011). De plus, la fibrine désiminée n'est pas spécifique de la polyarthrite rhumatoïde, puisqu'elle est présente dans de nombreuses maladies articulaires inflammatoires, contrairement aux ACPAs qui sont eux hautement spécifiques de la maladie (Chapuy-Regaud *et al.*, 2005).

Une autre classe d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde a plus récemment été décrite : il s'agit d'auto-anticorps anti-PAD4. La présence de ces auto-anticorps a de plus été associée à des formes plus sévères de la maladie (Harris *et al.*, 2008 ; Halvorsen *et al.*, 2008). En se fixant à la PAD4, ils augmenteraient sa sensibilité au calcium et donc son activité (Darrah *et al.*, 2013).

La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie multifactorielle pour laquelle plusieurs facteurs génétiques ont été impliqués. Le polymorphisme le plus fortement associé à cette maladie est celui du gène *HLA-DRB1*, codant la chaîne β de la molécule HLA-DR (Zanelli *et al.*, 2000). La molécule HLA-DR est un hétérodimère, constitué d'une chaîne α (HLA-DRA) et d'une chaîne β (HLA-DRB), enchâssé dans la membrane plasmique des cellules présentatrices d'antigènes. C'est cet hétérodimère qui interagit avec les peptides antigéniques et les présente aux lymphocytes T. De manière intéressante,

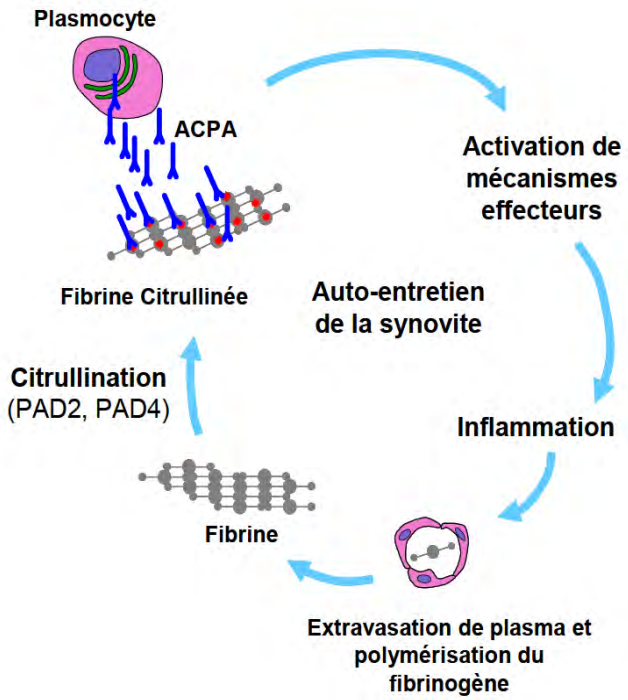


Figure 60 : Implication des PADs 2 et 4 dans l'auto-entretien de la polyarthrite rhumatoïde. Voir le texte pour détails. D'après (Foulquier *et al.*, 2007).

la protéine HLA-DR1001, codée par l'allèle de susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde *HLA-DRB1*1001*, montre une plus grande affinité pour les peptides désiminés que les autres formes d'HLA-DR, ce qui prouve encore le rôle prépondérant des auto-antigènes désiminés dans la maladie (James *et al.*, 2010).

Un autre facteur de prédisposition important est un polymorphisme spécifique (p.Arg620Trp) du gène *PTPN22* (protein phosphatase tyrosine non-receptor type 22) qui augmente encore le risque de développer la maladie chez les porteurs d'un polymorphisme HLA-DR. La protéine PTPTN22 est exprimée dans les cellules mononuclées du sang périphérique ainsi que dans les neutrophiles. Il a récemment été démontré que PTPN22 est un inhibiteur de la PAD4. PTPN22 inhibe la PAD4, indépendamment de son activité phosphatase, en interagissant avec l'enzyme. Or, lorsque le résidu arginine 620 de PTPN22 est converti en tyrosine, elle est incapable d'interagir avec la PAD4 (Chang *et al.*, 2015). Ceci suggère donc que le polymorphisme p.Arg620Trp du gène *PTPN22* augmente le risque de développer une polyarthrite rhumatoïde en induisant une désimination excessive, la PAD4 n'étant plus inhibée.

Enfin, une association entre certains haplotypes du gène *PADI4* et la polyarthrite rhumatoïde a été retrouvée dans des populations japonaises, coréennes, nord-américaines et françaises (Suzuki *et al.*, 2003 ; Ikari *et al.*, 2005 ; Plenge *et al.*, 2005 ; Kang *et al.*, 2006 ; Gandjbakhch *et al.*, 2009 ; Kochi *et al.*, 2011). Elle n'a cependant pas été retrouvée dans d'autres études réalisées sur des populations indiennes, chinoises, anglaises, françaises et espagnoles (Barton *et al.*, 2004 ; Caponi *et al.*, 2005,

Martinez *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2011). Il a été suggéré que les ARNm codés par le gène *PADI4* portant ces haplotypes pourraient être plus stables, ce qui conduirait à une augmentation de l'expression protéique de la PAD4 dans les tissus synoviaux rhumatoïdes (Suzuki *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces données suggère que les PADs et la désimination jouent un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. Cette hypothèse a été renforcée par les résultats obtenus suite à l'inhibition des Pads dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène. En effet, le traitement des souris avec le Cl-amidine entraîne une diminution de la citrullination des tissus synoviaux atteints et de la sévérité des symptômes, avec une diminution de l'inflammation, une réduction de l'épaisseur du panus synovial ainsi qu'une diminution de la destruction de l'os et du cartilage, en comparaison aux souris contrôles. En outre, cet effet est dose-dépendant (Willis *et al.*, 2011). Les PADs semblent donc constituées des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de la maladie.

b. Sclérose en plaques et autres maladies neurodégénératives

La sclérose en plaques (OMIM #126200) est la maladie auto-immune du système nerveux central la plus fréquente. Elle est caractérisée par une destruction progressive des gaines de myéline entourant les axones au sein de la substance blanche. Cette démyélinisation entraîne un déclin progressif des capacités motrices, sensitives et cognitives des patients. Bien que la cause de cette maladie ne soit pas connue, de multiples facteurs (génétiques, immunologiques ou encore environnementaux) semblent être impliqués.

Dans le cerveau des patients atteints de sclérose en plaques, une forte augmentation du taux de désimination de la MBP ainsi qu'une augmentation de l'expression et de l'activité des PADs 2 et 4 ont été rapportées. Plus de 45 % de la MBP est en effet désiminée dans le système nerveux central des patients contre 20 % chez les individus sains. Le taux de désimination de la MBP est proportionnel à la sévérité de la maladie et s'élève jusqu'à 90 % dans la forme fulgurante de Marburg.

Il a ainsi été proposé que l'hypercitrullination de la MBP joue un rôle majeur dans le développement de la maladie. Ceci a été démontré par la génération de souris transgéniques surexprimant la Pad2 sous contrôle du promoteur du gène *Mbp*. Ces souris présentent une forte augmentation de la désimination de la Mbp, accompagnée d'une importante démyélinisation des axones. La démyélinisation est proportionnelle à l'expression de Pad2 puisqu'elle est plus sévère dans le cerveau des souris homozygotes que des hétérozygotes. De plus, une augmentation du nombre d'astrocytes et de macrophages, de la quantité de cytokine pro-inflammatoire TNF-α, de l'expression de la Pad4 et de la citrullination des histones sont autant de caractéristiques de la sclérose en plaques retrouvées dans le système nerveux central de ces souris transgéniques (Musse

et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'élévation du taux de PADs dans le système nerveux central pourrait être un évènement précoce du développement de la maladie précédant la démyélinisation.

De plus, lorsque des modèles murins de sclérose en plaques (présentant tous une hyperdésimination de la MBP) sont traités avec du 2-chloroacetamidine, un autre inhibiteur de PADs, les symptômes de la maladie sont atténués (Moscarello *et al.*, 2013). Une diminution de l'infiltrat de cellules immunitaires et une remyélinisation sont observées dans le système nerveux central des souris traitées. Ceci démontre l'implication de l' hyperdésimination dans la physiopathologie de la maladie et suggère fortement que les PADs pourraient être là aussi des cibles thérapeutiques intéressantes.

Les nombreux travaux réalisés par l'équipe de Moscarello et Mastronardi leur ont permis de proposer un modèle physiopathologique de la sclérose en plaques dans lequel les PADs 2 et 4 jouent un rôle de premier plan. Dans ce modèle, une expression anormalement élevée de la PAD2 (qui pourrait être due à une hypométhylation de son promoteur) entraîne une hypercitrullination de la MBP, ce qui fragilise la gaine de myéline. De la MBP désiminée et des fragments désiminés de MBP sont alors libérés de la gaine et induisent une réponse inflammatoire. Des cellules immunitaires sont recrutées au niveau du système nerveux central et attaquent la gaine de myéline, déjà fragilisée par l'hypercitrullination, entraînant sa destruction. En parallèle, l'augmentation de TNF-α induit la translocation de la PAD4 au noyau, ce qui provoque une augmentation de la citrullination des histones. Ceci participerait à l'induction de l'apoptose des oligodendrocytes aggravant encore d'avantage la démyélinisation (Figure 61 ; Moscarello, 2014).

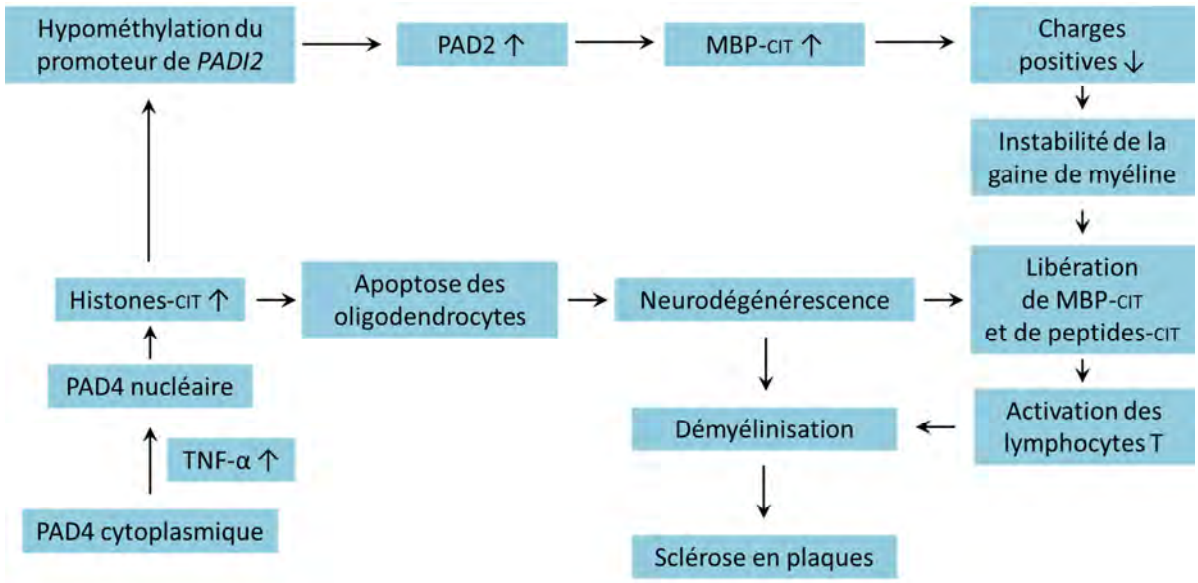


Figure 61 : Implication des PADs dans la physiopathologie de la sclérose en plaques. Voir le texte ci-dessus pour détails. D'après (Moscarello, 2014).

Les PADs et la désimination ont aussi été impliquées dans d'autres maladies neurodégénératives. Dans la maladie d'Alzheimer, par exemple, une augmentation de l'expression de la PAD2 est observée post-mortem, au niveau de l'hippocampe des patients. De plus, des protéines déiminées sont détectées dans cette même région du cerveau chez les individus atteints alors qu'il n'y en a pas dans celui des individus contrôles (Ishigami *et al.*, 2005). Deux de ces protéines déiminées ont été identifiées : il s'agit de la vimentine et de la GFAP (Ishigami et Maruyama, 2010). Il est intéressant de noter que cela concerne les astrocytes (cellules nourricières du système nerveux central), et non pas les cellules nerveuses elles-mêmes. Par ailleurs, dans les maladies à prions, une expression accrue de la PAD2 et une augmentation de la désimination ont été observées dans le système nerveux central des souris infectées par la protéine scrapie et chez des patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Les protéines hyperdéiminées correspondent ici à la MBP, la GFAP, la vimentine (protéines structurales) ainsi que l'énolase, l'aldolase et la phosphoglycérate kinase (enzymes de la glycolyse ou du cycle de Krebs ; Jang *et al.*, 2013).

Des troubles de la régulation du calcium cellulaire sont observés dans la majorité des maladies neurodégénératives. Ceux-ci pourraient expliquer l'augmentation de l'activité des PADs et donc de la quantité de protéines déiminées observée dans les pathologies décrites ci-dessus (Yang *et al.*, 2016).

c. Cancers

Des analyses immunohistologiques menées sur un large panel de tumeurs ont mis en évidence une surexpression ou une expression ectopique de la PAD4 ainsi qu'une augmentation du taux de protéines déiminées dans la majorité des tumeurs cancéreuses analysées comparativement aux tumeurs bénignes (Chang et Han, 2006). De plus, un taux sérique élevé de PAD4 ainsi que d'anti-thrombine déiminée a été trouvé chez les patients atteints de diverses tumeurs malignes, ce taux sérique diminuant considérablement après ablation chirurgicale de la tumeur (Chang *et al.*, 2009, Ordóñez *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été montré que la désimination de l'antithrombine abolit son activité inhibitrice de la thrombine, ce qui pourrait favoriser l'angiogenèse et l'invasion par les cellules tumorales (Ordóñez *et al.*, 2009).

Les modifications épigénétiques, et en particulier les modifications des histones, jouent un rôle majeur dans la tumorigenèse. En effet, l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p53 et ses cibles, est fréquemment inhibée dans les cellules cancéreuses par le biais d'enzymes catalysant des modifications épigénétiques des histones (Kandoth *et al.*, 2013). Étant donné le lien entre la PAD4 et p53 (voir paragraphe IV.G.1.c), il a été supposé que la surexpression de la PAD4 pourrait être directement impliquée dans le développement des cancers. Ceci a depuis été largement démontré via l'utilisation d'inhibiteurs de PADs, sur des lignées cancéreuses *in vitro*, et dans des modèles

murins *in vivo*. Par exemple, *in vitro* le Cl-amidine diminue la viabilité des cellules cancéreuses (HL-60, MCF-7 et HT-29) via une augmentation de l'expression de p21 alors qu'il n'a pas d'effet sur la croissance des cellules saines (NIH 3T3 par exemple) (Slack *et al.*, 2011a). *In vivo*, dans des modèles murins de xénogreffes de sarcome ou de cancer du sein, le traitement avec l'inhibiteur YW3-56 spécifique de la PAD4 induit une nette diminution de la croissance des cellules cancéreuses et une réduction significative de la taille des tumeurs (Wang et al., 2012 ; Wang *et al.*, 2015). Comme discuté plus haut, il semblerait que l'inhibition de la PAD4 induise la mort des cellules malignes via une activation de l'apoptose médiée par la voie p53 ou de l'autophagie (voir paragraphes IV.G.1.c et d). Les PADs semblent ici encore constituer de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses pour le traitement des cancers.

H. Inhibiteurs des PADs

Comme nous venons de le voir, les PADs jouent un rôle important dans diverses maladies sévères. Afin de mieux décrypter leurs implications dans ces pathologies et d'éventuellement cibler ces enzymes dans un but thérapeutique, des inhibiteurs spécifiques des PADs ont été développés. Ils ont depuis lors largement fait leur preuve comme vous venez de le lire dans la partie précédente.

Un composé, nommé Cl-amidine, ciblant initialement la PAD4 mais agissant également sur les PADs 1, 2 et 3, a ainsi été synthétisé par l'équipe de Paul Thompson en 2006 (Figure 60A ; Luo *et al.*, 2006). C'est à ce jour l'inhibiteur le mieux caractérisé et le plus couramment utilisé. Son action est irréversible, on parle parfois d'inhibiteur « suicide ». En effet, le Cl-amidine forme une liaison covalente avec les PADs en réagissant avec la cystéine du site actif (Cys645 de la PAD4), résidu indispensable à la réaction de désimination (Figure 62B). Il réagit préférentiellement avec la forme active des PADs, dont il est un inhibiteur sélectif. Il a notamment été montré que ce composé n'inhibe pas l'activité méthyl-transférase de la PMRT1 et de la PMRT4, deux enzymes méthylant les résidus arginine et ayant donc comme cible une arginine, tout comme les PADs (Luo *et al.*, 2006). *In vitro*, le Cl-amidine présente une IC_{50} (concentration nécessaire du composé pour atteindre 50 % de l'inhibition maximale d'une activité biologique donnée, mesurée ici en utilisant un substrat de référence des PADs, le BAEE) de 0,8 µM pour la PAD1 contre 5,9 µM pour la PAD4, et respectivement 17,0 µM et 16,2 µM pour les PADs 2 et 3 (Knuckley *et al.*, 2010 ; Jones *et al.*, 2012). Ceci montre donc qu'il inhibe plus efficacement les PADs 1 et 4 que les PADs 2 et 3, bien qu'il agisse sur tous ces isotypes (Figure 62C). Depuis son développement, le Cl-amidine a été utilisé dans de nombreux modèles cellulaires et murins, et les résultats obtenus démontrent sa biodisponibilité et son efficacité (pour exemples : voir paragraphes IV.G.1.c, d, e et 2.a et c). Il constitue ainsi un outil précieux pour l'étude du rôle des PADs en physiologie et en pathologie.

Un dérivé de cette molécule, le Cl4-amidine, a ensuite été développé (Figure 62A). *In vitro*, cet inhibiteur est bien plus efficace contre la PAD3 que contre les PADs 1 et 4. En effet, 12 µM de ce composé sont nécessaires pour obtenir 50 % d'inhibition de la PAD3, contre plus de 200 et 600 µM pour respectivement les PADs 1 et 4 (Figure 62C ; Knuckley *et al.*, 2010). Il est beaucoup moins couramment utilisé, notamment du fait de l'expression restreinte de la PAD3 dans le corps humain. Il a tout de même récemment permis de démontrer le rôle de la PAD3 dans la citrullination de protéines de la glande mammaire de souris durant la lactation (Li *et al.*, 2016a).

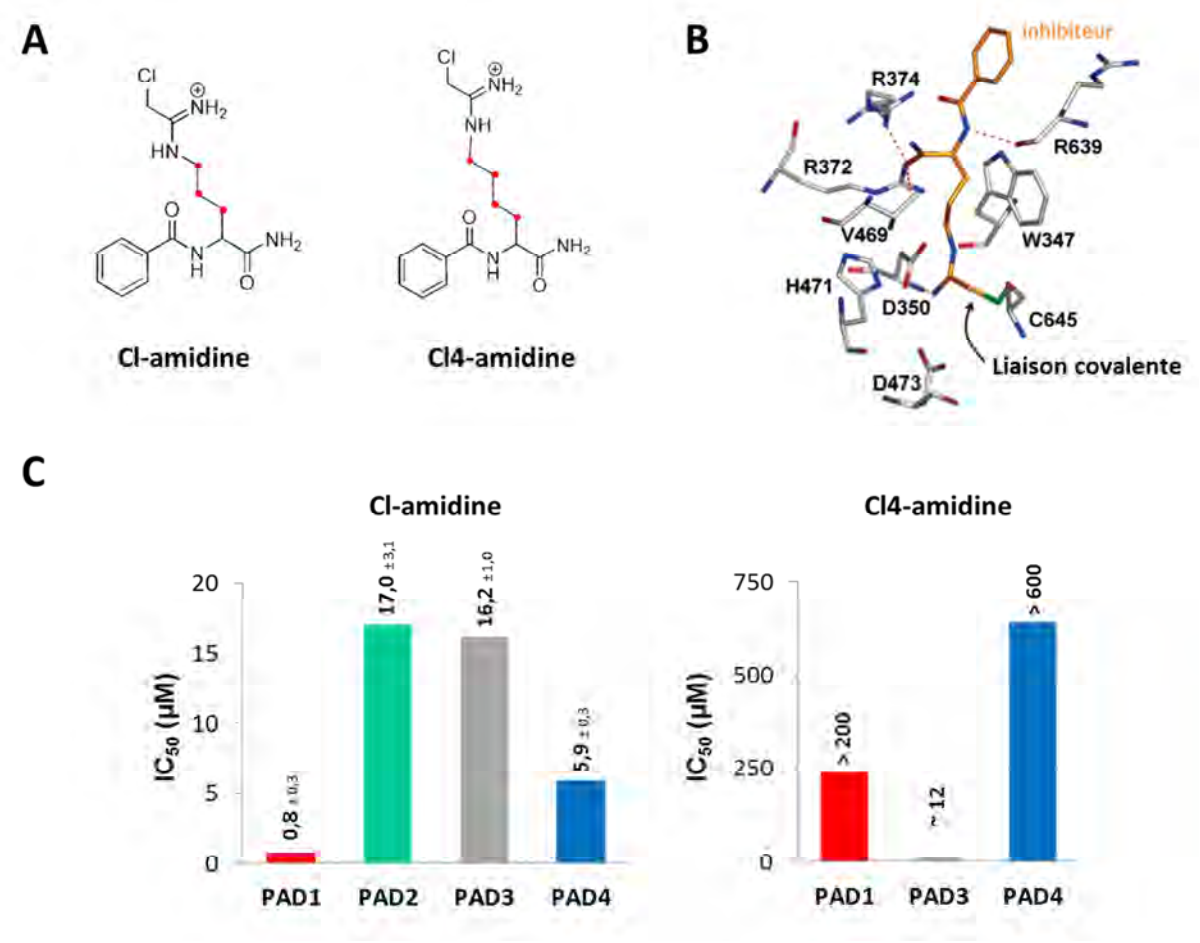


Figure 62 : Cl-amidine et Cl4-amidine, deux inhibiteurs spécifiques des PADs. (A) À gauche, le N-α-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, appelé Cl-amidine. À droite, un dérivé de ce composé : le Cl4-amidine. (B) Zoom au niveau du site actif de la structure cristallographique du complexe PAD4 – Cl-amidine. Le Cl-amidine est représenté en orange et les acides aminés du site actif de la PAD4 en gris. (C) Efficacité d'inhibition des PADs 1, 2 et 4 par le Cl-amidine et le Cl4-amidine. L'IC50 est la concentration nécessaire d'un composé pour atteindre 50 % de l'inhibition maximale du processus étudié, correspondant ici à l'activité enzymatique. D'après (Luo *et al.*, 2006 ; Knuckley *et al.*, 2010 ; Jones *et al.*, 2012).

Depuis le développement de ces inhibiteurs, des efforts sont faits par plusieurs équipes pour développer des nouveaux inhibiteurs des PADs plus efficaces dans l'objectif de pouvoir les utiliser en thérapie. Deux inhibiteurs prometteurs ont ainsi été mis au point : le composé YW3-56 et le tétrazole Cl-amidine (Figure 63). Ces deux composés sont des dérivés de Cl-amidine qui, de par leur structure chimique, sont plus hydrophobes, ce qui améliore grandement leur biodisponibilité. Ainsi, leur efficacité est fortement augmentée en comparaison à celle du Cl-amidine. Alors que l'IC_{50} du Cl-amidine pour inhiber la croissance cellulaire de la lignée cellulaire d'ostéosarcome U2OS est de 160 µM, celles du tétrazole Cl-amidine et de YW3-56 sont respectivement de 10 µM et d'environ 3 µM (Wang *et al.*, 2015 ; Subramanian *et al.*, 2015). D'autre part, le composé YW3-56 est fluorescent, ce qui fait de cet inhibiteur un outil très intéressant pour localiser les PADs actives et donc pour la compréhension de leurs fonction et régulation. Cet inhibiteur a déjà été utilisé dans quelques études et a prouvé son efficacité *in vitro* et *in vivo* pour le traitement de certains cancers (voir paragraphes IV.G.2.c et 1.d).

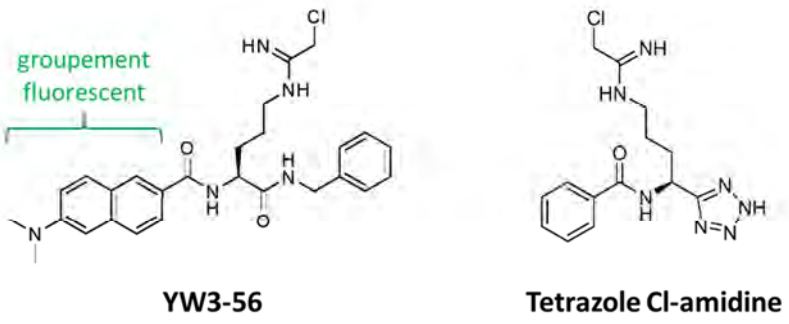


Figure 63 : YW3-56 et Tétrazole Cl-amidine, deux dérivés de Cl-amidine présentant une efficacité augmentée. Le composé YW3-56 a été synthétisé par l'équipe de Wang en 2012 (Wang *et al.*, 2012) et le tétrazole Cl-amidine a été synthétisé par l'équipe de Thompson en 2015 (Subramanian *et al.*, 2015).

Par ailleurs, un inhibiteur naturel des PADs, qui a déjà été présenté plus haut (voir paragraphe IV.E.2), a récemment été identifié. Il s'agit de la protéine PTPN22 (Chang *et al.*, 2015).

OBJECTIFS

Comme nous venons de le voir, les PADs sont impliquées dans de multiples processus physiologiques et physiopathologiques. Trois d'entre elles sont exprimées dans la peau, et des protéines désiminées sont détectées dans la couche cornée de l'épiderme et au niveau de la gaine épithéliale interne et de la médulla des follicules pileux. Leurs principales cibles cutanées connues sont la FLG, l'hornerine et la TCHH. La désimination augmente la solubilité de la FLG et de la TCHH. *In vitro*, elle favorise la protéolyse de la FLG et de l'hornerine. Une fois désiminées, l'hornerine et la TCHH sont de plus de meilleurs substrats des TGases. La description de la fonction des PADs dans l'homéostasie cutanée est cependant encore incomplète et l'implication de ces enzymes dans les maladies de peau mal connue.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était triple :

1) Préciser en quoi les PADs et la désimination sont essentielles à la régulation du métabolisme de la FLG. Pour cela, j'ai diminué le taux d'humidité du milieu extérieur lors de la production d'épidermes reconstruits humains, faisant l'hypothèse que cela entraînerait une dégradation accrue de la FLG.

2) Chercher à savoir si les PADs jouent un rôle plus large au cours de la différenciation des kératinocytes. Pour cela, j'ai analysé l'effet d'un inhibiteur spécifique des PADs, le Cl-amidine, sur les épidermes reconstruits.

3) Démontrer que les mutations récemment identifiées du gène *PADI3* sont responsables du syndrome des cheveux incoiffables.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE N°1

La protéolyse de la filaggrine humaine est contrôlée, via sa désimination, par le taux d'humidité ambiante

Laura Cau, Valérie Pendaries, Emeline Lhuillier, Paul R Thompson, Guy Serre, Hidenari Takahara, Marie-Claire Méchin et Michel Simon

Soumis pour publication

Résumé :

La filaggrine (FLG), qui joue un rôle central dans la physiopathologie de la dermatite atopique, est une protéine clé de la différenciation épidermique. Elle facilite l'agrégation des filaments intermédiaires de kératines et est incorporée à l'enveloppe cornée. Après sa désimination par les peptidyl-arginine désiminases (PADs), la FLG est totalement protéolysée, ce qui aboutit à la libération d'acides aminés libres qui contribuent, directement ou après leur modification, au facteur naturel d'hydratation (FNH). Les mécanismes moléculaires contrôlant le catabolisme de la FLG ne sont pas connus. Il a cependant été montré que ce processus est modulé par le taux d'humidité ambiante dans l'épiderme des rongeurs. Afin de savoir si le taux d'humidité ambiante influence aussi la protéolyse de la FLG dans l'épiderme humain et de décrypter les mécanismes enzymatiques associés à cette régulation, des épidermes reconstruits humains (ERHs) ont été produits, à partir de kératinocytes primaires, en atmosphère humide (humidité relative > 95%) ou sèche (humidité relative comprise entre 30 et 50%). Les ERHs produits en atmosphère sèche présentent une hyperkératose et une augmentation de la quantité de granules de kératohyaline. La quantité d'acide pyrrolidone carboxylique et d'acide trans-urocanique, deux composants du FNH dérivés de la FLG, est nettement augmentée alors que moins de monomères de FLG sont détectés. La dégradation de la FLG est donc accrue en condition sèche. En outre, l'expression de la PAD1 et le taux de désimination de la FLG sont fortement augmentés en condition sèche alors que ni l'expression ni l'activité des protéases impliquées dans la protéolyse de la FLG ne varient. De plus, le traitement des ERHs avec un inhibiteur des PADs, le Cl-amidine, bloque en partie l'effet de la sécheresse sur la protéolyse de la FLG. Ces résultats ont permis de mettre en évidence la capacité intrinsèque des kératinocytes humains à s'adapter à un environnement sec. Ils démontrent de plus que le taux d'humidité ambiante contrôle la protéolyse de la FLG humaine et que la désimination joue un rôle majeur dans cette régulation.

Changes in relative humidity drive human filaggrin breakdown through deimination

Laura Cau[a], Valérie Pendaries[b,e], Emeline Lhuillier[a,b], Paul R Thompson[c], Guy Serre[a], Hidenari Takahara[d] , Marie-Claire Méchin[a,f], Michel Simon[a,f,*]

[a] UDEAR, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Université de Toulouse Midi-Pyrénées, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France

[b] Plateau de Génomique GeT-Purpan, Genotoul, Toulouse, France

[c] Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA

[d] Department of Applied Biological Resource Sciences, School of Agriculture, University of Ibaraki, Ibaraki, Japan

[e] Present address: Synelvia, Prologue Biotech, 31670 Labège, France

[f] These authors contributed equally to the manuscript.

* **Corresponding author at:** UDEAR, INSERM-UPS, U1056, CHU Purpan, Place du Dr Baylac TSA40031, 31059 Toulouse cedex 9, France. Fax: +33 56149 9036

E-mail address: michel.simon@inserm.fr (M. Simon)

Keywords: atopic dermatitis, citrullination, skin, barrier function, posttranslational modification, peptidylarginine deiminase, proteolysis, humidity, moisturizing factor

Abbreviations: AD, atopic dermatitis; NMF, natural moisturizing factor; PAD, peptidyl-arginine deiminase; PCA, pyrrolidone-5-carboxylic acid; RH, relative humidity; RHE, reconstructed human epidermis; TEWL, transepidermal water loss; UCA, urocanic acid.

ABSTRACT

Background: Filaggrin plays a central role in atopic dermatitis and is a key protein for the epidermal barrier. It aggregates keratins and is cross-linked to cornified envelopes. Following its deimination by peptidyl-arginine deiminases (PADs), it is totally degraded to release free amino acids, contributing to the natural moisturizing factor (NMF). The mechanisms controlling this multistep catabolism in human are unknown.

Objective: To test whether external humidity plays a role, and investigate the molecular mechanisms involved.

Methods: Specimens of reconstructed human epidermis (RHEs) produced in humid or dry conditions (>95% or 30-50% relative humidity) were compared.

Results: RHEs produced in the dry condition presented structural changes, including a thicker *stratum corneum* and a larger amount of keratohyalin granules. The quantity of NMF was greater, and filaggrin proteolysis was up-regulated. Accordingly, the transepidermal water loss and the *stratum corneum* pH were decreased. The expression/activity of the proteases involved in filaggrin breakdown did not increase while PAD1 expression and the deimination rate of proteins, including filaggrin, were enhanced. Partial inhibition of PADs with Cl-amidine reversed the effect of dryness on filaggrin breakdown.

Conclusions: These results demonstrate the importance of external humidity in the control of human filaggrin proteolysis, and suggest that deimination plays a major role in this regulation.

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD; OMIM #603165) is a chronic inflammatory skin disease affecting up to 20% of children and around 3% of adults in industrialized countries. The pathophysiology of AD involves genetic and environmental factors. Most of the susceptibility genes encode proteins involved in the immune response and epidermal barrier formation [1–3]. Loss-of-function mutations in the gene *FLG* encoding filaggrin are the strongest known risk factor for AD [4–6]. *FLG* mutations appear to define a subgroup of AD patients with more severe clinical signs, such as reduced skin hydration, increased transepidermal water loss (TEWL), reduced levels of components of the natural moisturizing factor (NMF) and higher skin surface pH [7–10]. Moreover, filaggrin down-regulation has been reported in adult patients regardless of *FLG* mutations status, its expression being influenced by inflammatory cytokines [11–13]. Therefore, filaggrin deficiency appears to have a central place in AD pathogenesis.

Human filaggrin is an essential epidermal protein synthesized as a large precursor (400 kDa) named profilaggrin and stored in keratohyalin granules. Profilaggrin consists of a large central

repetitive domain comprising 10-12 filaggrin repeats, flanked by two single N- and C-terminal domains. During the *stratum granulosum* to *stratum corneum* transition, profilaggrin is proteolytically processed to release basic filaggrin monomers (~37 kDa). These monomers associate with keratin filaments and facilitate their aggregation leading to the corneocyte matrix formation [14]. In addition, some monomers are cross-linked to the cornified envelope by transglutaminases [15]. In the lower *stratum corneum*, filaggrin is deiminated by peptidyl-arginine deiminases 1 and/or 3 (PAD1 and PAD3). This post-translational modification (transformation of arginyl residues into citrullyl) induces a decrease in the number of filaggrin positive charge leading to filaggrin acidification, and thus promotes its detachment from the keratin filaments. Subsequently, filaggrin is fully proteolyzed into free amino acids [16–18]. Filaggrin degradation is accomplished by bleomycin hydrolase, caspase 14, calpain 1 [19–22] and probably other proteases. Some of the amino acids generated are further modified. In particular, glutamine spontaneously transforms into pyrrolidone-5-carboxylic acid (PCA), a highly hygroscopic molecule, and histidine is modified by histidase to form trans-urocanic acid (UCA), a major UVB-absorbing chromophore [23–25]. The amino acids and their derivatives produced from filaggrin degradation participate in the formation of the NMF, and contribute to skin photoprotection and to *stratum corneum* hydration and acidification (reviewed in [26]). The acidic pH of the *stratum corneum* in turn prevents skin colonization by pathogenic microorganisms, is important for the activity of enzymes involved in lipid synthesis and controls desquamation [27, 28].

Despite the importance of filaggrin in both epidermal homeostasis and AD pathogenesis, the molecular mechanisms controlling its degradation are still not well understood. In rodents, the proteolysis of filaggrin appears to be modulated by environmental humidity [29]. To know whether the humidity controls filaggrin breakdown in humans and to investigate the mechanisms involved, specimens of tridimensional reconstructed human epidermis (RHEs) were produced under either >95% relative humidity (RH) (humid condition) or 30-50% RH (dry condition). We compared the *stratum corneum* morphology and functional properties. Then we focused on filaggrin and on the expression/activity of the enzymes involved in its metabolism.

2. Materials and methods

2.1. RHE production in humid and dry conditions

Primary normal human keratinocytes were isolated after abdominal dermolipectomy of four healthy female (34-48 years old) subjects who had given their informed consent. Four keratinocyte banks were thus constituted. *FLG* was sequenced using next-generation deep sequencing, and no loss-of-function mutations were observed. RHEs were produced as previously described [30, 31],

except that after exposure to the air–liquid interface they were cultivated in either humid (>95% RH) or dry (30-50% RH) conditions at 37°C and 5% CO2. Low humidity was induced by removal of the water pan from the incubator. Humidity rate was continuously monitored using the 176H1 data logger (Testo, Lenzkirch, Germany). To avoid water condensation, RHEs produced in the dry condition were cultivated without culture plate covers which were replaced by gas-permeable films (Breathe-Easy; Diversified Biotech, Dedham, MA). When RHEs were maintained in the dry condition, the culture medium was renewed each day to avoid changes in osmolarity since a higher medium evaporation occurred. The medium was renewed every 2 days in the humid condition. RHEs were harvested 10 days after air-liquid interface exposure.

2.2. Transmission electron microscopy analysis

RHEs, produced with keratinocytes from 3 different donors, were processed as previously described [32] and observed with an HT7700 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan). Quantifications were performed using 2 RHEs/condition/donor. The numbers of corneocyte layers and of granular and living keratinocyte layers were quantified on 3 independent areas for each epidermis (2500x and 300x magnification pictures, respectively). The density of keratohyalin granules (area of granules/total area of cytoplasm) and their mean size were measured for each epidermis on 6 pictures (2500x) of the *stratum granulosum* just behind the *stratum corneum*, using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Briefly, for all pictures, positive areas were picked using the “wand tool” with an 8-connected mode and a fixed tolerance.

2.3. Transepidermal water loss measurement

Transepidermal water loss (TEWL) of RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (3 RHEs/condition/donor) was measured using the tewameter TM300 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany). For further information see Supplementary Methods.

2.4. Protein extractions

Different protein extracts were produced: (i) total proteins were extracted in Laemmli buffer 5X [175 mM Tris-HCl pH 6.8, 7.5% SDS, 25% glycerol, 12.5% β-mercaptoethanol, and 0.4% bromophenol blue] (2 pooled RHEs/condition/donor; 4 different donors), (ii) TE-NP40 soluble proteins were extracted in TE-NP40 buffer [40 mM Tris–HCl pH 7.5, 0.5% Nonidet-P40, 10 mM EDTA, 0.25 mM PMSF, 1/100 (v/v) mammalian protease inhibitor cocktail] (3 pooled RHEs/condition/donor; 3 donors), and (iii) deiminated filaggrin-enriched extracts (3 pooled RHEs/condition/donor; 3 donors) were prepared as previously described [33]. Briefly, TE-NP40 extracts were precipitated with absolute ethanol. After centrifugation, pellets were dried at 80°C for 20 min and resuspended in water. After homogenization, all extracts were cleared by centrifugation for 15 min at 15,000 rpm.

2.5. Quantification of UCA and PCA

At day 10, RHEs were homogenized in PBS-Triton X100 0.1%, and UCA and PCA were analyzed by HPLC on a C18 reverse-phase column (3 RHEs/condition/donor; 3 different donors). Their amount was expressed in µg/mg of proteins.

2.6. pH measurement

As recommended by the manufacturer's instructions, 2 µL of ultra-pure water was topically applied to RHEs (3 RHEs/condition/donor; 3 different donors) and surface pH was measured using the HI-99181a skin pH meter (HANNA instruments, Woonsocket, RI).

2.7. *In situ* transglutaminase activity assay

In situ transglutaminase assay was performed as described previously [34, 35]. For further information see Supplementary Methods. For each RHE, the area of fluorescence was measured on 3 images with ImageJ software using a fixed threshold and mean ± standard deviation was calculated.

2.8. PAD inhibition

To inhibit PAD activity, Cl-amidine [36] was added into the culture medium to reach a concentration of 800 µM, at day 9 of the culture period. Each RHE specimen was harvested at day 10.

2.9. Statistical analysis

All data are presented as mean ± standard deviation. Statistical differences were determined with bilateral paired Student's t-tests for paired samples. For unpaired samples, we used unpaired Student's t-tests if the equality of sample variances was verified by the Fisher's test with an α-risk of 0.05, and Welch's t-tests if not. Differences were considered significant when the p-value (p) was less than 0.05.

3. Results

3.1. Low environmental humidity induces *stratum corneum* thickening and improves barrier function in RHEs

Primary keratinocytes from normal human skin were used to produce RHEs as described in details in the methods' section. As a prerequisite, DNA was extracted from keratinocytes, and *FLG* gene was sequenced. No loss-of-function mutations were detected (data not shown). RHEs were produced in either humid (> 95% RH) or dry (30-50% RH) conditions for 10 days after air-liquid interface exposure. We first verified that the dry condition did not alter cell viability (Supplementary Fig. S1a). The morphological consequences of humidity lowering were then analyzed by hematoxylin-eosin staining and transmission electron microscopy. RHEs produced in the dry condition (dry RHEs) showed a thicker *stratum corneum* than RHEs cultivated in a humid environment (humid RHEs) (Fig. 1a and b),

with a 1.8 fold increase in the number of corneocyte layers (Supplementary Fig. S2a). They presented a 1.5 fold thicker *stratum granulosum* while the thickness of total living keratinocyte layers was not modified. The density and size of keratohyalin granules were increased by factors of 1.6 and 1.8, respectively (Supplementary Fig. S2).

To investigate the effect of the dry environment on the *stratum corneum* permeability, two complementary tests were performed: a lucifer yellow assay to evaluate the outside-in permeability and the TEWL measurement to assess the inside-out barrier. No differences in the penetration of the fluorescent dye were observed between RHEs produced in humid and dry conditions, a negligible quantity being detected in the medium whatever the culture conditions (Supplementary Fig. S1b). However, dry RHEs showed a decreased TEWL (7.7 g H2O/hxm² vs 12.3 for humid RHEs; Fig. 1c).

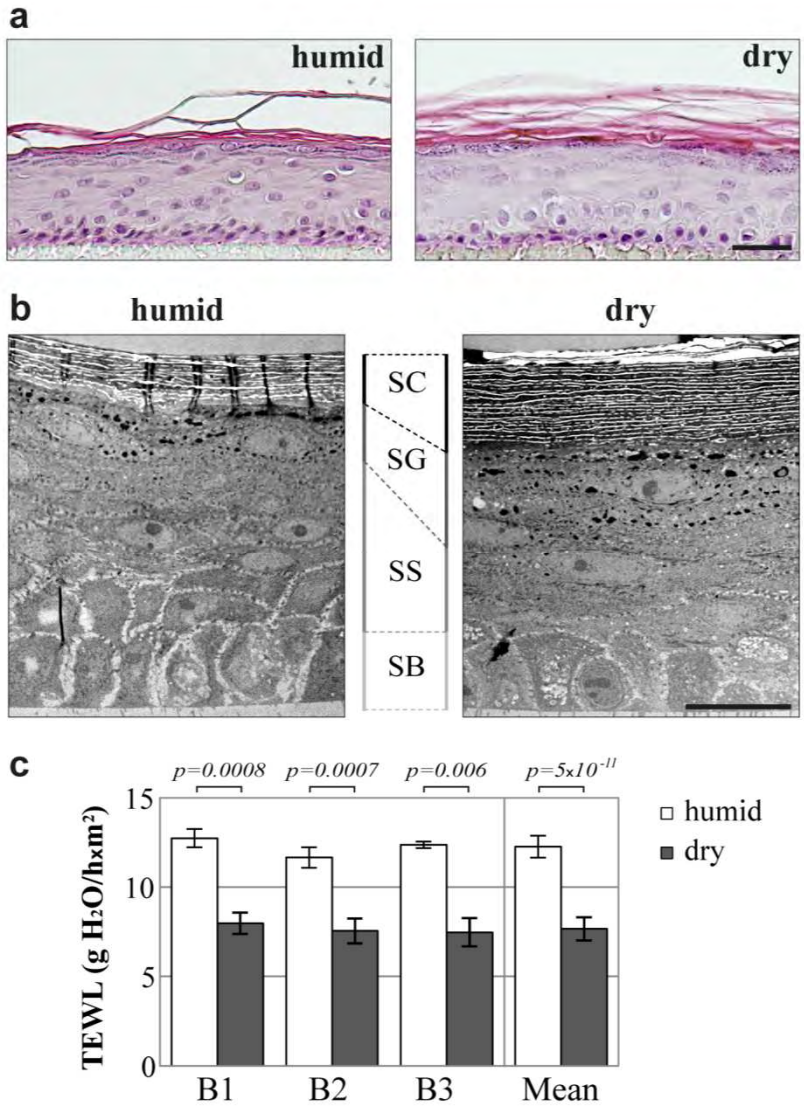


Fig. 1. Thicker *stratum corneum* and reduced transepidermal water loss in dry RHEs. (a and b) Hematoxylin-eosin staining (a) and transmission electron micrographs (b) of humid and dry RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors, only one being illustrated. (c) Transepidermal water loss (TEWL) measured for humid and dry RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3). Scale bars = 20 µm. *SC: stratum corneum, SG: stratum granulosum, SS: stratum spinosum, SB: stratum basale*.

3.2. Low environmental humidity modulates keratinocyte differentiation in RHEs

To compare keratinocyte proliferation in RHEs, Ki67 labelling was performed. The number of Ki67 positive nuclei detected in the basal layer was similar in both culture conditions (Supplementary Fig. S1c). Moreover, keratin 14 expression, analyzed by RT-qPCR (Supplementary Fig. S3a) and western blotting (Fig. 2a), was not modified. Thus, keratinocyte proliferation was not changed by environmental humidity variations.

The expression of various differentiation markers was then analyzed. At the mRNA level (Supplementary Fig. S3a), no significant differences were observed in the expression of keratin 10, loricrin or transglutaminases, except a ~2 fold increase of transglutaminase 5. A significant increase was also noted for corneodesmosin and involucrin. At the protein level (Fig. 2a and b), detections of keratin 10 and transglutaminases 1 and 3 were not modified, but changes were observed for the others. In dry RHEs, higher amounts of involucrin (1.60 ± 0.12 arbitrary units vs 1.00 in humid RHEs; n = 3; p = 0.013), of transglutaminase 5 active form at 53 kDa (2.16 ± 0.42; n = 4; p = 0.011) and of fragments (≤ 40 kDa) of corneodesmosin (1.67 ± 0.22; n = 4; p = 0.009) were detected, whereas the detection of loricrin was significantly decreased (0.45 ± 0.10; n = 3; p = 0.012). Transglutaminase activity was compared by an *in situ* enzymatic assay (Fig. 2c). The fluorescent signal resulting from the crosslink of Alexa-Fluor-555–cadaverine at the cell periphery in the *stratum granulosum* was of

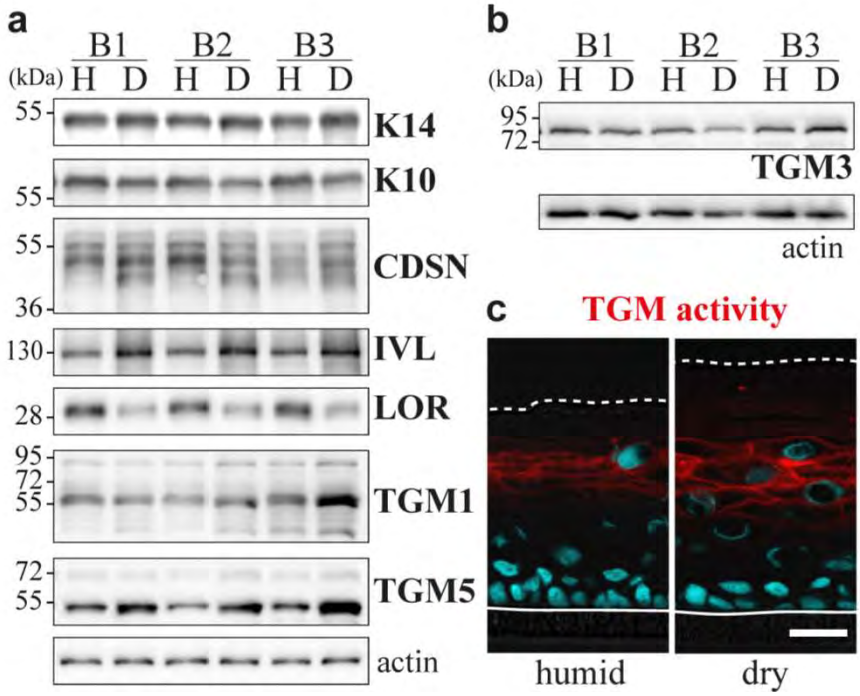


Fig. 2. Modulation of the expression of differentiation markers in dry RHEs. (a and b) Expression of actin (loading control), keratin14 (K14) and various differentiation markers analyzed by western blotting of either total (a) or TE-NP40 extracted (b) proteins of humid (H) and dry (D) RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3). K10: keratin 10, CDSN: corneodesmosin, IVL: involucrin, LOR: loricrin. (c) *In situ* transglutaminase (TGM) activity assay performed on cryosections of humid and dry RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors, only one being illustrated. Scale bar = 20 µm.

similar intensity whatever the condition but more cell layers were labelled in dry RHEs, the area of detection increasing 1.80 ± 0.53 fold (p = 0.001).

3.3. Low environmental humidity stimulates filaggrin breakdown and increases the production of UCA and PCA

To explore the impact of environmental dryness on filaggrin metabolism, its expression was studied by RT-qPCR, western blotting and indirect immunofluorescence. At the mRNA level, FLG expression was increased in the dry condition (1.58 ± 0.38 fold; n = 6; p = 0.02) (Supplementary Fig. S3b). Profilaggrin immunodetection tended to increase in dry RHEs (1.43 ± 0.30 fold; n = 4; p = 0.06) whereas that of filaggrin monomers significantly decreased (0.64 ± 0.06 fold; n = 4; p = 0.006) (Fig. 3a). Furthermore, labelling patterns obtained by indirect immunofluorescence were different (Fig.

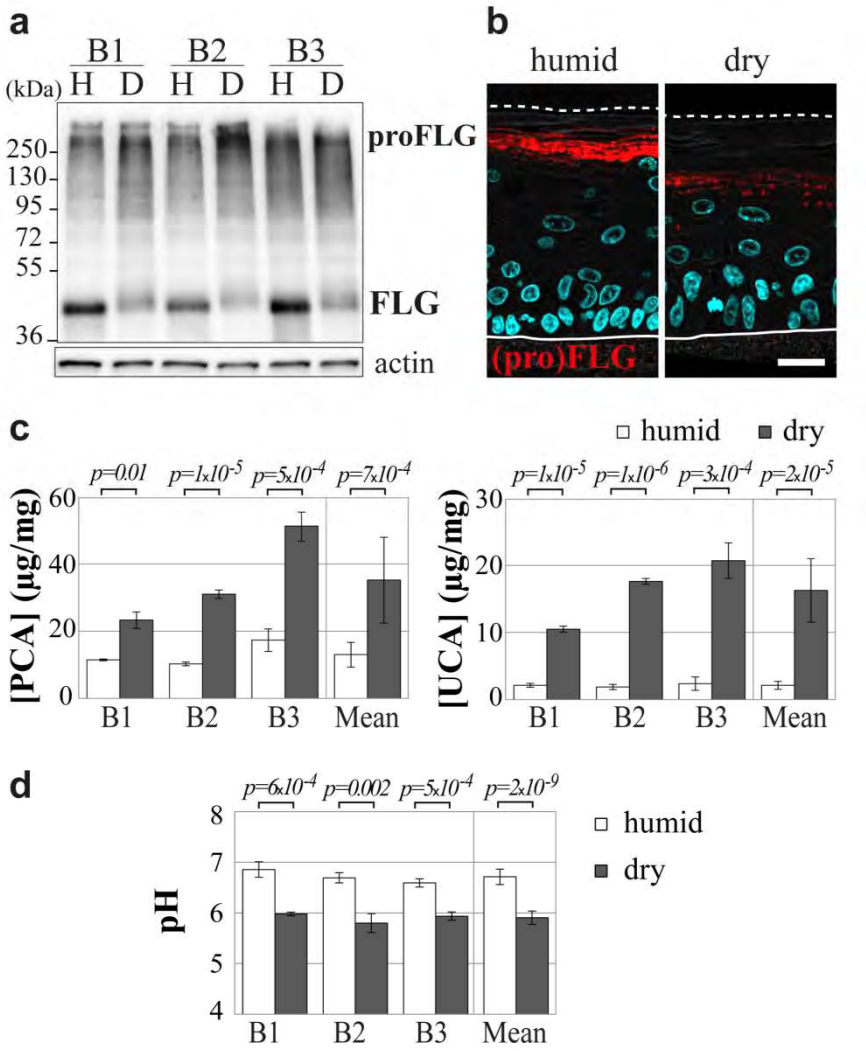


Fig. 3. Increased filaggrin breakdown in dry RHEs. (a and b) Humid (H) and dry (D) RHEs were produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3) and analyzed. Immunodetection of profilaggrin (proFLG) and filaggrin (FLG) in total protein extracts (a) and on fixed-tissue sections (b). Scale bar = 20 µm. (c) Amounts of pyrrolidone carboxylic acid (PCA) and urocanic acid (UCA) in RHE lysates are expressed in µg/mg of proteins. (d) Surface pH.

3b). In humid RHEs, a granular labelling of the granular keratinocytes – corresponding to profilaggrin stored in the keratohyalin granules – and a diffuse intense staining of the lower *stratum corneum* – corresponding to filaggrin monomers – were observed. In dry RHEs, the *stratum granulosum* staining clearly increased while the *stratum corneum* labelling decreased drastically.

To test our hypothesis that the decreased detection of filaggrin in the dry condition was due to an increase of its degradation, PCA and UCA contents were analyzed (Fig. 3c). The concentrations of both amino acid derivatives were significantly enhanced in the dry condition (2.7 and 7.6 fold, respectively). NMF being known to partly acidify the *stratum corneum*, the pH of RHE surface was measured. The dry condition induced a statistically significant lowering of pH from 6.7 to 5.9 (Fig. 3d).

3.4. In dry RHEs, peptidyl-arginine deiminase expression and activity were increased but those of proteases involved in filaggrin breakdown were not

In order to further understand the molecular mechanisms involved in the increase of filaggrin breakdown under dry vs humid conditions, the expression of three proteases known to target filaggrin monomers was compared. RT-qPCR revealed no differences in their mRNA amounts (Supplementary Fig. S3c). Western blotting showed an unexpected decreased expression of bleomycin hydrolase in dry RHEs (0.50 ± 0.07 versus 1.00) whereas calpain 1 and caspase 14 (both the zymogen (~28 kDa) and active (~17 kDa) forms) expression was similar (Fig. 4a). An *in vitro* assay performed on RHE extracts showed that calpain activity was not different between dry and humid conditions (Fig. 4b). We also assessed the expression of other proteases proposed to be implicated in the control of filaggrin proteolysis, namely kallikrein 5, skin aspartic protease, matriptase and elastase 2 [37–40]. At the mRNA level, no significant variation of their expression was measured. However, the amounts of skin aspartic protease, matriptase and elastase 2 detected by western blotting were divided by two in dry RHEs whereas that of kallikrein 5 was not modified (Supplementary Fig. S4). Finally, when analyzing the expression of histidase (responsible for UCA production), we detected three different variants of the enzyme but no differences in their expression (Supplementary Fig. S5).

Since no protease overexpression seemed to explain the increased filaggrin degradation in the dry condition, we looked for the expression of PADs. *PADI4* and *PADI6* transcripts were not detected in RHEs by RT-qPCR, as was to be expected since they are not expressed in human epidermis. Unlike human epidermis, RHEs showed no *PADI2* expression under the experimental conditions used [41–43]. *PADI1* mRNA level was strongly increased (13.06 fold) in dry RHEs whereas *PADI3* level was not changed (Fig. 4c). The increased expression of PAD1 was also significant at the protein level (3.89 ± 1.38 fold; n = 4; p = 0.025; Fig. 4d). The protein deimination rate was analyzed using the anti-

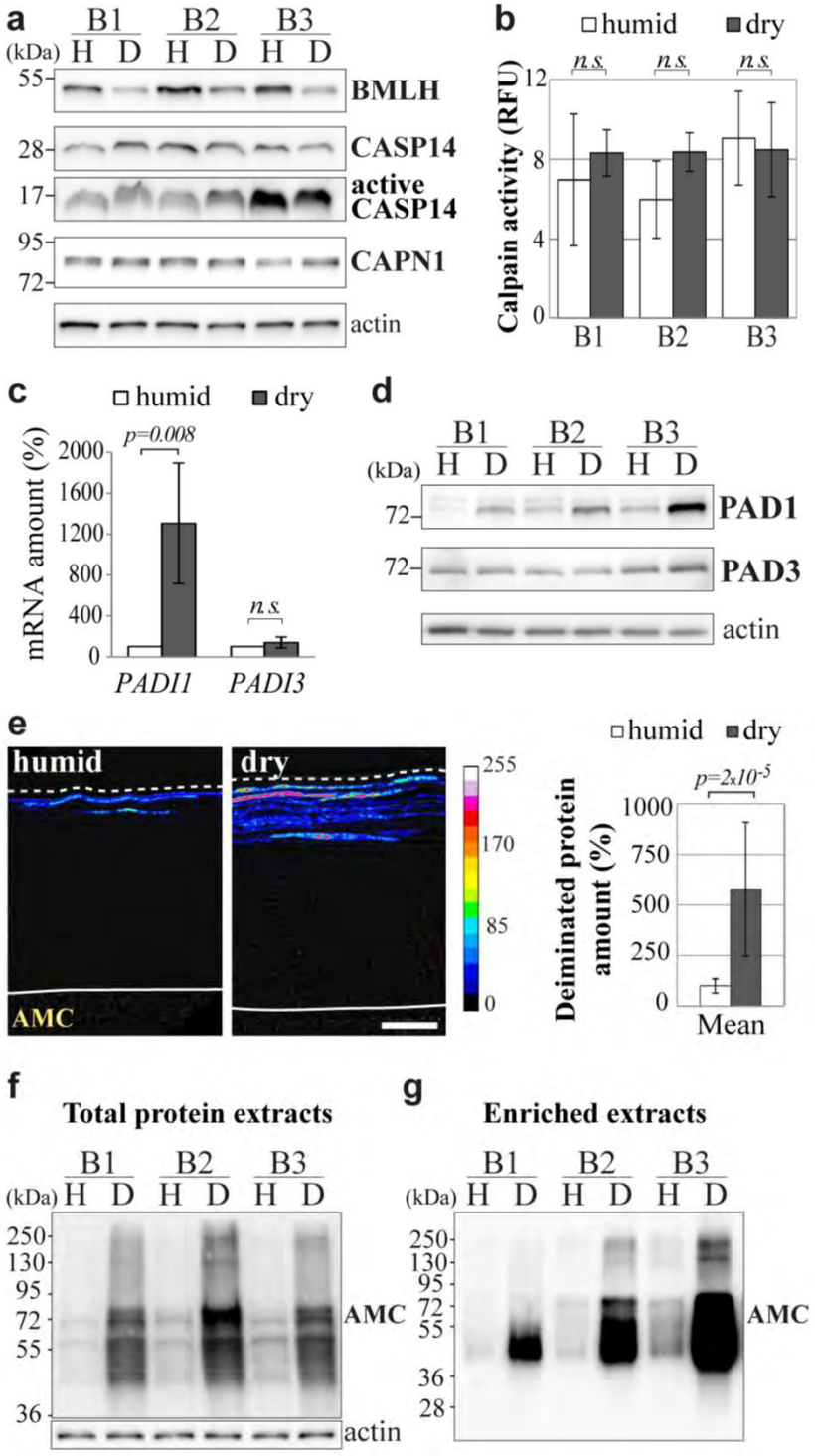


Fig. 4. Increased filaggrin deimination and peptidyl-arginine deiminase expression in the dry condition. (a) Expression of bleomycin hydrolase (BLMH), procaspase-14 (CASP14), active caspase-14 and calpain-1 (CAPN1) analyzed by western blotting of total proteins of humid (H) and dry (D) RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3). (b) Calpain activity measured in lysates of humid and dry RHEs. Results are expressed as relative fluorescence unit (RFU). n.s. = non-significant. (c) Expression of *PADI* genes analyzed by RT-qPCR (4 different donors). (d) Expression of actin, PAD1 and PAD3 analyzed by western blotting of TE-NP40 extract of the RHEs. (e) Immunodetection of deiminated proteins with AMC antibody on sections of RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors. A representative result is shown on the left. Quantification of the signal intensities is shown on the right. Scale bar = 20 µm. (f and g) Equal amounts of total proteins (f) and equal volumes of deiminated filaggrin-enriched extracts (g) were immunodetected with AMC. Note that deiminated filaggrin migrates in the form of a smear between 40 to 72 kDa (fully deiminated), as previously described [43].

modified citrulline antibody (AMC), as previously described [43, 44], and was shown to be increased in dry RHEs, both by indirect immunofluorescence (5.46 fold; Fig. 4e) and by western blotting (7.68 ± 3.95 fold; n = 4; p = 0.043; Fig. 4f). To study the deimination of filaggrin more specifically, extracts enriched in the neutral to acidic low-salt soluble forms of the protein (essentially the deiminated forms), were prepared from dry and humid RHEs, as previously described for human epidermis [33]. Protein staining confirmed the high degree of filaggrin purity (data not shown). Western blotting with AMC antibody of an equal volume of each extract indicated that filaggrin deimination was increased by a factor of 13.4 ± 4.9 in the dry condition (n = 3; p = 0.048; Fig. 4g).

Altogether, these results suggest that filaggrin deimination rate may control its terminal breakdown.

3.5. Deimination is involved in the regulation of filaggrin proteolysis

To test the above hypothesis and try to reverse the effect of dryness on filaggrin deimination and degradation, dry RHEs were treated with Cl-amidine, a specific pan PAD inhibitor [36, 45], for 24 hours before their harvest at day 10. Cl-amidine treatment induced a slight decrease of global deimination assessed by western blotting of total proteins with AMC (data not shown). This is not surprising because stable deiminated proteins such as keratins had probably accumulated in the stratum corneum for several days, deimination being an irreversible post-translational modification. However, the effect on filaggrin was evident as shown by western blotting of the deiminated filaggrin-enriched extracts (0.07 ± 0.04 vs 1.00 arbitrary units; n = 3; p = 0.0006; Fig. 5a). In turn, the amount of filaggrin monomers in the total protein extracts tended to increase (1.25 ± 0.44 fold; n = 3; p = 0.4) and to return to the level observed in humid RHEs, as shown by blotting with AHF3 (Fig. 5b).

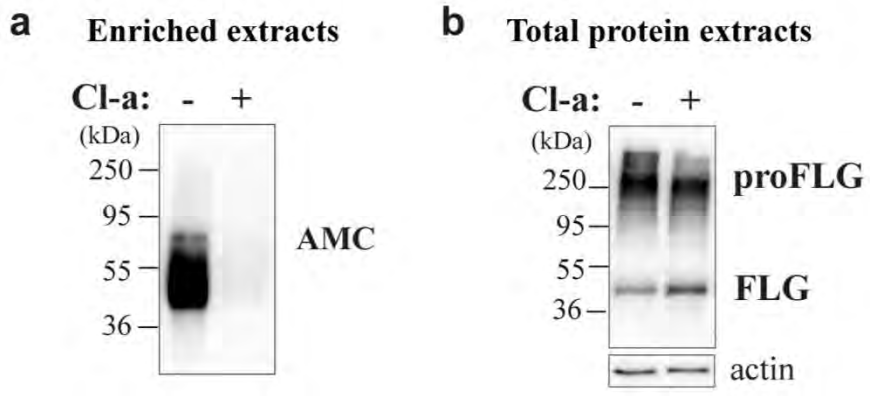


Fig. 5. Partial inhibition of deimination by Cl-amidine decreases filaggrin breakdown. (a and b) Dry RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors were treated for 24 hours (+) with Cl-amidine (Cl-a) or were untreated (-), the results being illustrated for only one donor. (a) Equal volumes of deiminated enriched-filaggrin extracts were immunodetected with AMC antibody to detect the deiminated protein. (b) Total protein extracts were immunodetected with AHF3 antibody to detect both profilaggrin (proFLG) and filaggrin (FLG).

4. Discussion

We showed that lowering the RH in the incubator to 30-50% during the production of RHEs profoundly altered the properties of the epidermis at the structural, functional and biochemical levels (Fig. 6). In particular, the *stratum corneum* of RHEs at low humidity level was thicker, with an increased number of corneocyte layers, and its TEWL decreased. In parallel, the amount of PCA, a highly hygroscopic NMF component, was higher. This suggests that the epidermis adapted to its environment so as to retain water in the cornified layer. This is in agreement with Sun *et al.*'s recent report of normalization of lipid lamellar bilayer formation in the *stratum corneum* of RHEs grown at 50% RH, associated with an increased expression of glucosylceramide synthase [46]. Hyperkeratosis, decreased TEWL and increased secretion of lamellar bodies have also been reported in *hairless* mice maintained in a very dry environment (RH < 10%) as compared to humid one (> 80%) [47]. In addition, the detected amounts of loricrin and involucrin, two main components of cornified envelopes, were inversely modified, whereas their encoding mRNA levels did not change. We also observed an increased number of cells with transglutaminase activity, and overexpression of transglutaminase 5, one of the enzymes necessary for envelope formation. This suggests that the difference of loricrin and involucrin solubility was due to differences in their cross-linking rather than their synthesis. Therefore the composition of the envelopes may vary. In agreement, Sun et al. reported modification in the thickness of these structures in RHEs grown at 50% RH [46].

We demonstrated that the multi-step proteolysis of human filaggrin was increased in the low humidity condition, which was likely to produce more hygroscopic molecules. This indicates that filaggrin degradation is dependent on the environmental water content. Similar observations have been made in rodents. For example, during late foetal development of rats, filaggrin accumulates through the entire thickness of the *stratum corneum* and, immediately after birth, normal filaggrin proteolysis occurs in the outer *stratum corneum*. If the newborn rats are maintained in 100% humidity, mimicking the in utero milieu, the activation of filaggrin degradation is blocked. Similarly, application of occlusive patches to adult rats to maintain 100% humidity at the skin surface prevents the normal proteolysis of filaggrin [29].

In our conditions, deimination appeared as a major regulator of filaggrin breakdown (Fig. 6). Expression and activity of proteases known to be involved in the process was not found to be modified whereas the expression of PAD1, known to act on filaggrin monomers, and PAD activity were highly enhanced in dry RHEs. In agreement, the deimination of filaggrin is up-regulated two hours after birth of mice [48], when filaggrin degradation would probably occur. An increase of deimination thus seems to be sufficient to drive filaggrin degradation. This is consistent with the fact that filaggrin deimination induces its detachment from keratin filaments [48], and that filaggrin is

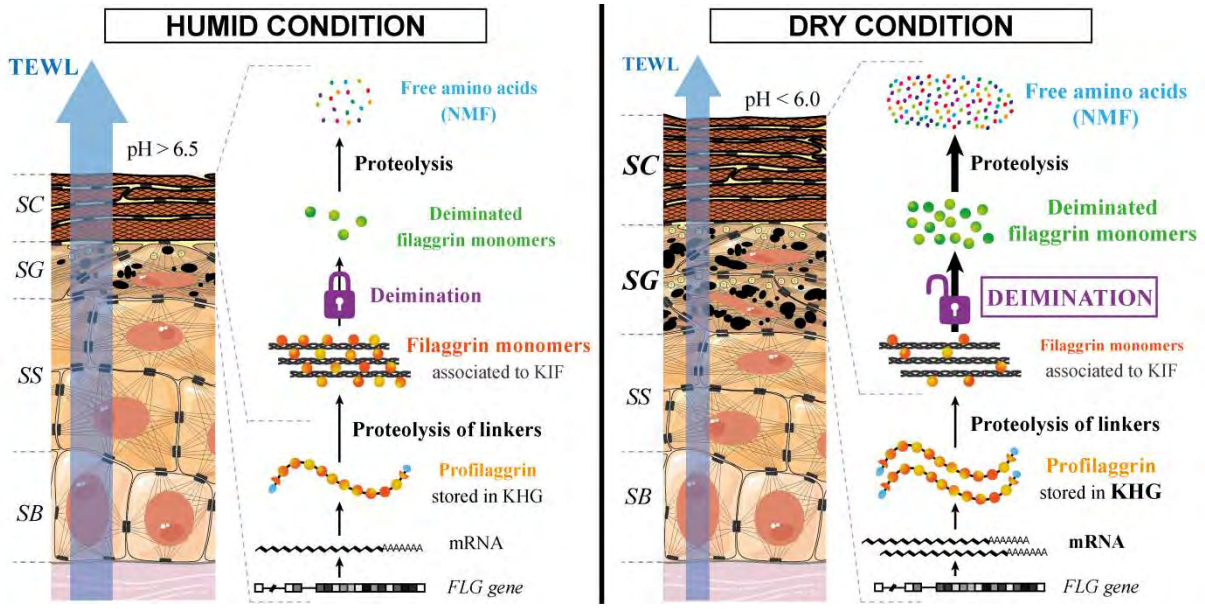


Fig. 6. Schematic representation of the effect of the dry condition on RHEs and filaggrin metabolism. For details, see the text. SC: stratum corneum, SG: stratum granulosum, SS: stratum spinosum, SB: stratum basale, FLG: filaggrin, KHG: keratohyalin granules, KIF: keratin intermediate filaments, NMF: natural moisturizing factor, TEWL: transepidermal water loss.

more efficiently proteolyzed in vitro by calpain 1 when it is deiminated [20, 49]. Moreover, partial inhibition of PADs for 24 hours partially reversed the effect of culture humidity lowering on filaggrin degradation, suggesting that deimination is necessary for filaggrin degradation to occur.

In line with these observations, it has been shown that genes encoding filaggrin, PAD1 and PAD3 are not present in the genome of fishes and amphibian [50, 51], animals living in extremely humid environment.

We previously described deimination as a multilock controlled process [43]. Here we show that, in normal keratinocytes, environmental dryness unlocks this process. The mechanisms involved remain to be deciphered, but the data reported by Sun *et al.* give a clue. Calcium concentration is probably involved as dry RHEs expressed larger amounts of osmolyte transporters and displayed a higher calcium concentration and a marked calcium increase at the granular layer level, with a calcium gradient similar to native epidermis [46]. On the other hand, PADs are known to be calcium-dependent, and in native epidermis the peak of calcium at the granular/lower cornified layers is suspected to activate the enzymes (deiminated proteins are only detected in the stratum corneum).

Do our data have any other relevance to native healthy human epidermis? In extremely preterm neonates, the lack of an effective skin barrier leads to high TEWL with a high risk of dehydration. A progressive decrease of ambient humidity (from 75% to 50% RH) after the first post-natal week has been shown to accelerate barrier development in the premature infants [52]. Workers exposed to low RH have a lower TEWL (reviewed in [53]). In both cases, an adaptive mechanism similar to the

one described in this study is probably involved. Whether filaggrin degradation is affected is not known but can be suspected.

Do our data have any relevance for the understanding of AD? Climatic variations impact the disease, as recently discussed [53]. For example, a negative correlation between indoor RH and disease severity has been reported; children with AD and *FLG* mutations have a higher severity score and their lesions are more often located in air-exposed skin areas; *FLG* mutations are a weaker risk factor for AD in subtropical climates, and children with AD experienced a reduction in the disease severity after one month spent in such a humid climate. All these observations are consistent with our results showing that less filaggrin is required in a humid environment. Our data suggest that PAD expression/activity could be of importance in AD, although no genetic variations in *PADI* genes have been associated with the disease susceptibility until now. PADs could therefore constitute therapeutic skin targets.

Hightlights

- Human filaggrin degradation in the *stratum corneum* is controlled by the environmental humidity.
- An increase of deimination appears to be necessary and sufficient to trigger filaggrin breakdown.
- The higher requisite for filaggrin degradation in dry conditions may explain the negative effects of dry and cold climate in skin of patients with atopic dermatitis.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are indebted to Dr Pascal Descargues (Genoskin, Toulouse, France) for the human skin samples. We thank Carole Pons for her excellent technical assistance, Dr Marie Reynier for her helpful contribution to qPCR primer design (UDEAR), and Dr Gabrielle Le Provost for her advice on the Lucifer Yellow protocol. We acknowledge Pr. Yves Poumay and all members of his team (University of Namur, Belgium) for warmly hosting Laura Cau in his lab during one week and for their useful advice on RHE production. We thank all members of the electron microscopy facility of Toulouse University, Florence Capilla of the histopathology facility, Sophie Allart, Astrid Canivet and Danièle Daviaud from the cellular imaging facility (CPTP, INSERM U1043, Toulouse Rio Imagerie,

Toulouse), and Dr Alain Moga (Synelvia, Toulouse, France) for the NMF dosage. This work was supported by grants from CNRS, Toulouse University, INSERM and the French Society for Dermatology (SFD). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Laura Cau was supported by the French Ministry of Research and Technology, and gratefully acknowledges the SILAB–Jean PAUFIQUE Corporate Foundation for its support.

References

[1] T. Bieber, Atopic dermatitis 2.0: from the clinical phenotype to the molecular taxonomy and stratified medicine, Allergy. 67 (2012) 1475–1482. doi:10.1111/all.12049.

[2] S. Kezic, N. Novak, I. Jakasa, J.M. Jungersted, M. Simon, J.M. Brandner, M.A. Middelkamp-Hup, S. Weidinger, Skin barrier in atopic dermatitis, Front. Biosci. Landmark Ed. 19 (2014) 542–556.

[3] H.A. Al-Shobaili, A.A. Ahmed, N. Alnomair, Z.A. Alobead, Z. Rasheed, Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update, Int. J. Health Sci. 10 (2016).

[4] C.N.A. Palmer, A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, D.R. Goudie, A. Sandilands, L.E. Campbell, F.J.D. Smith, G.M. O'Regan, R.M. Watson, J.E. Cecil, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C.S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L.B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, W.H.I. McLean, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, Nat. Genet. 38 (2006) 441–446. doi:10.1038/ng1767.

[5] H. Baurecht, A.D. Irvine, N. Novak, T. Illig, B. Bühler, J. Ring, S. Wagenpfeil, S. Weidinger, Toward a major risk factor for atopic eczema: Meta-analysis of filaggrin polymorphism data, J. Allergy Clin. Immunol. 120 (2007) 1406–1412. doi:10.1016/j.jaci.2007.08.067.

[6] E. Rodríguez, H. Baurecht, E. Herberich, S. Wagenpfeil, S.J. Brown, H.J. Cordell, A.D. Irvine, S. Weidinger, Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: Robust risk factors in atopic disease, J. Allergy Clin. Immunol. 123 (2009) 1361–1370.e7. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.036.

[7] S. Kezic, P.M.J.H. Kemperman, E.S. Koster, C.M. de Jongh, H.B. Thio, L.E. Campbell, A.D. Irvine, I.W.H. McLean, G.J. Puppels, P.J. Caspers, Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum, J. Invest. Dermatol. 128 (2008) 2117–2119. doi:10.1038/jid.2008.29.

[8] J.M. Jungersted, H. Scheer, M. Mempel, H. Baurecht, L. Cifuentes, J.K. Høgh, L.I. Hellgren, G.B.E. Jemec, T. Agner, S. Weidinger, Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema, Allergy. 65 (2010) 911–918. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x.

[9] J.P. Thyssen, S. Kezic, Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis, J. Allergy Clin. Immunol. 134 (2014) 792–799. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.014.

[10] V. Mlitz, J. Latreille, S. Gardinier, R. Jdid, Y. Drouault, P. Hufnagl, L. Eckhart, C. Guinot, E. Tschachler, Impact of filaggrin mutations on Raman spectra and biophysical properties of the stratum corneum in mild to moderate atopic dermatitis, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 26 (2011) 983–990. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04198.x.

[11] M.D. Howell, B.E. Kim, P. Gao, A.V. Grant, M. Boguniewicz, A. DeBenedetto, L. Schneider, L.A. Beck, K.C. Barnes, D.Y.M. Leung, Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression, J. Allergy Clin. Immunol. 124 (2009) R7–R12. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.012.

[12] S. Kezic, G.M. O'Regan, N. Yau, A. Sandilands, H. Chen, L.E. Campbell, K. Kroboth, R. Watson, M. Rowland, W.H. Irwin McLean, A.D. Irvine, Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity, Allergy. 66 (2011) 934–940. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02540.x.

[13] L. Pellerin, J. Henry, C.-Y. Hsu, S. Balica, C. Jean-Decoster, M.-C. Méchin, B. Hansmann, E. Rodriguez, S. Weindinger, A.-M. Schmitt, G. Serre, C. Paul, M. Simon, Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin, J. Allergy Clin. Immunol. 131 (2013) 1094–1102. doi:10.1016/j.jaci.2012.12.1566.

[14] P.M. Steinert, J.S. Cantieri, D.C. Teller, J.D. Lonsdale-Eccles, B.A. Dale, Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 (1981) 4097–4101.
[15] M. Simon, M. Haftek, M. Sebbag, M. Montézin, E. Girbal-Neuhauser, D. Schmitt, G. Serre, Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis., Biochem. J. 317 (1996) 173–177.
[16] M.-C. Méchin, M. Sebbag, J. Arnaud, R. Nachat, C. Foulquier, V. Adoue, F. Coudane, H. Duplan, A.-M. Schmitt, S. Chavanas, M. Guerrin, G. Serre, M. Simon, Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases, Int. J. Cosmet. Sci. 29 (2007) 147–168. doi:10.1111/j.1467-2494.2007.00377.x.
[17] M.-C. Méchin, M. Enji, R. Nachat, S. Chavanas, M. Charveron, A. Ishida-Yamamoto, G. Serre, H. Takahara, M. Simon, The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 1984–1995. doi:10.1007/s00018-005-5196-y.
[18] R. Nachat, M.-C. Méchin, H. Takahara, S. Chavanas, M. Charveron, G. Serre, M. Simon, Peptidylarginine Deiminase Isoforms 1–3 Are Expressed in the Epidermis and Involved in the Deimination of K1 and Filaggrin, J. Invest. Dermatol. 124 (2005) 384–393. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23568.x.
[19] K.A. Resing, N. al-Alawi, C. Blomquist, P. Fleckman, B.A. Dale, Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca2+ in the second stage., J. Biol. Chem. 268 (1993) 25139–25145.
[20] Y. Kamata, A. Taniguchi, M. Yamamoto, J. Nomura, K. Ishihara, H. Takahara, T. Hibino, A. Takeda, Neutral Cysteine Protease Bleomycin Hydrolase Is Essential for the Breakdown of Deiminated Filaggrin into Amino Acids, J. Biol. Chem. 284 (2009) 12829–12836. doi:10.1074/jbc.M807908200.
[21] L. Eckhart, E. Tschachler, Cuts by Caspase-14 Control the Proteolysis of Filaggrin, J. Invest. Dermatol. 131 (2011) 2173–2175. doi:10.1038/jid.2011.282.
[22] E. Hoste, P. Kemperman, M. Devos, G. Denecker, S. Kezic, N. Yau, B. Gilbert, S. Lippens, P. De Groote, R. Roelandt, P. Van Damme, K. Gevaert, R.B. Presland, H. Takahara, G. Puppels, P. Caspers, P. Vandenabeele, W. Declercq, Caspase-14 Is Required for Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin, J. Invest. Dermatol. 131 (2011) 2233–2241. doi:10.1038/jid.2011.153.
[23] A.V. Rawlings, C.R. Harding, Moisturization and skin barrier function, Dermatol. Ther. 17 (2004) 43–48. doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x.
[24] C. Barresi, C. Stremnitzer, V. Mlitz, S. Kezic, A. Kammeyer, M. Ghannadan, K. Posa-Markaryan, C. Selden, E. Tschachler, L. Eckhart, Increased Sensitivity of Histidinemic Mice to UVB Radiation Suggests a Crucial Role of Endogenous Urocanic Acid in Photoprotection, J. Invest. Dermatol. 131 (2011) 188–194. doi:10.1038/jid.2010.231.
[25] N.K. Gibbs, M. Norval, Urocanic Acid in the Skin: A Mixed Blessing?, J. Invest. Dermatol. 131 (2011) 14–17. doi:10.1038/jid.2010.276.
[26] M. Le Lamer, L. Pellerin, M. Reynier, L. Cau, V. Pendaries, C. Leprince, M.-C. Méchin, G. Serre, C. Paul, M. Simon, Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis, Biol. Chem. 396 (2015) 1163–1179. doi:10.1515/hsz-2015-0141.
[27] C. Deraison, C. Bonnart, F. Lopez, C. Besson, R. Robinson, A. Jayakumar, F. Wagberg, M. Brattsand, J.P. Hachem, G. Leonardsson, A. Hovnanian, LEKTI Fragments Specifically Inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction, Mol. Biol. Cell. 18 (2007) 3607–3619. doi:10.1091/mbc.E07-02-0124.
[28] H. Miajlovic, P.G. Fallon, A.D. Irvine, T.J. Foster, Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by Staphylococcus aureus, J. Allergy Clin. Immunol. 126 (2010) 1184–1190.e3. doi:10.1016/j.jaci.2010.09.015.
[29] I.R. Scott, C.R. Harding, Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment, Dev. Biol. 115 (1986) 84–92. doi:10.1016/0012-1606(86)90230-7.
[30] A. Frankart, J. Malaisse, E. De Vuyst, F. Minner, C.L. de Rouvroit, Y. Poumay, Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface, Exp. Dermatol. 21 (2012) 871–875. doi:10.1111/exd.12020.
[31] V. Pendaries, J. Malaisse, L. Pellerin, M. Le Lamer, R. Nachat, S. Kezic, A.-M. Schmitt, C. Paul, Y. Poumay, G. Serre, M. Simon, Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation, J. Invest. Dermatol. 134 (2014) 2938–2946. doi:10.1038/jid.2014.259.

[32] M. Reynier, S. Allart, E. Gaspard, A. Moga, D. Goudounèche, G. Serre, M. Simon, C. Leprince, Rab11a Is Essential for Lamellar Body Biogenesis in the Human Epidermis, J. Invest. Dermatol. 136 (2016) 1199–1209. doi:10.1016/j.jid.2016.02.001.

[33] M. Simon, E. Girbal, M. Sebbag, V. Gomès-Daudrix, C. Vincent, G. Salama, G. Serre, The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis., J. Clin. Invest. 92 (1993) 1387–1393.

[34] E.A. Leclerc, A. Huchenq, S. Kezic, G. Serre, N. Jonca, Mice deficient for the epidermal dermokine β and γ isoforms display transient cornification defects, J Cell Sci. 127 (2014) 2862–2872. doi:10.1242/jcs.144808.

[35] M. Raghunath, H.C. Hennies, F. Velten, V. Wiebe, P.M. Steinert, A. Reis, H. Traupe, A novel in situ method for the detection of deficient transglutaminase activity in the skin, Arch. Dermatol. Res. 290 (1998) 621–627.

[36] Y. Luo, K. Arita, M. Bhatia, B. Knuckley, Y.-H. Lee, M.R. Stallcup, M. Sato, P.R. Thompson, Inhibitors and Inactivators of Protein Arginine Deiminase 4: Functional and Structural Characterization, Biochemistry (Mosc.). 45 (2006) 11727–11736. doi:10.1021/bi061180d.

[37] K. List, R. Szabo, P.W. Wertz, J. Segre, C.C. Haudenschild, S.-Y. Kim, T.H. Bugge, Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1, J. Cell Biol. 163 (2003) 901–910. doi:10.1083/jcb.200304161.

[38] T. Matsui, K. Miyamoto, A. Kubo, H. Kawasaki, T. Ebihara, K. Hata, S. Tanahashi, S. Ichinose, I. Imoto, J. Inazawa, J. Kudoh, M. Amagai, SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing, EMBO Mol. Med. 3 (2011) 320–333. doi:10.1002/emmm.201100140.

[39] J. Sakabe, M. Yamamoto, S. Hirakawa, A. Motoyama, I. Ohta, K. Tatsuno, T. Ito, K. Kabashima, T. Hibino, Y. Tokura, Kallikrein-related Peptidase 5 Functions in Proteolytic Processing of Profilaggrin in Cultured Human Keratinocytes, J. Biol. Chem. 288 (2013) 17179–17189. doi:10.1074/jbc.M113.476820.

[40] C. Bonnart, C. Deraison, M. Lacroix, Y. Uchida, C. Besson, A. Robin, A. Briot, M. Gonthier, L. Lamant, P. Dubus, B. Monsarrat, A. Hovnanian, Elastase 2 is expressed in human and mouse epidermis and impairs skin barrier function in Netherton syndrome through filaggrin and lipid misprocessing, J. Clin. Invest. 120 (2010) 871–882. doi:10.1172/JCI41440.

[41] A. Ishigami, T. Ohsawa, H. Asaga, K. Akiyama, M. Kuramoto, N. Maruyama, Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin, Arch. Biochem. Biophys. 407 (2002) 25–31. doi:10.1016/S0003-9861(02)00516-7.

[42] S. Chavanas, M.-C. Méchin, H. Takahara, A. Kawada, R. Nachat, G. Serre, M. Simon, Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6, Gene. 330 (2004) 19–27. doi:10.1016/j.gene.2003.12.038.

[43] M.-C. Méchin, F. Coudane, V. Adoue, J. Arnaud, H. Duplan, M. Charveron, A.-M. Schmitt, H. Takahara, G. Serre, M. Simon, Deimination is regulated at multiple levels including auto-deimination of peptidylarginine deiminases, Cell. Mol. Life Sci. 67 (2010) 1491–1503. doi:10.1007/s00018-010-0262-5.

[44] T. Senshu, K. Akiyama, S. Kan, H. Asaga, A. Ishigami, M. Manabe, Detection of Deiminated Proteins in Rat Skin: Probing with a Monospecific Antibody After Modification of Citrulline Residues, J. Invest. Dermatol. 105 (1995) 163–169. doi:10.1111/1523-1747.ep12317070.

[45] B. Knuckley, C.P. Causey, J.E. Jones, M. Bhatia, C.J. Dreyton, T.C. Osborne, H. Takahara, P.R. Thompson, Substrate Specificity and Kinetic Studies of PADs 1, 3, and 4 Identify Potent and Selective Inhibitors of Protein Arginine Deiminase 3, Biochemistry (Mosc.). 49 (2010) 4852–4863. doi:10.1021/bi100363t.

[46] R. Sun, A. Celli, D. Crumrine, M. Hupe, L.C. Adame, S.D. Pennypacker, K. Park, Y. Uchida, K.R. Feingold, P.M. Elias, D. Ilic, T.M. Mauro, Lowered Humidity Produces Human Epidermal Equivalents with Enhanced Barrier Properties, Tissue Eng. Part C Methods. 21 (2015) 15–22. doi:10.1089/ten.tec.2014.0065.

[47] M. Denda, J. Sato, Y. Masuda, T. Tsuchiya, J. Koyama, M. Kuramoto, P.M. Elias, K.R. Feingold, Exposure to a Dry Environment Enhances Epidermal Permeability Barrier Function, J. Invest. Dermatol. 111 (1998) 858–863. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00333.x.

[48] K. Akiyama, T. Senshu, Dynamic aspects of protein deimination in developing mouse epidermis, Exp. Dermatol. 8 (1999) 177–186. doi:10.1111/j.1600-0625.1999.tb00368.x.

[49] C.-Y. Hsu, J. Henry, A.-A. Raymond, M.-C. Méchin, V. Pendaries, D. Nassar, B. Hansmann, S. Balica, O. Burlet-Schiltz, A.-M. Schmitt, H. Takahara, C. Paul, G. Serre, M. Simon, Deimination of Human Filaggrin-2 Promotes Its Proteolysis by Calpain 1, J. Biol. Chem. 286 (2011) 23222–23233. doi:10.1074/jbc.M110.197400.

[50] S. Ying, S. Dong, A. Kawada, T. Kojima, S. Chavanas, M.-C. Méchin, V. Adoue, G. Serre, M. Simon, H. Takahara, Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes, J. Dermatol. Sci. 53 (2009) 2–9. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.09.009.

[51] B. Strasser, V. Mlitz, H. Fischer, E. Tschachler, L. Eckhart, Comparative genomics reveals conservation of filaggrin and loss of caspase-14 in dolphins, Exp. Dermatol. 24 (2015) 365–369. doi:10.1111/exd.12681.
[52] J. Ågren, G. Sjörs, G. Sedin, Ambient humidity influences the rate of skin barrier maturation in extremely preterm infants, J. Pediatr. 148 (2006) 613–617. doi:10.1016/j.jpeds.2005.11.027.
[53] K.A. Engebretsen, J.D. Johansen, S. Kezic, A. Linneberg, J.P. Thyssen, The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 30 (2016) 223–249. doi:10.1111/jdv.13301.

Supplementary materials and methods

Targeted DNA sequencing

Genomic DNA was isolated from keratinocytes corresponding to the four different donors using the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). DNA quality and quantity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer, and a Qubit v3 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and the Qbit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Mutation screening was performed by next generation sequencing using the Personal Genome Machine (PGM, Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific) and the AmpliSeq technology (Ion Torrent). Using the AmpliSeq Designer tool (ampliseq.com; v4.2), an AmpliSeq Custom Panel was designed to cover a panel of genes, comprising exonic regions and exon-intron boundaries. In particular, 97% of *FLG* was covered. Library construction and sequencing were performed at the GeT-Purpan core facility (Genome and Transcriptome, GenoToul, France). Briefly, libraries were produced using 10 ng of genomic DNA for each sample and each pool of AmpliSeq primers, with the Ion AmpliSeq library kit v2.0 (Ion Torrent) and Ion Xpress Barcodes, following the guidelines of the supplier. Final libraries were individually controlled and quantified on High Sensitivity DNA chips of a BioAnalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Libraries were then pooled, templated on Ion Sphere Particles using the One Touch 2 instrument with HiQ kit, and finally sequenced on the Ion Torrent PGM using the sequencing HiQ chemistry, 400 bases run workflow, on a 316 v2 Ion chip. Data produced were processed using the Ion Torrent Suite Software tools (Thermo Fisher Scientific) for quality filtering, trimming, demultiplexing, aligning on the AmpliSeq hg19 reference human genome, and variant calling. A mean of 115804 usable reads was produced per donor DNA and the mean coverage per *FLG* base was 595. Variant caller files were then transferred to the Ion Reporter Software (v5.0, http://ionreporter.lifetechnologies.com/, Thermo Fisher Scientific) for filtering and annotation of detected variants. Mutations with an allele ratio lower than 0.1 were filtered out.

Cell viability assay

Cell viability of RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (3 RHEs/condition/donor) was determined using an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) reduction assay as described previously [1, 2]. RHEs topically treated with 3% SDS were used as a control. Optical density was measured at 550 nm.

Analysis of Lucifer Yellow permeability

To test the epidermis outside-in permeability, 500 µL of 1 mM lucifer yellow (Sigma-Aldrich) was added to RHEs (3 RHEs/condition/donor; 3 different donors). After incubation at 37°C and 5% CO_2 for 6 hours, the culture medium dye concentration was measured using a Varioskan Flash spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific; $\lambda_{excitation}$ = 425 nm / $\lambda_{emission}$ = 550 nm). An immature RHE (harvested at day 2) was used as positive control.

Transepidermal water loss measurement

Transepidermal water loss (TEWL) of RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (3 RHEs/condition/donor) was measured using the tewameter TM300 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany). Measurements were performed at stable temperature (20.5±0.1°C) and relative humidity (48.0±0.2%) according to the manufacturer's instructions. Before measurements, plate covers and sealing films were removed, and culture plates containing RHEs were maintained in the room for at least 20 min to allow equilibration with ambient conditions. Just prior to TEWL measurement, culture inserts were placed on a drop of medium into a Petri dish and a rubber seal was placed between the culture insert and the probe to ensure airtightness. For each RHE, 100 measurements were collected (1 measurement/second) and mean ± standard deviation was evaluated.

Western-blotting

Either equal amounts of proteins (according to Ponceau staining) or equal volumes (for deiminated filaggrin-enriched extracts) were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Danderyd, SE). Membranes were blocked in a Tris-HCl buffer containing 5% skimmed milk and 0.05% Tween-20, then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (for details, see Table S1) and finally incubated for 2 hours at room temperature with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies diluted to 1:10000 (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP and Swine-Anti-Goat IgG-HRP; SouthernBiotech, Birmingham, AL; Goat Anti-Mouse IgG-HRP; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). The detection was realized with ECL Prime system (GE Healthcare) and images were acquired with a G:BOX Chemi XT4 CCD camera (Syngene, Cambridge, United Kingdom) and GeneSys software (Genesys, Daly City, CA). ImageJ software was used to quantify immunoreactive bands. Signals were normalized to actin immunodetection. Quantification was performed for extracts of RHEs produced with keratinocytes from 3 or 4 different donors and results are illustrated for 3 donors.

Light microscopy and indirect immunofluorescence

RHEs (1 RHE/condition/donors; 3 different donors) were fixed in 4% formaldehyde buffer (Sigma-Aldrich) for 24 hours at 4°C, and paraffin-embedded. For light microscopy analyses, five-micron sections were stained with hematoxylin-eosin. For indirect immunofluorescence analyses, after deparaffinization, rehydration and incubation in a blocking solution (2% bovine serum albumin and 0.05% Tween-20 in PBS), sections were first incubated with primary antibodies (for details, see Table S1) and then with the appropriate Alexa-fluor conjugated secondary antibodies (Invitrogen Life Technologies,) diluted to 1:1000 and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted at 1 µg/ml. Slides were mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem, San Diego, CA). Images were captured with a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan), with a Zeiss Apotome microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) or with a confocal SP8 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France). Ki67 positive nucleus counting was performed with ImageJ software on 20x enlargement pictures corresponding to 3 independent areas of each epidermis. The same brightness threshold was set for all pictures and positive nuclei were counted using the "Analyses Particles" tool. For quantification of deiminated proteins detected with the AMC antibody, images corresponding to 3 independent areas of each RHE were acquired using a confocal SP8 microscope with a 63x oil immersion objective. The area and mean gray value of fluorescence was measured on each pictured with ImageJ software using a fixed threshold and amount of deiminated proteins were evaluated as [Area of fluorescence x Mean gray value of fluorescence]. For the visual representation, the intensity of the fluorescence signal was coded as a color gradient with a 16-color lookup table using ImageJ software, as previously described [3].

***In situ* transglutaminase activity assay**

In situ transglutaminase assay was performed on cryosections of RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (1 RHE/condition/donor) as described previously [4,5]. Briefly, five-micron cryosections were blocked with 1% BSA in 0.1 M Tris-HCl pH 8.4 for 30 min and then incubated for 2 hours at room temperature with Alexa-Fluor-555–cadaverine (Invitrogen Life Technologies) in 0.1 M Tris-HCl pH 8.4 and either 5 mM CaCl2 or 5 mM EDTA (negative control). The reaction was stopped by incubating the sections with 25 mM EDTA in PBS for 5 min. Nuclei were stained with DAPI diluted at 1 µg/ml in PBS and slides were mounted in Mowiol 4-88. For each RHE, 3 pictures corresponding to 3 independent areas were acquired with a 63x oil immersion objective using a confocal SP8 microscope (Leica Microsystems) and the area of fluorescence of each image was measured with ImageJ software using a fixed threshold and mean ± standard deviation was calculated.

***In vitro* calpain activity assay**

Calpain activity of RHE extracts (3 RHEs/condition/donor; 3 different donors) was evaluated using a fluorometric calpain activity assay kit (Abcam, Cambridge, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions. Briefly, RHEs were homogenized on ice in the extraction buffer provided, which specifically extracts cytosolic proteins. After centrifugation (15000g, 10 min, 4°C), RHE extracts were incubated in the reaction buffer with a calpain substrate (Ac-LLY-AFC) for 1 hour at 37°C in darkness. For each sample, controls were performed in the presence of 2.5 mM of the calpain inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (Sigma-Aldrich) to assess the specificity of calpain-independent release of fluorescence. Upon cleavage of the substrate by calpain, free AFC emits a yellow-green fluorescence that was quantified using a Varioskan Flash spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific; $\lambda_{excitation}$ = 400 nm/ $\lambda_{emission}$ = 505 nm). The fluorescence intensity of controls was subtracted from the total fluorescence intensity of the sample to determine calpain activity specific fluorescence. Results are expressed as relative fluorescence units.

Reverse transcription

RHEs (1 RHE/condition/donor; 4 different donors) were placed in RNAlater RNA stabilization solution (Qiagen, Hilden, Germany) for at least one day at 4°C and total RNA was extracted with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quality of total RNA was validated for RNA Integrity Number > 8.5 using an Agilent 2100 Bioanalyzer with the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) and RNA quantity was evaluated using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RT was performed from 400 ng of total RNA by using PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) with combination of oligo(dT) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions.

Quantitative polymerase chain reaction

For quantitative polymerase chain reaction (qPCR), each amplification was performed twice with the 7300 Real Time PCR System (Applied BioSystems, Foster City, CA) using the Sybr qPCR SuperMix W/ROX (Invitrogen Life Technologies). The qPCR conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The steady-state mRNA levels of each gene were determined using *YWHAZ* expression for normalization, according to the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ calculation method [6]. Sequences of primers used in this study are presented in Table S1. For some genes, primer pairs were newly designed with Primer3 software (http://primer3.ut.ee/). All primer pair specificities were verified by *in silico* nBLAST analysis, and by loading on 2.5% agarose gel and Sanger-sequencing amplicons. Moreover, qPCR primer efficiencies were checked on RHE cDNA serial dilutions (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320).

Analysis of the expression of histidase at the mRNA level

The mRNAs encoding histidase variants 2 (*HAL-V2*) and 3 (*HAL-V3*) were analyzed by RT-qPCR using specific primers (Table S1), whereas the variant 1 (*HAL-V1*) was analyzed by a classical PCR approach. PCR was performed by using the EconoTaq PLUS GREEN 2X PCR Master Mix (Lucigen, Middleton, WI). The PCR conditions were as follows: 95°C for 4 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 1 min, followed by a final elongation at 72°C for 5 min.

Supplementary tables

Table S1. Primary antibodies

Antigen	Antibody	Source (Reference)	Dilution	
			WB	IIF
Actin	clone C4	Merck Millipore, Billerica, MA	1:10000	-
Bleomycin hydrolase	polyclonal HPA039548	Sigma-Aldrich, St Louis, MO	1:1000	-
Calpain 1	polyclonal HPA005992	Sigma-Aldrich, St Louis, MO	1:1000	-
Caspase 14	clone D-10	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA	1:100	-
Corneodesmosin	clone G36-19	Serre *et al.* 1991 [7]	1:1000	-
Elastase 2	polyclonal K-14	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA	1:200	-
Filaggrin	clone AHF3	Simon *et al.* 1995 [8]	1:1000	1:1000
Histidase	clone 4F2	Abnova, Taipei, Taiwan	1:1000	-
Involucrin	clone SY5	Sigma-Aldrich, St Louis, MO	1:1000	-
Kallikrein 5	polyclonal AF1108	R&D Systems, Minneapolis, MN	1:500	-
Keratin 10	polyclonal PRB-159P	Covance, Princeton, NJ	1:40000	-
Keratin 14	polyclonal HPA023040	Sigma-Aldrich, St Louis, MO	1:40000	-
Ki-67	clone SP6	Abcam, Cambridge, United Kingdom	-	1:100
Loricrin	polyclonal AF62	Covance, Princeton, NJ	1:10000	-
Matriptase	clone D-7	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA	1:100	-
Modified deiminated proteins	Anti-Modified Citulline (AMC)*	Senshu *et al.* 1995 [9]	1:2500	1:1000
Peptidyl-arginine deiminase 1	polyclonal anti-peptide anti-PAD1	Guerrin *et al.* 2003, Nachat *et al.* 2005 [10,11]	1:200	-
Peptidyl-arginine deiminase 3	polyclonal anti-peptide anti-PAD3	Abcam, Cambridge, United Kingdom	1:200	-
SASPase	polyclonal C-13	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA	1:200	-
Transglutaminase 1	polyclonal A018	Zedira, Darmstadt, Germany	1:200	-
Transglutaminase 3	polyclonal A015	Zedira, Darmstadt, Germany	1:200	-
Transglutaminase 5	polyclonal A008	Zedira, Darmstadt, Germany	1:500	-

* When AMC antibodies were used, citrullyl residues were chemically modified before the saturation step by incubation at 37°C in 0.0125% $FeCl_3$, 2.3M H_2SO_4, 1.5M H_3PO_4, 0.25% diacetyl monoxime and 0.125% antipyrine for 1 hour for western blot and 3 hours for indirect immunofluorescence, as previously described [3, 9, 12]

Table S2. Sequences of PCR primers

Gene	Forward primer	Reverse primer	Reference
ASPRV1	GTTTCTCTTCTTGGCGTGGG	ATGGTGCCAATGGTTGAGGT	*this work*
BLMH	GTGGTGGACAGGAAGCATGT	TCCTTTGCAGCTACGTCAGG	[2]
CAPN1	CAAACACCCCTCCCCCAGGATGT	CGCACCCGCAGCTGCTCATA	[2]
CASP14	TGCACGTTTATTCCACGGTA	TGCTTTGGATTTCAGGGTTC	[2]
CDSN	ACTGCTGCTGGCTGGTCT	AGAGCTTCTGGCACTGGAAA	*this work*
FLG	GCAAGGTCAAGTCCAGGAGAA	CCCTCGGTTTCCACTGTCTC	[12]
IVL	GCCAGGTCCAAGACATTCAAC	GGGTGGTTATTTATGTTTGGGTGG	[12]
KLK5	AGTCAGAAAAGGTGCGAGGA	TGAACTTGCAGAGGTTCGTG	*this work*
KRT10	TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC	GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA	[12]
KRT14	CTCATCCTCCCGCTTCTCCT	AAAGCCACTACCAAAGCTGCT	[2]
LOR	CGAAGGAGTTGGAGGTGTTT	ACTGGGGTTGGGAGGTAGTT	[13]
PADI1	AGAGTGACATCGTGGACATTC	GCTCGTGGTAGGACAAGTAGTC	[12]
PADI2	GGTGGGATGAGCAGCAAGCGAATC	GAACAGAGCGGGCAGGTCAATGATG	[12]
PADI3	GCAGAGTGTGACATCATTGACATCC	GACCGCACCTTCTCCTCCAG	[12]
PADI4	CCACACGGGGCAAACTGTC	CAGCAGGGAGATGGTGAGGG	[12]
PADI6	CGTGGAGAAGTGCATTCACCTGAAC	GCCTCGCAAAGGACCTCTTGGG	[12]
ST14	ATCGCCTACTACTGGTCTGA	GTTTTGGAGTCCGTGGGGAAA	*this work*
TGM1	CCCCCGCAATGAGATCTACA	ATCCTCATGGTCCACGTACACA	*this work*
TGM3	GGAAGGACTCTGCCACAATGTC	TGTCTGACTTCAGGTACTTCTCATACTG	*this work*
TGM5	CGGAGCAGGTTGAGGACTGT	GAGGACTCCAAGGAAGACTTTCTG	*this work*
HAL-V1	AAAGAGAAAACAGTTGTTTACGGTATTAC	GCGATCTTTTATCCAGGGCCTTAC	*this work*
HAL-V2	AGAGAAAACAGGGAGCTTCAGG	CAAGATGAGAGAGTGGGGCA	*this work*
HAL-V3	GTTGACTCCCTCTCCACCAG	TACTTCCCAAACCTTACAACAGA	*this work*
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	[12]

Supplementary references

[1] A. Frankart, A. Coquette, K.-R. Schroeder, Y. Poumay, Studies of cell signaling in a reconstructed human epidermis exposed to sensitizers: IL-8 synthesis and release depend on EGFR activation, Arch. Dermatol. Res. 304 (2012) 289–303. doi:10.1007/s00403-012-1209-5.

[2] V. Pendaries, J. Malaisse, L. Pellerin, M. Le Lamer, R. Nachat, S. Kezic, A.-M. Schmitt, C. Paul, Y. Poumay, G. Serre, M. Simon, Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation, J. Invest. Dermatol. 134 (2014) 2938–2946. doi:10.1038/jid.2014.259.

[3] M.-C. Méchin, L. Cau, M.-F. Galliano, S. Daunes-Marion, S. Poigny, J.-L. Vidaluc, S. Bessou-Touya, H. Takahara, G. Serre, H. Duplan, M. Simon, Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis, J. Dermatol. Sci. 81 (2016) 101–106. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.11.006.

[4] E.A. Leclerc, A. Huchenq, S. Kezic, G. Serre, N. Jonca, Mice deficient for the epidermal dermokine β and γ isoforms display transient cornification defects, J Cell Sci. 127 (2014) 2862–2872. doi:10.1242/jcs.144808.

[5] M. Raghunath, H.C. Hennies, F. Velten, V. Wiebe, P.M. Steinert, A. Reis, H. Traupe, A novel in situ method for the detection of deficient transglutaminase activity in the skin, Arch. Dermatol. Res. 290 (1998) 621–627.

[6] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, Nat. Protoc. 3 (2008) 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.

[7] G. Serre, V. Mils, M. Haftek, C. Vincent, F. Croute, A. Réano, J.P. Ouhayoun, S. Bettinger, J.P. Soleilhavoup, Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope, J. Invest. Dermatol. 97 (1991) 1061–1072.

[8] M. Simon, M. Sebbag, M. Haftek, C. Vincent, E. Girbal-Neuhauser, J. Rakotoarivony, D. Schmitt, G. Serre, G. Sommé, Monoclonal Antibodies to Human Epidermal Filaggrin, Some Not Recognizing Profilaggrin, J. Invest. Dermatol. 105 (1995) 432–437. doi:10.1111/1523-1747.ep12321148.

[9] T. Senshu, K. Akiyama, S. Kan, H. Asaga, A. Ishigami, M. Manabe, Detection of Deiminated Proteins in Rat Skin: Probing with a Monospecific Antibody After Modification of Citrulline Residues, J. Invest. Dermatol. 105 (1995) 163–169. doi:10.1111/1523-1747.ep12317070.

[10] M. Guerrin, A. Ishigami, M.-C. Méchin, R. Nachat, S. Valmary, M. Sebbag, M. Simon, T. Senshu, G. Serre, cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I., Biochem. J. 370 (2003) 167–174. doi:10.1042/BJ20020870.

[11] R. Nachat, M.-C. Méchin, H. Takahara, S. Chavanas, M. Charveron, G. Serre, M. Simon, Peptidylarginine Deiminase Isoforms 1–3 Are Expressed in the Epidermis and Involved in the Deimination of K1 and Filaggrin, J. Invest. Dermatol. 124 (2005) 384–393. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23568.x.

[12] M.-C. Méchin, F. Coudane, V. Adoue, J. Arnaud, H. Duplan, M. Charveron, A.-M. Schmitt, H. Takahara, G. Serre, M. Simon, Deimination is regulated at multiple levels including auto-deimination of peptidylarginine deiminases, Cell. Mol. Life Sci. 67 (2010) 1491–1503. doi:10.1007/s00018-010-0262-5.

[13] M. Visser, D. Zubakov, K.N. Ballantyne, M. Kayser, mRNA-based skin identification for forensic applications, Int. J. Legal Med. 125 (2011) 253–263. doi:10.1007/s00414-010-0545-2.

Supplementary figures

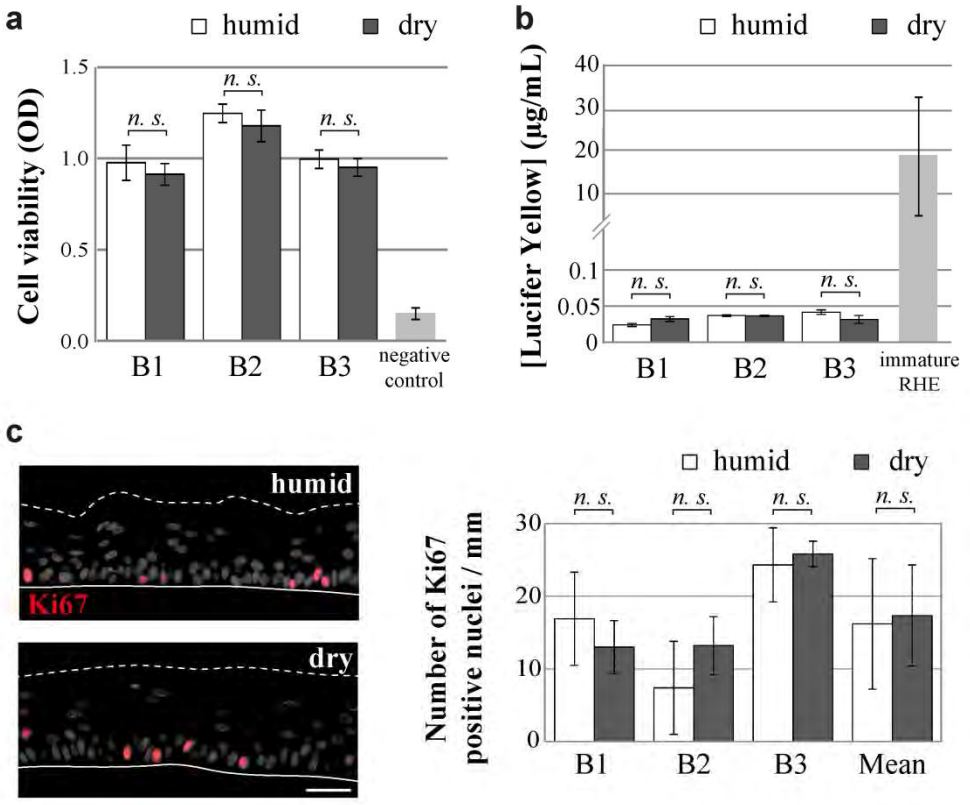


Figure S1. Unchanged cell viability, outside-in permeability and proliferation in RHEs when exposed to the dry condition. RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3) and exposed to humid or dry conditions were collected at day 10. (a) Cell viability was measured with an MTT assay. Positive control corresponds to RHEs topically treated with 3% SDS. (b) Outside-in permeability was evaluated using the Lucifer Yellow assay. A Lucifer yellow solution was applied to RHEs and, after 6 hours of incubation, the dye concentration in the culture medium was measured. Positive control corresponds to immature RHEs (harvested at day 2). (c) Left part: representative immunodetection of Ki67 on sections of fixed RHEs (3 different donors). Scale bar = 50 µm. Right part: quantification of Ki67 positive nuclei per mm of epidermis length. *n. s. = no significant difference*.

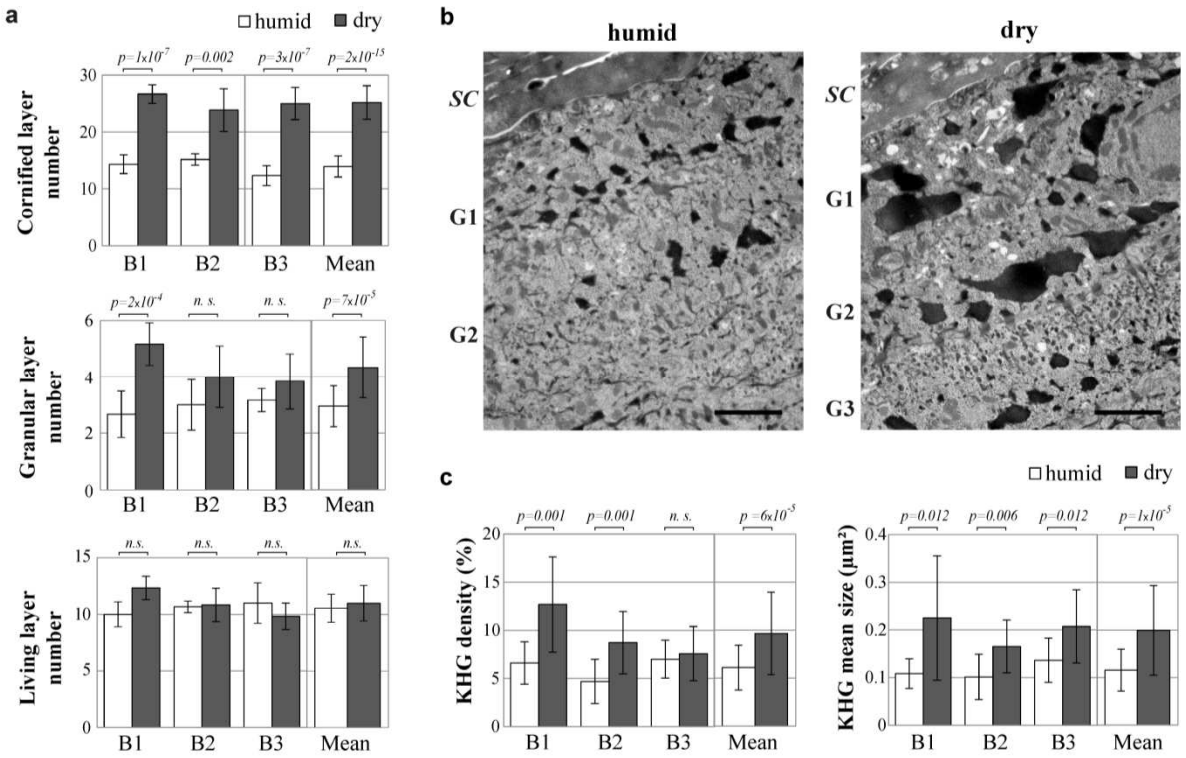


Figure S2. Exposure to the dry condition alters the RHE ultrastructure. RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3) and exposed to humid or dry conditions were collected at day 10. (a) Quantification of cornified, granular and total viable keratinocyte layers. *n. s. = no significant difference*. (b) Transmission electron micrographs of the granular layers. Scale bar = 2 µm. *SC*: *stratum corneum*; G1: first granular layer; G2: second granular layer; G3: third granular layer. Note the increased number of granular layers and the increased size of keratohyalin granules in RHEs cultivated in the dry condition *versus* the humid one. (c) Measurement of the keratohyalin granules (KHG) density (area of KHG / area of cytoplasm) and size.

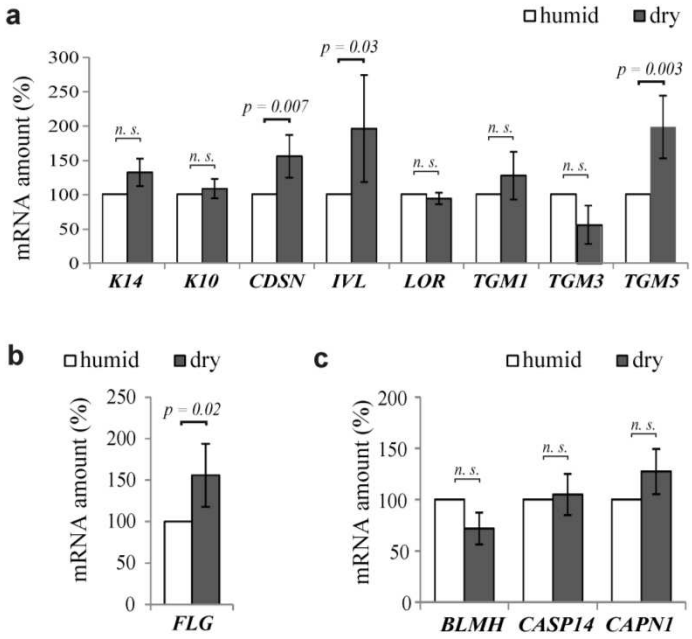


Figure S3. Gene expression analyzed by RT-qPCR. Expression of genes encoding (a) for keratin K14 and various differentiation markers, (b) for filaggrin (FLG) and (c) for proteases implicated in filaggrin breakdown was analyzed by RT-qPCR in RHEs exposed to humid (H) or dry (D) conditions (4 keratinocyte donors). *n. s. = no significant difference*

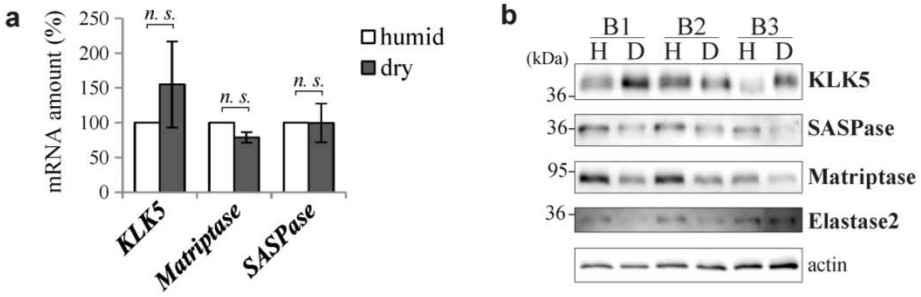


Figure S4. Expression of proteases proposed to be involved in filaggrin metabolism regulation. (a) Expression of genes encoding kallikrein 5 (*KLK5*), matriptase (*ST14)* and skin-aspartic protease (SASPase; *ASPRV1*) was analyzed by RT-qPCR in RHEs exposed to humid or dry conditions (4 different donors). *n. s. = no significant difference*. Note: we did not succeed in detecting *elastase 2* transcripts. (b) Expression of actin (as a loading control), KLK5, SASPase, matriptase and elastase 2 was analyzed by western blotting of total protein extracts prepared from RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3) and exposed to humid (H) or dry (D) conditions.

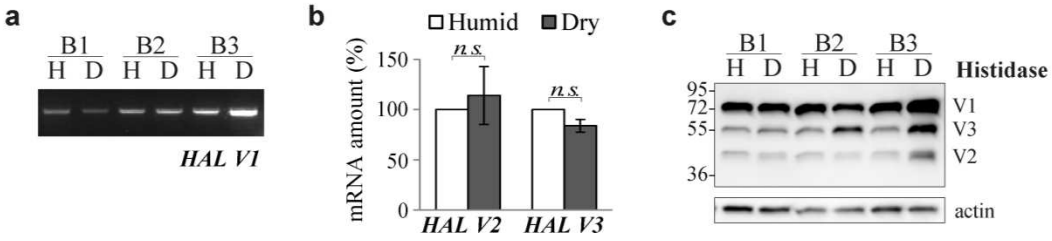


Figure S5. Expression of histidase in RHEs. Three variants of histidase (GenBank™ accession numbers: NM_002108.3, NM_001258333.1 and NM_001258334.1) were detected in RHEs by both RT-qPCR and western blotting. (a) Expression of the variant 1 encoding mRNAs *(HAL-V1)* analyzed by RT-PCR in RHEs exposed to humid (H) or dry (D) conditions (4 keratinocyte donors). (b) Expression of variants 2 and 3 encoding mRNAs *(HAL-V2* and *HAL-V3)* analyzed by RT-qPCR in RHEs exposed to humid or dry conditions (4 different donors). *n. s. = no significant difference*. (c) Detection of the three variants of histidase by western blotting of TE-NP40 extracts prepared from RHEs produced with keratinocytes from 3 different donors (B1-B3) and exposed to humid (H) or dry (D) conditions.

ARTICLE N°2

L'inhibition des peptidyl-arginine désiminases par le Cl-amidine ralentit la cornification et perturbe le flux autophagique dans un modèle d'épiderme humain

Laura Cau, Hidenari Takahara, Paul R Thompson, Guy Serre, Marie-Claire Méchin et Michel Simon

En préparation

Résumé :

La désimination est une modification post-traductionnelle catalysée par une famille d'enzymes appelées les peptidyl-arginine désiminases (PADs). Au sein d'une séquence peptidique, les PADs transforment les résidus arginine en résidus citrulline, et ce de manière calcium-dépendante. Le rôle de la désimination est encore mal compris bien que cette modification post-traductionnelle ait été associée à divers processus physiologiques et pathologiques. Dans l'épiderme, trois PADs sont exprimées : les PADs 1, 2 et 3.

L'objectif de cette étude a été de mieux comprendre le rôle des PADs dans l'homéostasie épidermique. Pour cela, des épidermes reconstruits humains (ERHs) ont été traités avec des concentrations croissantes (de 0 à 800 µM) de Cl-amidine, un inhibiteur spécifique des PADs, pendant 48 heures. L'efficacité du Cl-amidine a été analysée par western-blot avec un anticorps spécifique des protéines citrullinées, et l'effet du traitement sur la morphologie de l'épiderme a été apprécié par microscopie électronique à transmission.

Nous avons tout d'abord démontré que les PADs 1 et 3 sont exprimées et actives dans les ERHs, avec un profil semblable à celui de l'épiderme normal. Nous avons ensuite montré que le traitement des ERHs avec le Cl-amidine inhibe la désimination de manière dose-dépendante et n'est pas cytotoxique pour les kératinocytes. Le Cl-amidine, lorsqu'il est utilisé à 800 µM, induit un amincissement de la couche cornée, une augmentation importante du nombre de cellules transitionnelles (cellules à un stade de différenciation intermédiaire entre kératinocytes granuleux et cornéocytes), une accumulation de vésicules hétérogènes et de mitochondries dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux, ainsi qu'une augmentation de la quantité de LC3B-II, un marqueur des vésicules autophagiques.

En conclusion, ces résultats montrent que le traitement des ERHs avec le Cl-amidine entraîne un ralentissement de la cornification et perturbe le flux autophagique au niveau de la couche granuleuse. Ces résultats suggèrent donc que la désimination pourrait être impliquée dans le processus d'autophagie qui semble avoir lieu lors de la différenciation terminale épidermique.

Peptidylarginine deiminase inhibitor Cl-amidine slows down cornification and disturbs the autophagic flux in the epidermis

Laura Cau[1], Hidenari Takahara[2], Paul R Thompson[3], Guy Serre[1], Marie-Claire Méchin[1,*], Michel Simon[1,*]

[1]UDEAR, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Université de Toulouse Midi-Pyrénées, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France

[2]Department of Applied Biological Resource Sciences, School of Agriculture, University of Ibaraki, Ibaraki, Japan

[3]Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA

*These authors contributed equally to the manuscript.

Correspondence: Michel Simon, UDEAR, CNRS FRE3742 - INSERM U1056 - UPS, CHU Purpan, Place du Dr Baylac TSA40031, 31059 Toulouse cedex 9, France. E-mail: michel.simon@inserm.fr

Keywords: deimination, citrullination, post-translationnal modification, skin, differentiation, autophagy.

Abbreviations: PAD, peptidylarginine deiminase; RHE, reconstructed human epidermis.

ABSTRACT

Background: Deimination is a post-translational modification catalyzed by a family of enzymes named peptidylarginine deiminases (PADs). In a peptidic sequence, PADs transform arginine residues into citrulline residues. The role of deimination is still poorly understood even if it has been associated with numerous physiological and pathological processes. In the epidermis, three PADs are expressed, namely PAD1, 2 and 3.

Objective: To study the importance of deimination in the epidermis homeostasis.

Methods: Three-dimensional reconstructed human epidermis (RHEs) were treated for two days with increased concentrations (from 0 to 800 µM) of Cl-amidine, a specific PAD inhibitor. The efficacy of Cl-amidine treatment was analyzed by western blotting with antibodies specific for deiminated proteins, and its effect on the morphology of the epidermis by transmission electron microscopy.

Results: We demonstrated that PAD1 and PAD3 were expressed and active in RHEs. We showed that Cl-amidine treatment inhibited deimination in a dose-dependent manner and was not cytotoxic for keratinocytes. Cl-amidine at 800 µM was shown to decrease the thickness of the cornified layer, to highly increase the number of transitional cells, to induce an accumulation of mitochondria and of heterogeneous vesicles in the cytoplasm of the granular keratinocytes, and to up-regulate LC3B-II, a marker of autophagic vesicles.

Conclusion: These results showed that Cl-amidine treatment slows down cornification and disturbs the autophagic flux in the granular layer. This suggests that PAD1 and/or PAD3 coul play a role in the constitutive epidermal autophagy process that appears as an important step in cornification.

1. Introduction

Deimination (or citrullination) corresponds to the calcium-dependent post-translational conversion of arginine to citrulline residues in proteins. This modification alters the global charge of substrates and potentially induces changes in their conformation, interactions and thus functions. Deimination is catalyzed by a family of enzymes named peptidyl-arginine deiminases (PADs). In human, there are five PAD isotypes (PAD1-4 and PAD6), encoded by five genes named *PADI* and clustered on chromosome 1p35-36 [1]. Each PAD isotype presents its own substrate specificity and displays a specific pattern of cell and tissue expression [2–5]. The functions of PADs are still poorly understood even if they have been associated with numerous physiological processes, such as epidermal differentiation, gene regulation, pluripotency, inflammation, immune response and

oogenesis, and in various pathological processes, such as rheumatoid arthritis, some neurodegenerative diseases like multiple sclerosis and Alzheimer's disease and cancers [6–9].

In the epidermis, PAD1-3 are expressed. PAD1 is present in all the layer of the epidermis, for the basal layer to the top of the cornified layer, PAD2 is detected in all the living keratinocytes and PAD3 is mainly found in the granular layer and the lower cornified layer [4]. However, deiminated proteins are only detected in the cornified layer. Up to now, five epidermal substrates of PADs were identified: keratins K1 and K10, filaggrin, filaggrin 2 and hornerin [10–12]. Keratins K1 and K10, main components of the intermediate filaments composing the fibrous matrix of corneocytes are deiminated in the upper part of the cornified layer. The function of their deimination is not known but it was suspected to induce a relaxation of the corneocyte matrix. Filaggrin, a member of the "S100-fused type proteins" family, facilitates the aggregation of keratin intermediate filaments during keratinocyte differentiation and is partly integrated to the cornified envelope of corneocyte [13, 14]. Its deimination was shown to disrupt its interaction with keratins and to increase its susceptibility to proteolysis by calpain 1, leading to the release of free amino acids that contribute, either directly or after modification, to the natural moisturizing factor [11, 15, 16]. Filaggrin 2, another member of the S100-fused type protein family, is suspected to share the same fate than filaggrin and it was shown that its deimination also facilitates its proteolysis by calpain 1 [11]. Finally, it was recently shown that the deimination of hornerin, a third member of the S100-fused type proteins family that is incorporated to the cornified envelope, improves its crosslinking by transglutaminases and increases its cleavage by calpain 1 [12]. *Padi2* knockout mice showed no obvious epidermal defects while no compensation by other Pad isotypes was induced [17]. This suggests therefore that the deiminated proteins of the epidermis are modified by PAD1 and/or PAD3 in physiological condition.

In order to further understand the physiological function of deimination in human epidermal homeostasis, Cl-amidine, a pan-PAD inhibitor [18, 19], was used. Cl-amidine was added in the culture medium of three-dimensional reconstructed human epidermis (RHEs). Transmission electron microscopy and western blot analysis showed that Cl-amidine treatment disturbed the autophagic flux during cornification.

2. Materials and Methods

2.1. Recombinant proteins, chemicals and antibodies

Purified recombinant human PAD1-3 (active forms without any tag) and purified recombinant FLG with a carboxy-terminal poly-histidine tag (FLG-His) were produced and purified as previously described [20–22]. Cl-amidine was synthetized as previously described [18]. Anti-modified

citrulline (AMC) antibodies were used at 0.08 µg/mL for western blot and 0.2 µg/mL for immunohistology, after chemical modification of citrulline residues for 1 and 3 hours respectively at 37°C in 0.0125% $FeCl_3$, 2.3M H_2SO4, 1.5M H_3PO4, 0.25% diacetyl monoxime and 0.125% antipyrine, and saturation as previously described [23, 24]. Anti-PAD1 and anti-PAD3 antipeptides were produced and purified as previously described [4, 21], and diluted to 4 µg/mL and 24 µg/mL, respectively. Anti-Tetra-His antibody (clone 34670, Qiagen, Hilden, Germany) was used at 1/1000. Anti-actin antibody (clone C4, Merck Millipore, Billerica, MA) was used at 1/20 000. Anti-LC3B antibody (#2775, Cell Signaling Technology, Moorpark, CA) was used at 1/1000.

2.2. *In vitro* evaluation of Cl-amidine efficacy

To assess the efficacy of Cl-amidine against epidermal PADs, *in vitro* PAD activity assays was performed as previously described [2, 22], in the presence of various concentrations of Cl-amidine (from 0 to 100 µM). Recombinant PAD1, PAD2 or PAD3 (40 milliunits/assay) was pre-incubated with Cl-amidine (from 0 to 100 µM) in 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM CaCl2, 5 mM DTT at 37°C for 10 min. Then, FLG-His (100 ng/assay) was added and the mixture was incubated at 37°C for 1 hour for PAD1 and PAD3 and for 20 min for PAD2. The reactions were stopped by the addition of Laemmli buffer (175 mM Tris-HCl, pH 6.8, 7.5% SDS, 25% glycerol, 12.5% β-mercaptoethanol) and boiling for 3 min. Samples were analyzed by western blotting with the AMC antiserum as described below.

2.3. Production of RHEs

Primary normal human keratinocytes were isolated after abdominal dermolipectomy of healthy female (34-48 years old) subjects who had given their informed consent. RHEs were produced with primary keratinocytes in a humidified atmosphere with 5% CO2 at 37°C, as previously described [25, 26]. RHEs were harvested 4, 6, 8, 10 or 12 days after air-liquid interface exposure.

2.4. Treatment of RHEs with Cl-amidine

To test the efficiency of Cl-amidine against PAD activity in RHEs, Cl-amidine was added at various final concentrations (0, 100, 200, 400 and 800 µM) into the culture medium at day 8. RHEs were then harvested at day 10.

2.5. Light microscopy and immunohistology

RHE samples were fixed in 4% formaldehyde containing buffer (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 24 hours at 4°C, and paraffin-embedded. For light microscopy analyses, five-micron sections were stained with hematoxylin and eosin. For indirect immunofluorescence analyses, after deparaffinization, rehydration and incubation in a blocking solution (2% bovine serum albumin and 0.05% Tween-20 in PBS), sections were first incubated with primary antibodies and then with the appropriate Alexa-fluor conjugated secondary antibody (Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG, Invitrogen

Life Technologies, Carlsbad, CA) diluted to 1/1000 and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) diluted to 1 µg/ml. Slides were mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem, San Diego, CA) and observed under a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope equipped with a Nikon DXM 1200C digital camera and NIS image analysis software (Nikon, Tokyo, Japan).

2.6. Western blotting

RHE specimens were lyzed by boiling twice for 5 min in Laemmli buffer. Total epidermal proteins were resolved by SDS - 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Danderyd, SE). Membranes were blocked in a Tris-HCl buffer containing 0.05% Tween-20 and 5% skimmed milk (for detection with AMC and anti-actin antibodies) or 5% bovine serum albumin (for detection with anti-LC3B antibody), then incubated overnight at 4°C with primary antibodies and finally incubated for 2 hours at room temperature with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies diluted to 1:10000 (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP, SouthernBiotech, Birmingham, AL; Goat Anti-Mouse IgG-HRP, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Detections were realized with ECL Prime system (GE Healthcare) and images were acquired with a G:BOX Chemi XT4 CCD camera (Syngene, Cambridge, United Kingdom) and GeneSys software (Genesys, Daly City, CA). ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) was used to quantify immunoreactive bands. Signals were normalized to Ponceau staining for deiminated proteins (detected with the AMC antibody) and to actin immunodetection for LC3B.

2.7. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RHE samples were placed in RNAlater RNA stabilization solution (Qiagen, Hilden, Germany) for at least one day at 4°C and total RNA was extracted with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quality of total RNA was validated for RNA Integrity Number > 8.5 using an Agilent 2100 Bioanalyzer with the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and RNA quantity was evaluated using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Reverse transcription (RT) was performed from 400 ng of total RNA by using PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) with combination of oligo(dT) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed on triplicate samples (cDNA diluted at 1/30) and twice with the 7300 Real Time PCR System (Applied BioSystems, Foster City, CA) using the Sybr qPCR SuperMix W/ROX (Invitrogen Life Technologies). The qPCR conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The steady-state mRNA levels of each gene were determined using YWHAZ expression for normalization, according to the $2(-\Delta\Delta Ct)$ calculation method [27]. The primers used were previously described [2]. Primer pair specificities were verified by in silico nBLAST analysis, and by loading on

2.5% agarose gel and Sanger-sequencing amplicons. Moreover, qPCR primer efficiencies were checked on RHE cDNA serial dilutions (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320).

2.8. Transmission electron microscopy analysis

RHEs were processed as previously described [28] and observed with an HT7700 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan). Quantifications were performed for RHEs produced from 4 different donors (at least 1 RHE per donor). The numbers of corneocyte layers were quantified on 3 independent areas of each epidermis (2500x magnification pictures). The frequency of transitional cells was estimated on an average of 30 pictures covering the area of transition between the granular layer and the cornified layer (2500x) per RHE, and corresponds to the number of pictures presenting transitional cells related to the total number of analyzed pictures.

2.9. Cell viability assay

Cell viability of RHEs was determined using an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) reduction assay as described previously [26, 29]. RHEs topically treated with 3% SDS were used as a control. Optical density was measured at 550 nm.

2.10. Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical differences were determined with bilateral paired Student's t-tests. Differences were considered significant when the *p*-value (*p*) was less than 0.05.

3. Results

3.1. *In vitro* inhibition of recombinant PAD1, PAD2 and PAD3 activity by Cl-amidine

To assess the efficacy of Cl-amidine against the three epidermal PADs, a recombinant form of human filaggrin (FLG-His) was deiminated *in vitro* by recombinant PAD1, PAD2 or PAD3 at 37°C, in the presence of increased concentrations of the inhibitor, from 0 to 100 µM. After incubation, the reaction products were analyzed by western blotting with AMC antibodies specific for modified citrullinated proteins and with anti-Tetra-His antibody specific for the poly-His tag (Fig. 1). When FLG-His was incubated with PADs and without inhibitor, a shift of its apparent molecular mass, from around 40 kDa (when not deiminated) up to around 75 kDa, was observed, as previously described [30, 4, 22, 2, 24], and was more or less important according to the PAD isotype (Fig. 1, lower panel). A clear decrease of FLG deimination was observed from Cl-amidine concentrations of 3.125, 50 and 25 µM for PAD1, PAD2 and PAD3, respectively (Fig. 1, upper panel). The inhibitory effect of Cl-amidine was confirmed by western blotting with the anti-Tetra-His antibody (Fig. 1, lower panel). Indeed, as the concentration of Cl-amidine increased, a progressive decreased of the apparent molecular mass

of FLG-His was observed, and the band corresponding to the not deiminated FLG finally reappeared (around 40 kDa). The maximum effect is obtained from 12.5 µM of Cl-amidine for PAD1 and from around 50 µM for PAD2 and PAD3. Altogether, those results showed that Cl-amidine was more specific for PAD1 than for PAD2 and PAD3 but was nevertheless able to inhibit the activity of the three isotypes.

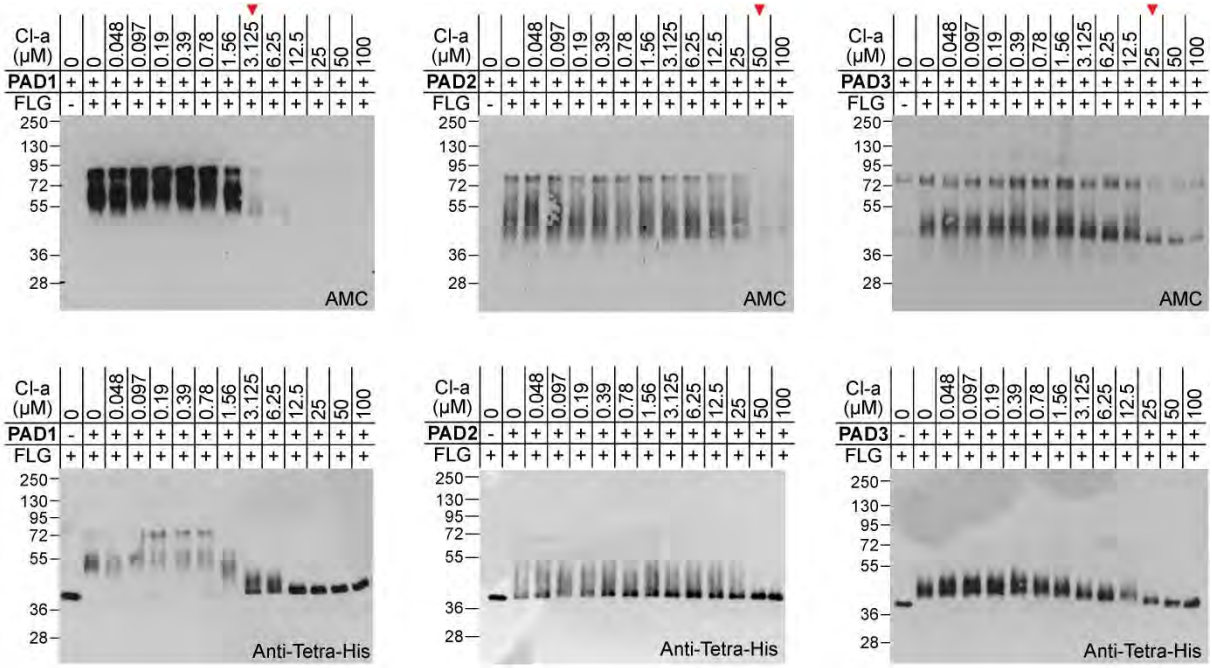


Fig. 1. *In vitro* efficiency of Cl-amidine against the activity of epidermal PADs. Purified recombinant FLG-His (100 ng/assay) was incubated at 37°C with recombinant PAD1, PAD2 or PAD3, and Cl-amidine at different concentrations (from 0 to 100 µM). The reaction products were then analyzed by western blotting with an antibody directed to modified citrullines (AMC) and with an anti-Tetra-His antibody specific for the poly-His tag. The arrow head indicates the concentration of Cl-amidine from which an inhibitory effect on FLG demination is clearly observed. Molecular mass markers are indicated in kDa on the left of each blot. Note that deimination induces a progressive increase in the apparent molecular mass of FLG, up to around 75 kDa for the totally deiminated form.

3.2. Expression and activity of PAD1 and PAD3 in the RHE

RHEs were produced with primary keratinocytes from normal human skin as previously described [25, 26]. In order to test for the expression and activity of PADs in this *in vitro* model, RHEs were harvested at different culture times, from 4 to 12 days after the beginning of the air-liquid interface exposure, and deimination was analyzed by indirect immunofluorescence and western blotting with the AMC antibodies (Fig 2A and B). By immunofluorescence staining, deiminated proteins were detected only in the cornified layer of RHEs, as previously observed in human epidermis [10], and their detection intensity increased from day 6 to stabilize around day 10, as shown by western blotting. The expression of PADs was then analyzed by RT-qPCR. *PADI4* and *PADI6* transcripts were not detected in RHEs, as expected since they are not expressed in human epidermis (data not

shown). RHEs showed no *PADI2* expression under the experimental conditions used (data not shown), whereas it is known to be expressed in human epidermis [1, 2, 31]. *PADI1* and *PADI3* were expressed in RHEs (Fig. 2C). The steady-state *PADI1* mRNA level increased in RHEs from day 4 to day 10, and tend to reach the level observed in the normal human epidermis. The *PADI3* mRNA level did not significantly vary between day 4 and day 10, but was surprisingly much higher than in the normal human epidermis (100 ± 24% versus 3%). PAD1 and PAD3 were also detected in RHEs by indirect immunofluorescence and presented a similar expression pattern than in the normal human epidermis, as previously described [4, 20, 21] (Fig. 2D). PAD1 was detected in all the living cells of RHEs while PAD3 was observed only in the granular layer. In the light of these results, RHEs was harvested at day 10 for the rest of the study.

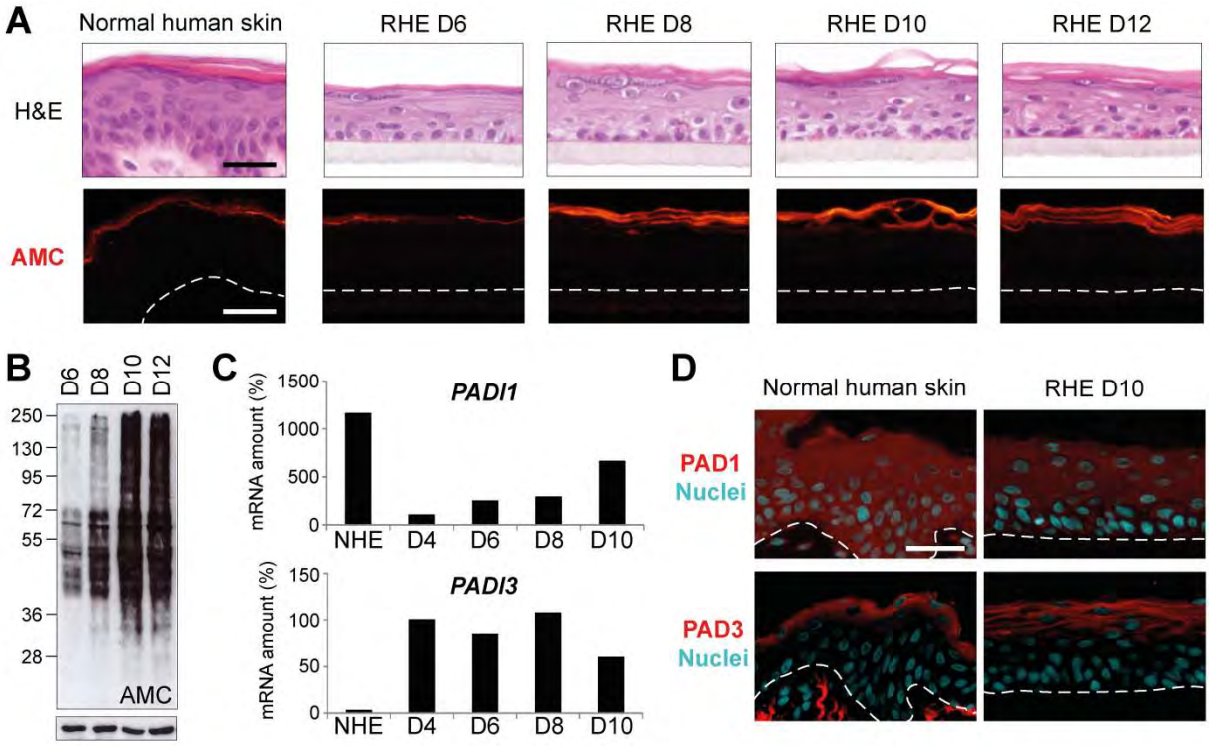


Fig. 2. Deimination and PAD1 and PAD3 expression in RHEs. (A) Sections of paraffin-embedded normal human skin and RHEs harvested after 6, 8, 10 and 12 days of culture at the air-liquid interface (D6 to D12) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by indirect immunofluorescence with the AMC antiserum. (B) Total protein extracts of RHEs harvested after 6, 8, 10 and 12 days of culture at the air-liquid interface were separated by SDS-PAGE and immunodetected with the AMC antibody and with an anti-actin antibody (lower part). Molecular mass markers are indicated in kDa on the left. (C) Total RNA extracts were prepared from a normal human epidermis sample (NHE) and RHEs specimens harvested 4, 6, 8 and 10 days after air-liquid exposure (D4 to D10) and reverse-transcribed. The steady-state *PADI1* and *PADI3* mRNA levels were quantified by qPCR using *YWHAZ* mRNA level as reference for normalization. (D) Paraffin-embedded sections of RHEs harvested after 10 days of culture at the air-liquid interface were analyzed by indirect immunofluorescence with anti-peptide antibodies specific for PAD1 and for PAD3. (A, D) The polycarbonate filter and dermo-epidermal junctions are indicated by white dashed lines. Scales bar = 25 µm.

3.3. Dose-dependent inhibition of protein deimination in RHEs by Cl-amidine

In order to evaluate the efficacy of Cl-amidine to inhibit PAD activity in RHEs, Cl-amidine was added in the culture medium of RHEs at day 8. Various concentrations of inhibitor were tested: 0, 100, 200, 400 and 800 µM. RHEs were harvested 48 hours after the beginning of the treatment, at day 10, and the total proteins were extracted in Laemmli buffer and analyzed by western blotting with the AMC antibodies. The deimination level in each epidermis was quantified by densitometry relatively to the quantity of total proteins detected by Ponceau staining, and normalized on the value obtained for control RHEs (0 µM of Cl-amidine). Cl-amidine treatment induced a decrease of the total quantity of deiminated proteins in RHEs in a dose-dependent manner (Fig. 3A). At 800 µM of Cl-amidine, the deimination rate was significantly reduced to a mean of 55 ± 30% ($p = 0.014$; $n = 6$; Fig. 3A and B). As the highest effect of Cl-amidine was obtained with a concentration of 800 µM, this concentration was used for the rest of the study.

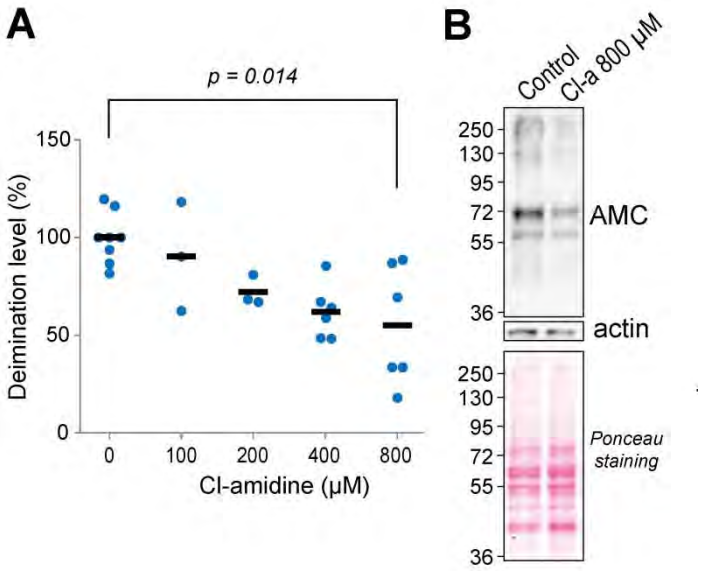


Fig. 3. Dose-dependent inhibition of deimination in RHEs treated with Cl-amidine. RHEs were treated with Cl-amidine at different concentrations (0, 100, 200, 400 or 800 µM) for 48 hours and harvested at day 10 after air-liquid exposure. Total protein extracts were prepared, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting using the AMC antibody. (A) Immunodetected deiminated proteins were quantified, normalized on ponceau staining and expressed in percentage relatively to the value of the control RHEs (Cl-amidine at 0 µM). Each individual value is represented by a dot and means are represented by dashes. (B) Representative blot of total protein extracts from RHEs produced without Cl-amidine (Control) or treated with 800 µM of Cl-amidine. Molecular mass markers are indicated in kDa on the left.

3.4. Slowdown of cornification in RHEs treated with Cl-amidine

The consequence of Cl-amidine treatment was first analyzed using hematoxylin and eosin staining of RHEs ($n = 4$; Fig. 4A). RHEs treated with 800 µM of Cl-amidine presented a similar morphology than the controls. Moreover, Cl-amidine did not significantly decrease the cell viability as shown with an MTT assay (Fig. 4B). To study the effect of Cl-amidine on RHEs at the ultrastructural level,

transmission electron microscopy analysis was performed. A clear increased of the number of transitional cells located between granular and cornified layers was observed in RHEs treated with Cl-amidine as compared with controls (Fig. 4C). These cells were characterized by a marked cornified envelope, numerous vesicles and diffused large granules in their cytoplasm, and sometimes by persistent nucleus. These particular characteristics are all the previously described hallmarks of transitional cells [32, 33] (Fig. 4.D). The frequency of observation of transitional cells, then quantified as described in the 'materials and methods' section, was increased after Cl-amidine treatment (13 ± 1% versus 88 ± 21%; p = 0.005; n = 4; Fig. 4E). Accordingly, the number of corneocyte layers was shown to be significantly decreased (15.5 ± 4.3 in control RHEs versus 12.2 ± 2.6 in Cl-amidine treated RHEs; p = 0.050; n = 4; Fig. 4F). Altogether, these results suggested that Cl-amidine slowed the transformation of granular cells to corneocytes, and thus increased the number of transitional cells. This is the first demonstration that PAD inhibition could affect cornification in human epidermis.

3.5. Disturbed autophagy in the granular keratinocyte cytoplasm of RHEs treated with Cl-amidine

By transmission electron microscopy analysis, accumulations of heterogeneous vesicles in the cytoplasm of the granular keratinocytes were observed in RHEs treated with Cl-amidine, while this kind of vesicles was sparse in the granular cells of control RHEs. Moreover, large vesicles were sometimes observed near to the nucleus in the granular layer of treated RHEs (Fig. 5A). These vesicles were suspected to be autophagic and nucleophagic vesicles, that have previously been observed in the granular layer of the epidermis [34]. Abnormal accumulations of mitochondria were often visible in the cytoplasm of granular keratinocytes of RHEs treated with Cl-amidine (Fig. 5B). This features could be related to an altered authophagic process. In order to verify this hypothesis, total protein extracts of control RHEs and Cl-amidine treated RHEs were analyzed by western blotting with an antibody directed to LC3B, a marker of autophagy. LC3B is known to be present under two forms in the cells, the conversion of the soluble LC3B-I (~16kDa) to the lipid bound LC3B-II (~14 kDa) being associated with the formation of autophagic vesicles [35]. In RHEs treated with Cl-amidine, the total detection of LC3B and the detection of LC3B-II were significantly increased as compared with control RHEs (LC3B-II: 90 ± 7% versus 254 ± 21%, p = 0.0007; n = 4; Fig. 5C), indicating an accumulation of autophagic vesicles in the treated samples. These results showed that Cl-amidine treatment disturbed the normal autophagic flux in the granular layer of the epidermis.

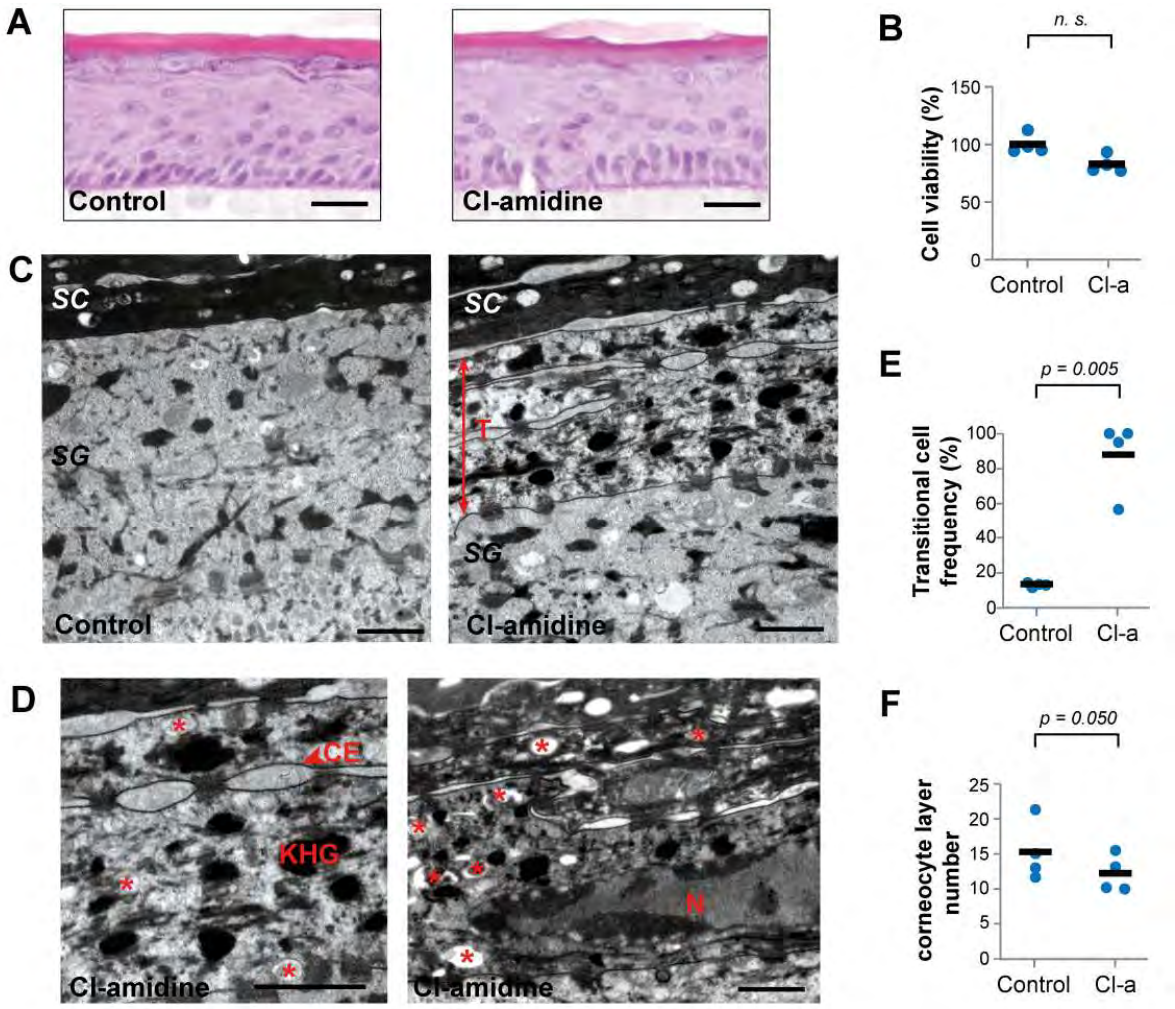


Fig. 4. Increase of transitional cells frequency and decrease of corneocyte number in RHEs treated with Cl-amidine. (A) Sections of paraffin-embedded normal RHEs treated with 0 µM (Control) and 800 µM of Cl-amidine during 48 hours were stained with hematoxylin and eosin (n = 4). Scale bar = 25 µm. (B) The cell viability of RHEs treated with 0 µM (Control) and 800 µM of Cl-amidine (Cl-a) was evaluated using a MTT assay. (C) RHEs treated with 0 µM (Control) and 800 µM of Cl-amidine were analyzed by transmission electron microscopy with focuses on the area of transition between the granular layer (*stratum granulosum*: SG) and the cornified layer (*stratum corneum*: SC) (n = 4). Transitional cells (T) were frequently observed in RHEs treated with Cl-amidine. Scale bars = 1 µm. (D) Focus on transitional cells in an RHE treated with 800 µM of Cl-amidine. Transitional cells are characterized by the presence of a marked cornified envelope (CE), diffuse keratohyalin granules (KHG) and vesicles (indicated by asterisks). Nuclei (N) were sometimes observed in these cells. Scale bars = 1 µm. (E) The frequency of transitional cells observation in RHEs treated with 0 µM (Control) and 800 µM (Cl-a) was quantified as described in the 'Materials and methods' section. (F) The number of corneocytes layers was quantified as described in the 'Materials and methods' section. For (B, E and F), mean value for each RHE was represented by a blue dot and means of all experiments by a black dash (n = 4).

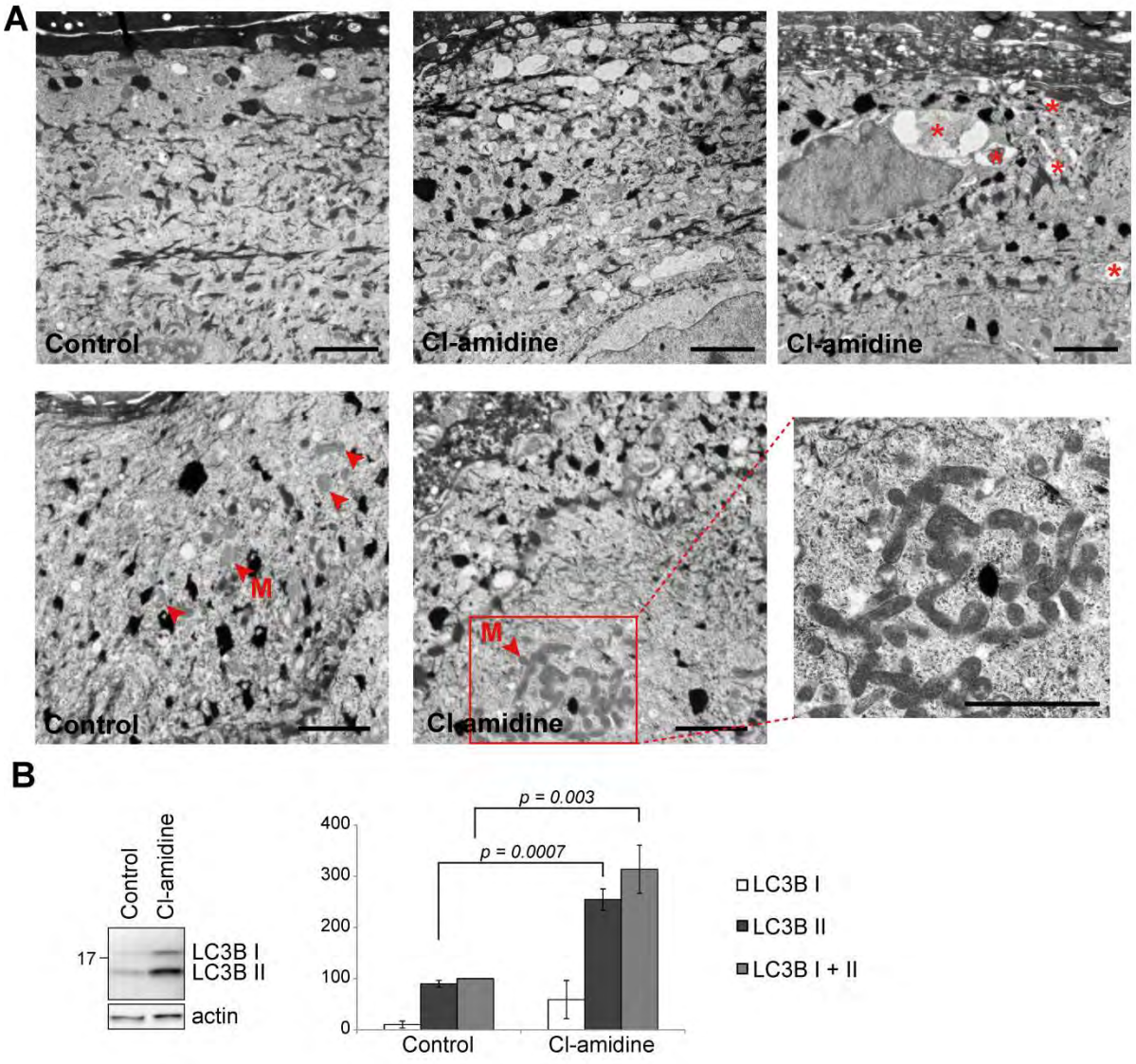


Fig. 5. Accumulation of autophagic vesicles and mitochondria in the cytoplasm of granular cells in RHEs treated with Cl-amidine. (A) RHEs treated with 0 µM (Control) and 800 µM of Cl-amidine during 48 hours were analyzed by transmission electron microscopy with focuses on the granular layer (n = 4). Vesicles are indicated by asterisks and mitochondria (M) by red arrow heads. Scale bars = 1 µm. (B) Total protein extracts of RHEs treated with 0 µM (Control) and 800 µM of Cl-amidine were separated by SDS-PAGE and immunodetected with anti-LC3B and anti-actin antibodies. Molecular mass marker is indicated in kDa on the left. Immunodetected LC3B I, LC3B II and total LC3B (corresponding to LC3B I + II) were quantified, normalized on actin detection and expressed in percentage relatively to the total LC3B intensity value of the control RHEs (n = 4).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowlegements

We are indebted to Dr Pascal Descargues (Genoskin, Toulouse, France) for the human skin samples. We thank Pr. Yves Poumay (University of Namur, Belgium) and Dr. Valérie Pendaries-Rahoul (UDEAR) for their useful advice on RHE production. We acknowledge all members of electron microscopy (CMEAB, Toulouse University), histopathology and cellular imaging (Toulouse Rio Imagerie, INSERM U1043) facilities. We thank Candide Alioli who participates to this work during his master internship. This work was supported by grants from CNRS, Toulouse University, INSERM and the French Society for Dermatology (SFD). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Laura Cau was supported by the French Ministry of Research and Technology, and gratefully acknowledges the SILAB–Jean PAUFIQUE Corporate Foundation for its support.

References

[1] S. Chavanas, M.-C. Méchin, H. Takahara, A. Kawada, R. Nachat, G. Serre, M. Simon, Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6, Gene. 330 (2004) 19–27. doi:10.1016/j.gene.2003.12.038.

[2] M.-C. Méchin, F. Coudane, V. Adoue, J. Arnaud, H. Duplan, M. Charveron, A.-M. Schmitt, H. Takahara, G. Serre, M. Simon, Deimination is regulated at multiple levels including auto-deimination of peptidylarginine deiminases, Cell. Mol. Life Sci. 67 (2010) 1491–1503. doi:10.1007/s00018-010-0262-5.

[3] C. Assohou-Luty, R. Raijmakers, W.E. Benckhuijsen, J. Stammen-Vogelzangs, A. de Ru, P.A. van Veelen, K.L.M.C. Franken, J.W. Drijfhout, G.J.M. Pruijn, The human peptidylarginine deiminases type 2 and type 4 have distinct substrate specificities, Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics. 1844 (2014) 829–836. doi:10.1016/j.bbapap.2014.02.019.

[4] R. Nachat, M.-C. Méchin, H. Takahara, S. Chavanas, M. Charveron, G. Serre, M. Simon, Peptidylarginine Deiminase Isoforms 1–3 Are Expressed in the Epidermis and Involved in the Deimination of K1 and Filaggrin, J. Invest. Dermatol. 124 (2005) 384–393. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23568.x.

[5] E.A.V. Moelants, A. Mortier, J. Van Damme, P. Proost, T. Loos, Peptidylarginine deiminases: physiological function, interaction with chemokines and role in pathology, Drug Discov. Today Technol. 9 (2012) e261–e280. doi:10.1016/j.ddtec.2012.06.002.

[6] M.-C. Méchin, M. Sebbag, J. Arnaud, R. Nachat, C. Foulquier, V. Adoue, F. Coudane, H. Duplan, A.-M. Schmitt, S. Chavanas, M. Guerrin, G. Serre, M. Simon, Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases, Int. J. Cosmet. Sci. 29 (2007) 147–168. doi:10.1111/j.1467-2494.2007.00377.x.

[7] Z. Baka, B. György, P. Géher, E.I. Buzás, A. Falus, G. Nagy, Citrullination under physiological and pathological conditions, Joint Bone Spine. 79 (2012) 431–436. doi:10.1016/j.jbspin.2012.01.008.

[8] S. Wang, Y. Wang, Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis, Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech. 1829 (2013) 1126–1135. doi:10.1016/j.bbagrm.2013.07.003.

[9] M.A. Christophorou, G. Castelo-Branco, R.P. Halley-Stott, C.S. Oliveira, R. Loos, A. Radzisheuskaya, K.A. Mowen, P. Bertone, J.C.R. Silva, M. Zernicka-Goetz, M.L. Nielsen, J.B. Gurdon, T. Kouzarides, Citrullination

regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin, Nature. 507 (2014) 104–108. doi:10.1038/nature12942.
[10] T. Senshu, S. Kan, H. Ogawa, M. Manabe, H. Asaga, Preferential Deimination of Keratin K1 and Filaggrin during the Terminal Differentiation of Human Epidermis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 225 (1996) 712–719. doi:10.1006/bbrc.1996.1240.
[11] C.-Y. Hsu, J. Henry, A.-A. Raymond, M.-C. Méchin, V. Pendaries, D. Nassar, B. Hansmann, S. Balica, O. Burlet-Schiltz, A.-M. Schmitt, H. Takahara, C. Paul, G. Serre, M. Simon, Deimination of Human Filaggrin-2 Promotes Its Proteolysis by Calpain 1, J. Biol. Chem. 286 (2011) 23222–23233. doi:10.1074/jbc.M110.197400.
[12] C.-Y. Hsu, G. Gasc, A.-A. Raymond, O. Burlet-Schiltz, H. Takahara, G. Serre, M.-C. Méchin, M. Simon, Deimination of Human Hornerin Enhances its Processing by Calpain-1 and its Cross-Linking by Transglutaminases, J. Invest. Dermatol. (2016). doi:10.1016/j.jid.2016.09.030.
[13] J.D. Lonsdale-Eccles, D.C. Teller, B.A. Dale, Characterization of a phosphorylated form of the intermediate filament-aggregating protein filaggrin, Biochemistry (Mosc.). 21 (1982) 5940–5948.
[14] M. Simon, M. Haftek, M. Sebbag, M. Montézin, E. Girbal-Neuhauser, D. Schmitt, G. Serre, Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis., Biochem. J. 317 (1996) 173–177.
[15] C.R. Harding, I.R. Scott, Histidine-rich proteins (filaggrins): Structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation, J. Mol. Biol. 170 (1983) 651–673. doi:10.1016/S0022-2836(83)80126-0.
[16] Y. Kamata, A. Taniguchi, M. Yamamoto, J. Nomura, K. Ishihara, H. Takahara, T. Hibino, A. Takeda, Neutral Cysteine Protease Bleomycin Hydrolase Is Essential for the Breakdown of Deiminated Filaggrin into Amino Acids, J. Biol. Chem. 284 (2009) 12829–12836. doi:10.1074/jbc.M807908200.
[17] F. Coudane, M.-C. Mechin, A. Huchenq, J. Henry, R. Nachat, A. Ishigami, V. Adoue, M. Sebbag, G. Serre, M. Simon, Deimination and expression of peptidylarginine deiminases during cutaneous wound healing in mice, Eur. J. Dermatol. EJD. 21 (2011) 376–384. doi:10.1684/ejd.2011.1394.
[18] Y. Luo, K. Arita, M. Bhatia, B. Knuckley, Y.-H. Lee, M.R. Stallcup, M. Sato, P.R. Thompson, Inhibitors and Inactivators of Protein Arginine Deiminase 4: Functional and Structural Characterization, Biochemistry (Mosc.). 45 (2006) 11727–11736. doi:10.1021/bi061180d.
[19] B. Knuckley, C.P. Causey, J.E. Jones, M. Bhatia, C.J. Dreyton, T.C. Osborne, H. Takahara, P.R. Thompson, Substrate Specificity and Kinetic Studies of PADs 1, 3, and 4 Identify Potent and Selective Inhibitors of Protein Arginine Deiminase 3, Biochemistry (Mosc.). 49 (2010) 4852–4863. doi:10.1021/bi100363t.
[20] T. Kanno, M. Shiraiwa, H. Takahara, A. Kawada, T. Tezuka, J. Yamanouchi, C. Yosida-Noro, A. Yoshiki, M. Kusakabe, M. Manabe, Human Peptidylarginine Deiminase Type III: Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the cDNA, Properties of the Recombinant Enzyme, and Immunohistochemical Localization in Human Skin, J. Invest. Dermatol. 115 (2000) 813–823. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00131.x.
[21] M. Guerrin, A. Ishigami, M.-C. Méchin, R. Nachat, S. Valmary, M. Sebbag, M. Simon, T. Senshu, G. Serre, cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I., Biochem. J. 370 (2003) 167–174. doi:10.1042/BJ20020870.
[22] M.-C. Méchin, M. Enji, R. Nachat, S. Chavanas, M. Charveron, A. Ishida-Yamamoto, G. Serre, H. Takahara, M. Simon, The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 1984–1995. doi:10.1007/s00018-005-5196-y.
[23] T. Senshu, K. Akiyama, S. Kan, H. Asaga, A. Ishigami, M. Manabe, Detection of Deiminated Proteins in Rat Skin: Probing with a Monospecific Antibody After Modification of Citrulline Residues, J. Invest. Dermatol. 105 (1995) 163–169. doi:10.1111/1523-1747.ep12317070.
[24] M.-C. Méchin, L. Cau, M.-F. Galliano, S. Daunes-Marion, S. Poigny, J.-L. Vidaluc, S. Bessou-Touya, H. Takahara, G. Serre, H. Duplan, M. Simon, Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis, J. Dermatol. Sci. 81 (2016) 101–106. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.11.006.
[25] A. Frankart, J. Malaisse, E. De Vuyst, F. Minner, C.L. de Rouvroit, Y. Poumay, Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface, Exp. Dermatol. 21 (2012) 871–875. doi:10.1111/exd.12020.
[26] V. Pendaries, J. Malaisse, L. Pellerin, M. Le Lamer, R. Nachat, S. Kezic, A.-M. Schmitt, C. Paul, Y. Poumay, G. Serre, M. Simon, Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation, J. Invest. Dermatol. 134 (2014) 2938–2946. doi:10.1038/jid.2014.259.
[27] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, Nat. Protoc. 3 (2008) 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.

[28] M. Reynier, S. Allart, E. Gaspard, A. Moga, D. Goudounèche, G. Serre, M. Simon, C. Leprince, Rab11a Is Essential for Lamellar Body Biogenesis in the Human Epidermis, J. Invest. Dermatol. 136 (2016) 1199–1209. doi:10.1016/j.jid.2016.02.001.

[29] A. Frankart, A. Coquette, K.-R. Schroeder, Y. Poumay, Studies of cell signaling in a reconstructed human epidermis exposed to sensitizers: IL-8 synthesis and release depend on EGFR activation, Arch. Dermatol. Res. 304 (2012) 289–303. doi:10.1007/s00403-012-1209-5.

[30] E. Tarcsa, L.N. Marekov, G. Mei, G. Melino, S.-C. Lee, P.M. Steinert, Protein Unfolding by Peptidylarginine Deiminase SUBSTRATE SPECIFICITY AND STRUCTURAL RELATIONSHIPS OF THE NATURAL SUBSTRATES TRICHOHYALIN AND FILAGGRIN, J. Biol. Chem. 271 (1996) 30709–30716. doi:10.1074/jbc.271.48.30709.

[31] A. Ishigami, T. Ohsawa, H. Asaga, K. Akiyama, M. Kuramoto, N. Maruyama, Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin, Arch. Biochem. Biophys. 407 (2002) 25–31. doi:10.1016/S0003-9861(02)00516-7.

[32] T.E. Nix, R.E. Nordquist, M.A. Everett, Ultrastructural changes induced by ultraviolet light in human epidermis: Granular and transitional cell layers, J. Ultrastruct. Res. 12 (1965) 547–573. doi:10.1016/S0022-5320(65)80047-8.

[33] I.M. Leigh, E.B. Lane, F.M. Watt, The Keratinocyte Handbook, Cambridge University Press, 1994.

[34] O. Akinduro, K. Sully, A. Patel, D.J. Robinson, A. Chikh, G. McPhail, K.M. Braun, M.P. Philpott, C.A. Harwood, C. Byrne, R.F.L. O'Shaughnessy, D. Bergamaschi, Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation, J. Invest. Dermatol. 136 (2016) 1460–1470. doi:10.1016/j.jid.2016.03.016.

[35] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, Methods in Mammalian Autophagy Research, Cell. 140 (2010) 313–326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028.

ARTICLE N°3

Des mutations des gènes codant pour la peptidyl-arginine désiminase 3, la transglutaminase 3 et la trichohyaline sont responsables du syndrome des cheveux incoiffables

F. Buket Ü. Basmanav, Laura Cau, Aylar Tafazzoli, Marie-Claire Méchin, Sabrina Wolf, Maria Teresa Romano, Frederic Valentin, Henning Wiegmann, Anne Huchenq, Rima Kandil, Natalie Garcia Bartels, Arzu Kilic, Susannah George, Damian J. Ralser, Stefan Bergner, David J. P. Ferguson, Ana-Maria Oprisoreanu, Maria Wehner, Holger Thiele, Janine Altmüller, Peter Nürnberg, Daniel Swan, Darren Houniet, Aline Büchner, Lisa Weibel, Nicola Wagner, Ramon Grimalt, Anette Bygum, Guy Serre, Ulrike Blume-Peytavi, Eli Sprecher, Susanne Schoch, Vinzenz Oji, Henning Hamm, Paul Farrant, Michel Simon et Regina C. Betz

Accepté pour publication dans "The American Journal of Human Genetics"

Résumé :

Le syndrome des cheveux incoiffables (SCI), aussi appelé « *pili trianguli et canaliculi* », est une anomalie rare du cheveu qui apparaît chez l'enfant et s'améliore avec l'âge. Ce syndrome est caractérisé par des cheveux secs, frisés, brillants, et si ébourrifés qu'il est impossible de les applatir. L'analyse microscopique des cheveux révèle une gouttière longitudinale sur la longueur de la tige pilaire avec une section triangulaire ou en forme de rein. Jusqu'à aujourd'hui, des cas isolés et des cas familiaux héréditaires, avec un mode de transmission autosomique dominante aussi bien qu'autosomique récessive, ont été rapportés. Aucun de ces cas n'a cependant permis d'identifier la cause génétique de la maladie. Dans cette étude, nous rapportons l'identification de mutations génétiques responsables du SCI, dans les trois gènes *PADI3* (codant la peptidylarginine désiminase 3 ou PAD3), *TGM3* (codant la transglutaminase 3 ou TGase 3) et *TCHH* (codant la trichohyaline ou TCHH). Ces mutations ont été mises en évidence sur un total de onze enfants. Tous sont porteurs de mutations homozygotes ou hétérozygotes composites sur l'un des trois gènes, avec un mode de transmission héréditaire à caractère autosomique récessif. Les PAD3 et TGase 3, deux enzymes responsables de modifications post-traductionnelles, et la TCHH, une protéine structurale qui constitue une de leurs cibles, sont impliquées dans la formation de la tige pilaire. La mutation du gène *TCHH* identifiée aboutit à la synthèse, si elle a lieu, d'une forme très courte de TCHH, probablement incapable d'interagir avec les kératines. Grâce à l'expression de formes recombinantes des PAD3 et TGase 3 sauvages et mutées (produites par mutagènese dirigée) dans des cellules en culture et à la modélisation *in silico* de la structure des enzymes, nous avons montré que les mutations des gènes *PADI3* et *TGM3* induisent des modifications structurales et une nette dimunition de l'activité des enzymes correspondantes. De plus, des observations en microscopie électronique à balayage ont révélé une altération de la morphologie des poils de souris invalidées pour le gène *Padi3,* avec une surface irrégulière comme martelée. L'ensemble de ces résultats a permis de découvrir les causes génétiques et moléculaires du SCI et ainsi de mieux en comprendre la physiopathologie. Cette étude a de plus mis en lumière le rôle essentiel de la cascade PAD3 – TCHH – TGase 3 dans la physiologie du follicule pileux.

Dans cette vaste étude, la modélisation *in silico* de la structure des PAD3 sauvage et mutées, l'analyse histologique des PAD3 exprimées dans des cellules HaCat, l'expression de ces mêmes enzymes dans des bactéries et son analyse, et l'étude des poils de souris invalidées pour le gène *Padi3* ont été réalisées à Toulouse. J'ai personnellement participé aux prélèvements et à l'analyse des poils de souris et j'ai été en charge de l'ensemble des expérimentations d'histologie. J'ai notamment passé du temps à mettre au point l'analyse des cheveux de patients en histologie mais cela n'a malheureusement pas abouti du fait de la mauvaise qualité des prélèvements (cheveux arrachés, en phase télogène). J'ai aussi participé à la relecture du papier.

Mutations in three genes encoding proteins involved in hair shaft formation cause uncombable hair syndrome

Running head: Molecular genetics of uncombable hair syndrome

F. Buket Ü. Basmanav,[1,2] Laura Cau,[3,21] Aylar Tafazzoli,[1,21] Marie-Claire Méchin,[3,21] Sabrina Wolf,[1] Maria Teresa Romano,[1] Frederic Valentin,[4] Henning Wiegmann,[4] Anne Huchenq,[3] Rima Kandil,[1] Natalie Garcia Bartels,[5] Arzu Kilic,[6] Susannah George,[7] Damian J. Ralser,[1] Stefan Bergner,[1] David J. P. Ferguson,[8] Ana-Maria Oprisoreanu,[9] Maria Wehner,[1] Holger Thiele,[10] Janine Altmüller,[10, 11] Peter Nürnberg,[10, 12, 13] Daniel Swan,[14] Darren Houniet,[14] Aline Büchner,[15] Lisa Weibel,[15] Nicola Wagner,[16] Ramon Grimalt,[17] Anette Bygum,[18] Guy Serre,[3] Ulrike Blume-Peytavi,[5] Eli Sprecher,[19] Susanne Schoch,[9] Vinzenz Oji,[4] Henning Hamm,[20] Paul Farrant,[7] Michel Simon,[3, 21] Regina C. Betz[1, 21, *]

[1]Institute of Human Genetics, University of Bonn, D-53127 Bonn, Germany
[2]Department of Neuro- and Sensory Physiology, University Medical Center Göttingen, D-37073 Göttingen, Germany
[3]CNRS UMR5165 and INSERM U1056 and University of Toulouse, F-31059 Toulouse, France
[4]Department of Dermatology, University of Münster, D-48149 Münster, Germany
[5]Clinical Research Center for Hair and Skin Science, Department of Dermatology and Allergy, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, D-10117, Germany
[6]Balikesir University School of Medicine, Dermatology Department, TR-10100 Balikesir, Turkey
[7]Dermatology Department, Brighton and Sussex University Hospitals NHS Trust, Brighton General Hospital, Elm Grove Brighton, BN2 3EW, UK
[8] Nuffield Department of Clinical Laboratory Science, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, OX3 9DU, UK
[9]Department of Neuropathology and Department of Epileptology, University of Bonn, D-53127 Bonn, Germany
[10]Cologne Center for Genomics, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany
[11]Institute of Human Genetics, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany
[12]Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany
[13]Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany
[14]Computational Biology Group, Oxford Gene Technology, Oxford, OX5 1PF, UK
[15] Pediatric Dermatology Department, University Children's Hospital Zurich, University Hospital of Zurich, Zurich, Switzerland
[16]Clinical Center Darmstadt, D-64297 Darmstadt, Germany
[17]Universitat Internacional de Catalunya, ES-08195 Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain
[18]Department of Dermatology and Allergy Centre, Odense University Hospital, DK-5000 Odense, Denmark
[19]Department of Dermatology, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv 64239, Israel
[20]Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Hospital Würzburg, D-97080 Würzburg, Germany
[21]These authors contributed equally to this work.
**Correspondence should be addressed to R. C. B. (*regina.betz@uni-bonn.de).

Abstract

Uncombable hair syndrome (UHS), also known as “spun glass hair syndrome”, “*pili trianguli et canaliculi*”, or “cheveux incoiffables” is a rare anomaly of the hair shaft which occurs in children and improves with age. UHS is characterized by dry, frizzy, spangly and often fair hair that is resistant to being combed flat. Up to date both simplex and familial UHS cases with autosomal dominant as well as recessive inheritance have been reported. However, none of these cases were linked to a molecular genetic cause. Here, we report the identification of UHS causative mutations located in the three genes *PADI3 (*peptidylarginine deiminase 3*)*, *TGM3 (*transglutaminase 3*)* and *TCHH (*trichohyalin) in a total of eleven children. All of these individuals carry homozygous or compound heterozygous mutations in one of these three genes, indicating an autosomal recessive inheritance pattern in the majority of UHS cases. The two enzymes PADI3 and TGM3, responsible for posttranslational protein modifications, and their target structural protein TCHH, are all involved in hair shaft formation. Elucidation of the molecular outcomes of the disease causing mutations by cell culture experiments and tridimensional protein models demonstrated clear differences in the structural organization and activity of mutant and wild type proteins. Scanning electron microscopy observations revealed morphological alterations in hair coat of *Padi3* knockout mice. All together, these findings elucidate the molecular genetic causes of UHS and shed light on its pathophysiology, and hair physiology in general.

Introduction

UHS [MIM 191480], was first described as a distinctive hair shaft defect in 1973.[1; 2] However, the phenotype had been recognized far earlier and had obtained notoriety as the famous literary character ‘Struwwelpeter-Shockheaded Peter’ from the children’s story published by the German physician Heinrich Hoffmann in 1845. This was later translated by Mark Twain to English as ‘Slovenly Peter’. Up to now about 100 UHS cases have been reported.[e.g. 3-5] Most of the cases are simplex occurrences but autosomal dominant or recessive inheritance patterns were also observed. In majority of the cases, UHS is an isolated condition of the hair, but it has occassionally been observed with additional symptoms, such as ectodermal dysplasias, retinopathia pigmentosa, juvenile cataract, and polydactyly. Isolated UHS is characterized by silvery, blond or straw colored scalp hair that is dry, frizzy and wiry, has a characteristic sheen, stands away from the scalp in multiple directions and is impossible to comb. This hair shaft disorder occurs in children and improves with age. The hair growth rate can range from slow to normal. The clinical diagnosis of UHS can be confirmed by scanning electron microscopy (SEM) analysis of hair shafts.[6-8] In at least 50% of the hair examined,

this reveals a triangular or heart-shaped cross-section, in comparison to the normal circular cross section, as well as longitudinal grooves along the entire length of the hair shaft.[9] The hair is not more fragile or brittle than normal hair. No effective therapy is yet available although biotin supplementation was reported to be successful in some cases.[10]

Up to date no genetic alteration had been linked to UHS although familial occurrence has been well observed. In this study, we report UHS causative mutations in *PADI3* [MIM 606755], *TGM3* [MIM 600238] and *TCHH* [MIM 190370], encoding for hair shaft proteins that display sequential interactions with each other. Transfection of cells with constructs encoding for wild type (WT) and mutant proteins showed that the identified *PADI3* and *TGM3* mutations have profound effects on enzymatic activity of the respective proteins. The observation of alterations in whiskers and hair coat of *Padi3* knockout mice confirms the essential role of this enzyme in hair shaft morphology. Altogether, our findings implicate that UHS occurs when interactions of a structural protein that gives shape and mechanical strength to the hair shaft are impaired by defects either in this protein itself or in others that mediate its interactions.

Materials and Methods

Study participants

Detailed information regarding the clinical descriptions of the individuals included in this study is given in the Supplemental Note: Case Reports. This study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. Ethical approval was obtained from the ethics committee of the Medical Faculty of the University of Bonn and the participants provided written informed consent prior to blood sampling. Written informed consents of the affected individuals or their legal guardians were obtained for the publication of the case photos included in this manuscript.

Scanning electron microscopy

Hair shafts from various individuals with UHS and controls were mounted on stubs and sputter coated with either gold or platinum prior to examination in either a FEI Quanta FEG250 or a Philips 505 scanning electron microscope.

Exome sequencing

Exome sequencing was performed in two different centers. The two affected siblings of the discovery family from UK were exome sequenced by Oxford Gene Technology's Genefficiency Sequencing Service. Genomic DNA (2 µg) was fragmented and enriched for human exonic sequences using the Human All Exon V5 Agilent Sure Select kit (Agilent Technologies) using the manufacturers protocol, and sequenced on the Illumina HiSeq 2000 platform using Truseq (v3 Chemistry) (Illumina)

to generate 100 base paired-end reads. Fastq files were mapped to the reference human genome (hg19/GRCh37) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) package (v0.6.2).[11] Local realignment of the mapped reads around potential insertion/deletion (indel) sites was carried with the Genome Analysis Tool Kit (GATK) v1.6.[12] Duplicate reads were marked using Picard v1.8 and BAM files were sorted and indexed with SAM tools v0.1.18.[13] Approximately 12 and 14 GB of sequence data was generated for these samples and a minimum of 90.83% and 80.54% of the targeted exome was covered to a depth of at least 20× and 30× coverage, respectively. We filtered the variants for high-quality homozygous or potentially compound heterozygous, novel variants [defined against dbSNP 132 inclusion] that are shared by both siblings and are deleterious based on either of the SIFT, Polyphen and Condel predictions.

The affected individuals from Germany and Turkey were exome sequenced at the Cologne Center for Genomics. For whole-exome sequencing, 1 µg of genomic DNA was fragmented with sonication technology (Bioruptor, Diagenode). The fragments were end-repaired and adaptor-ligated, including incorporation of sample index barcodes. After size selection, a pool of all 5 libraries was subjected to an enrichment process with the SeqCap EZ Human Exome Library version 2.0 kit (Roche NimbleGen). The final libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 2000 sequencing instrument (Illumina) with a paired-end 2× 100 bp protocol. Primary data were filtered according to signal purity by the Illumina Realtime Analysis (RTA) software v1.8. Subsequently, the reads were mapped to the human genome reference build hg19 using the BWA-aln alignment algorithm.[11] GATK v.1.6 was used to mark duplicated reads, to do a local realignment around short insertions and deletions, to recalibrate the base quality scores and to call SNPs and short Indels.[12] For the Turkish individual this resulted in 7.5 Gb of unique mapped sequences, a mean coverage of 94 and 30× coverage of 91% of the target sequences. For the German individual, this resulted in 8.1 Gb of unique mapped sequences, a mean coverage of 106 and 30× coverage of 92% of the target sequences. The Varbank pipeline v.2.10 and interface developed in-house at the Cologne Center for Genomics were used for data analysis and filtering (unpublished data, H.T., J.A., and P.N.). The GATK UnifiedGenotyper variation calls were filtered for high-quality (DP>15; AF>0.25 + VQSLOD >-8 if possible, otherwise: QD>2; MQ>40; FS<60; MQRankSum>-12.5; ReadPosRankSum>-8; HaplotypeScore <13) rare (MAF ≤ 0.005 based on 1000 genomes build 20110521 and EVS build ESP6500) variants, predicted to modify a protein sequence or to impair splicing, in homozygous or compound heterozygous state.

Sanger Sequencing

Amplicons were generated under standard polymerase chain reaction conditions by using primers presented in Tables S1-S3. Sanger sequencing was performed using the BigDye Terminator v1.1 Cycle

Sequencing kit (Applied Biosystems) and an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The data were analyzed using SeqMan II software (DNASTAR).

Molecular cloning and mammalian cell cultures

To construct the expression vectors for *PADI3* and *TGM3*, the coding sequences (cDNA) of *PADI3* (1995 bp) and *TGM3* (2082 bp), were amplified from hair follicle cDNA, and cloned into the TOPO cloning site of pcDNA 3.1/V5-His-TOPO vector (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. The mutant constructs (PADI3: c.335T>A [p.Leu112His], c.881C>T [p.Ala294Val], c.1813C>A [p.Pro605Thr] and TGM3: c.1351C>T [p.Gln451*]) were generated by targeted mutagenesis using QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to manufacturer's instructions. The constructs were verified by Sanger sequencing. The primers used for cloning and mutagenesis are listed in Table S4. The HaCaT human keratinocyte cell line was established by Boukamp et al. (1988).[14] The HEK293T cell line was a kind gift from Thomas Zillinger (Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University of Bonn). Both HaCaT and HEK293T cell lines were tested for mycoplasma contamination and confirmed to be mycoplasma free. Cells were maintained at 37^{o}C (5% CO_2) in DMEM (Lonza) supplemented with 10% FCS (Life Technologies), 1% Penicilin-streptomycin (10,000 U ml^{-1}, Life Technologies) and 1% Amphotericin B (250 µg ml^{-1}, Life Technologies). Cells were cultured in 10 cm Petri dishes and on coverslips in 24-well plates for western blotting and immunofluorescence analysis, respectively. Transfections were carried on using the Lipofectamine3000 Transfection Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. For each 10 cm plate, the following amounts of reagents were used: 15 µg plasmid, 1500 µl Opti-MEM (Life Technologies), 22.5 µl Lipofectamine3000 and 30 µl P3000 reagent. For each well in a 24-well plate, 0.5 µg of plasmid, 50 µl Opti-MEM, 1.5 µl Lipofectamine3000 and 1 µl P3000 reagent were used. Cells were harvested 48 h post-transfection.

Topological tridimensional models of PADI3

We constructed, as we had previously published,[15] a topological tridimensional model of WT PADI3 using the crystal atomic coordinates of calcium-bound human PADI4 (MIM 605347, Protein Data Bank accession number 1WDA).[16] On this basis, topological models of the tridimensional structure of the three mutated enzymes were produced after *in silico* substitutions of the respective amino acids. All the models were refined by energy minimization (3x3000 iterations) using the MSI insight II modules Biopolymer, CHARMM and Viewer on an O2 SGI station. Energetic potentials after minimization were all improved and validated. The three models were then validated by analyses of "Anolea data" and Ramachandran plots produced using the Swiss model expasy structure assessment tools and the Swiss-Pdb viewer software version 4.04, respectively. Finally, topological models of mutated PADI3 were individually compared to that of WT PADI3 after a magic fit on Swiss-

Pdb viewer. Solid ribbon representations were displayed to show overviews of the tridimensional structures or enlargements focused on either the catalytic sites or the five calcium binding sites.

Immunoblotting of HaCaT and HEK293T cell extracts

Cells were collected in ice-cold PBS and centrifuged at 150 x g at 4°C for 10 min. The cell pellets were re-suspended in 40 µl of 10x RIPA buffer (Cell Signaling Technology) and 360 µl Protease Inhibitor Cocktail (Roche), incubated on ice for 15 min and sonicated 10 times for 10 sec, with 10 sec breaks on ice. After centrifugation at 10,500 x g for 10 min at 4°C, the supernatants were transferred to clean tubes and purified with Micro Bio-Spin Columns (Bio-Rad Laboratories) according to manufacturer's instructions. Purified lysates were mixed with 4x Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories) diluted in β-mercaptoethanol. After protein separation on TGX stain-free gels 4-15% (Bio-Rad Laboratories), the proteins were transferred on PVDF membrane (Amersham Biosciences). Western blotting was carried out using the WesternBreeze chemiluminescent kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The following primary antibodies were used with an incubation duration of 1h: mouse monoclonal anti-V5 (1:5000, V8012, Sigma Aldrich) and rabbit monoclonal anti-PADI3 / PAD3 (1:400, ab172959, Abcam) for PADI3 detection, mouse monoclonal anti-Flag (1:5000, F1804, Sigma Aldrich) and rabbit polyclonal anti TGM3-C-terminal (1:250, OAAB12971, Aviva Systems Biology) for TGM3 detection. Membranes were developed using the ChemiDoc MP imager (Bio Rad) for a maximum of 20 min. Data in Figure 4A are representative of western blotting experiments from three independent transfections of HaCaT cells with *PADI3* constructs. Data in Figure 7A and Figure S7 emerge from six independent transfections of HaCaT (1x) and HEK293T (5x) cells with *TGM3* constructs. The relative quantities of WT and mutated TGM3 were assessed using Stain-Free technology that is based on total protein normalization (Bio-Rad Laboratories).[17]

Immunofluorescence analysis in HaCaT and HEK293T cells

Transiently transfected HaCaT and HEK293T cells grown on coverslips were washed with 1x PBS for 5 min, permeabilized for 10 min with 1% Triton X-100 and blocked for 1h in PBS containing 1% bovine serum albumin, 10% normal goat serum and 0.1% Triton X-100. The cells were incubated with mouse monoclonal anti-V5 primary antibody (1:100, V8012, Sigma Aldrich) or mouse monoclonal anti-Flag antibody (1:500, F1804, Sigma Aldrich) for PADI3 and TGM3, respectively, for 3h at RT (or overnight at 4^{o}C) and goat anti-mouse-cy3 secondary antibody (1:500, A10521, Life Technologies) with DAPI (D9542, Sigma Aldrich) for 40 min. The mounting was performed with Mowiol 4-88 (Roth). Images were captured with 63x or 10x oil immersion objectives using a Zeiss Axioplan 2 imaging microscope and the Cytovision 7.4 software. ImageJ was used for the analyses by applying the same brightness and contrast thresholds to all data. Data presented in Figure 4B and Figure 7B are

representative of analyses from four independent transfections of HaCaT cells with *PADI3* constructs and five independent transfections of HaCaT (3x) and HEK293T (2x) cells with *TGM3* constructs, respectively. Two to three coverslips were analyzed per construct at each transfection.

Activity of PADI3 in HaCaT cells

Transiently transfected HaCaT cells grown on coverslips were air-dried. For indirect immunofluorescence, the cells were rehydrated for 15 min in PBS and permeabilized for 10 min in PBS containing 1% Triton X-100, and then non-specific binding sites were blocked with PBS containing 2% fetal bovine serum and 1% Triton X-100. Slides were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-V5 (1:100, R960-25, Thermo Fisher Scientific) and ACPA antibodies (6 µg ml^{-1}) purified from a pool of sera of individuals with rheumatoid arthritis [MIM 180300] patient sera.[18; 19] Sera were from informed and consenting individuals attending the Rheumatology Center of Toulouse and have been declared to and approved by the Comité de Protection des Personnes Sud Ouest et Outre-Mer II (Toulouse, France). After incubation with the corresponding secondary antibodies, Alexa Fluor 488 Donkey anti-mouse IgG (1:10000, A21202, Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 555 Goat Anti-human IgG (H+L) (1:10000, A21433, Thermo Fisher Scientific), and DAPI (D9542, Sigma-Aldrich), slides were mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem Merck Millipore). Images were captured with 20x dry or 63x oil immersion objectives using a Zeiss apotome microscope (Carl Zeiss). ImageJ was used for the analyses by applying the same brightness and contrast thresholds to all data. Data presented in Figure 5A are representative of analyses from two independent transfections of HaCaT cells with three coverslips for each single *PADI3* construct.

Activity of PADI3 produced in *Escherichia coli*

E coli strain BL21(DE3)-pLysS (Life Technologies) were transformed with 5 ng of the recombinant expression plasmids (pcDNA3.1/V5-His-TOPO–*PADI3-WT*, pcDNA3.1/V5-His-TOPO–*PADI3-p.Leu112His*, pcDNA3.1/V5-His-TOPO–*PADI3-p.Arg294Val* and pcDNA3.1/V5-His-TOPO–*PADI3-p.Pro605Thr*) and grown at 37°C overnight on agar-Luria Broth plates (MP Biomedicals) supplemented with ampicillin (50 µg ml^{-1}) and chloramphenicol (34 µg ml^{-1}). Four clones were selected for each plasmid. After selection, the bacterial clones were grown in Luria Broth medium supplemented with ampicillin (50 µg ml^{-1}), at 37°C for 3 hours and then overnight at 30°C. Harvested bacteria were sonicated 4x8 seconds (6~10W) on ice in a Tris-HCl pH 7.6 buffer containing a cocktail of bacterial protease inhibitors (Sigma Aldrich). After centrifugation at 9,000 x g for 10 min, soluble proteins were recovered in the supernatants (clarified extracts).

To measure an *in vitro* deimination activity, the clarified extracts were incubated at 37°C in 100 mM Tris-HCl pH 7.6 buffer containing 10 mM CaCl2 and 5 mM DTT, for either 2 hours or overnight, under agitation at 1400 rpm.[20] The deimination reactions were stopped by boiling for 3 min in

Laemmli's sample buffer. The proteins were then separated by SDS-polyacrylamide (10%) gel electrophoresis and immunodetected with the V5 Epitope Tag monoclonal antibody (1:5000, R960-25, Thermo Fisher Scientific) and the anti-modified citrulline antibodies.[21; 22] The blots were developed using the ECL prime™ system (GE Healthcare) as described by the manufacturer. Immunoblotting signals were recorded using a G:Box™ Chemi XT4 imager and GeneTool analysis software (Syngene) for a maximum of 20 min.

After one bacteria transformation, two independent clones for p.Leu112His, three for p.Pro605Thr and four for WT and p.Ala294Val were analyzed, with identical results; only those corresponding to two clones are illustrated. Data are representative of two technical replicates. The V5-antibody detections of recombinant PADI3 were confirmed using an anti-PADI3 antibody.[22]

***Padi*3-deficient mice**

All experiments with animals were approved by a local ethic committee (INSERM US006 CEEA-122) and carried out according to our Institution guidelines and EU legislation. *Padi3*-deficient mice (B6NCrl;B6N-A^{tm1Brd}*Padi3*$^{tm1a(KOMP)Wtsi}$/Or, abbreviated to *Padi3*^{tm1a}) were generated by the Phenomin Program at the ICS Laboratory (Strasbourg, France). A promoter-less *LacZ*-reporter cassette containing a neomycin-resistance gene and flanked by two flippase recognition target sites was inserted between exons 4 and 5 of the *Padi3* gene, with *loxP* sites flanking the exons 5 and 6. See http://www.mousephenotype.org/data/search/gene?kw=padi3 for more details. Mice were maintained in the TAAM animal facility (CNRS UPS44, Orléans, France) under pathogen-free conditions. They were killed by cervical dislocation. All efforts were made to minimize suffering. The following oligonucleotides were used for genotyping: Padi3 forward (5'-CTTTATTGATAAACACAGGCAGGGAGC-3'), Padi3 reverse (5'-CAATGGAATCCCTCTGTCCCTCACC-3'), and LacZ reverse (5'-CCAACAGCTTCCCCACAACGG-3'). A wild type PCR product of 241 bp and a tm1a allele product of 365 bp were produced. Genotyping was confirmed using the Padi3 forward (5'-CCCTCTTTGAGGACCACAGGCTTATC-3') and reverse (5'-GCACTCAAGAAGCAGAGGCAGGC-3') primers, a wild type PCR product of 369 bp and a tm1a allele product of 421 bp were produced. No randomization was used. The SEM observations of whiskers and hair coat were done in blind, by two independent scientists.

Transglutaminase activity of TGM3

In order to compare the enzymatic activity of WT and mutant TGM3 in cell extracts of transiently transfected HEK293T cells we adapted the transglutaminase assay described by Aufenvenne et al. (2009).[23] This assay is based on the incorporation of monodansylcadaverine into casein by transglutaminase, which causes an augmentation of fluorescence and an emission wavelength shift. Lysates of cells transiently transfected with WT or mutant TGM3 constructs were prepared 48 h post-

transfection as described in the immunoblotting section. Lysates of mock-transfected cells were used as a negative control. The translation of the target proteins was always confirmed by immunoblotting. For the assay, the lysates were incubated for 15 min in pre-warmed assay buffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl2, 10 mM reduced glutathione, 2.5% glycerol, 2.5% DMSO, 25 µM monodansylcadaverine, 20 mM N,N-dimethylcasein, pH 8) at 37°C. Measurements were then made for 10 min at 37°C using a LS55 fluorescence spectrometer (Perkin Elmer) with excitation and emission wavelengths of 332 nm and 500 nm, respectively, and a 5.0 nm slit. The linear slopes of the measurements from technical triplicates of samples emerging from five independent transfections were used as a measure of the transglutaminase activity.[23] The activity data were not normally distributed (P < 0,050, Shapiro-Wilk) and analyzed by a Kruskal-Wallis test (One Way ANOVE on Ranks) with post hoc Dunn's pairwise multiple comparisons test.

Results

Identification of mutations in *PADI3*, *TGM3* and *TCHH*

In this study, we identified UHS causative mutations in three functionally related genes in a total of 11 individuals/families (Figure 1, Table 1 and Supplemental Note: Case Reports). The first family originated from the U.K. and had two affected and two unaffected siblings. The affected individuals reported typical hair problems in childhood with improvement while growing older (Figure 1J); gross and scanning electron microscopy observations were in line with an UHS phenotype (Figure 1K-L). In order to elucidate the genetic background of UHS in this family, we performed whole exome sequencing (WES) in both of the affected siblings. We filtered the data for novel and deleterious homozygous or potentially compound heterozygous variants that are shared by the siblings and identified a homozygous missense variant c.881C>T (p.Ala294Val) within *PADI3* (GenBank: NM_016233.2). The mutation co-segregated with the disease phenotype in the family (Figure 2A, Figure S1).

Then, we Sanger sequenced *PADI3* in seventeen additional cases and detected the above mentioned mutation as well as two other recurrent missense mutations, c.335T>A (p.Leu112His) and c.1813C>A (p.Pro605Thr), in seven other individuals/families[24; 25] (Table 1, Figure 2B-C, and Figure S2). We also identified an individual who carries c.881C>T (p.Ala294Val) and a nonsense mutation, c.1732A>T (p.Lys578*), that occurred only once in our UHS cohort (Table 1, Figure 2B-C and Figure S2). These mutations were observed either in homozygous state or in compound heterozygosity as confirmed by parental DNA sequencing in three of the families (Figure S1). The allele frequencies of the *PADI3* substitutions from Exome Aggregation Consortium (ExAC) data are presented in Table S5. The nonsense mutation was not observed in ExAC.

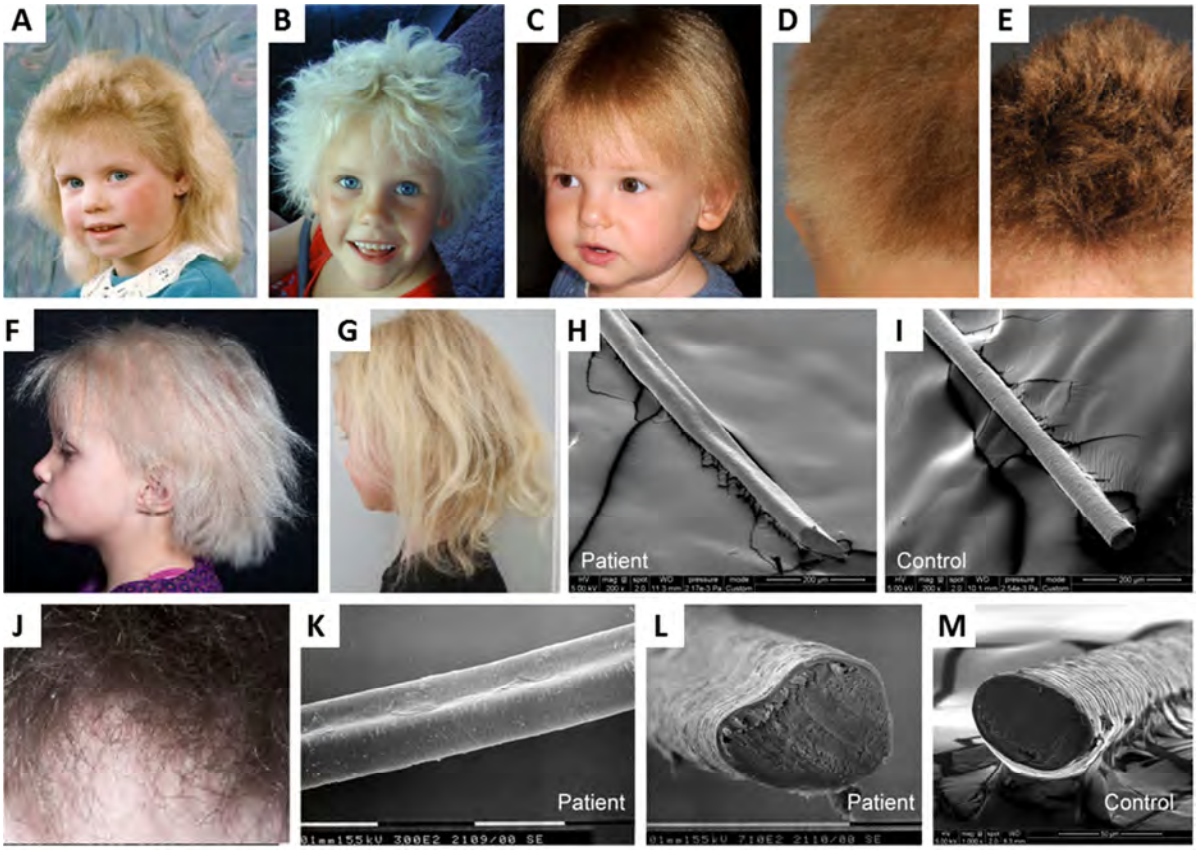


Figure 1. Clinical appearance of UHS. (A-G) Clinical presentation of UHS. Typical signs of UHS can be observed in (A-C) three German girls, (D) a German boy, (E) a Swiss boy, and (F-G) a Danish girl, who were included in the study. (G) The improvement of the phenotype with aging can be observed in the Danish girl. (H) SEM image of the Danish girl's hair shaft showing the longitudinal groove (I) in comparison to a normal hair shaft. (J) The improved hair phenotype at age 15 and (K-L) the SEM findings of the male sibling from the UK family. (K) Longitudinal grooves and (I) heart-shaped cross section of hair presented (M) in comparison to the circular cross section from a control hair shaft, are indicative of UHS. Detailed information regarding the clinical histories can be found in the Supplemental Note; Case Reports.

Table 1. Individuals carrying PADI3, TGM3 and TCHH mutations

Country	Gene	Mutation	Consequence	Clinical description
United Kingdom	*PADI3*	c.881C>T, homozygous	p.Ala294Val	This study
Denmark	*PADI3*	c.881C>T, homozygous	p.Ala294Val	24
Germany	*PADI3*	c.335T>A, homozygous	p.Leu112His	This study
Spain	*PADI3*	c.881C>T, c.335T>A	p.Ala294Val, p.Leu112His	25
Germany	*PADI3*	c.881C>T, c.335T>A	p.Ala294Val, p.Leu112His	This study
Germany	*PADI3*	c.881C>T, c.335T>A	p.Ala294Val, p.Leu112His	This study
Germany	*PADI3*	c.881C>T, c.1813C>A	p.Ala294Val, p.Pro605Thr	This study
Germany	*PADI3*	c.335T>A, c.1813C>A	p.Leu112His, p.Pro605Thr	This study
Switzerland	*PADI3*	c.881C>T, c.1732A>T	p.Ala294Val, p.Lys578*	This study
Turkey	*TGM3*	c.1351C>T, homozygous	p.Gln451*	26
Germany	*TCHH*	c.991C>T, homozygous	p.Gln331*	This study

As a next step, we performed WES in four further UHS cases with no *PADI3* mutations. We identified the nonsense mutation c.1351C>T (p.Gln451*) in *TGM3* (GenBank: NM_003245.3) in a Turkish individual[26] and the nonsense mutation c.991C>T (p.Gln331*) in *TCHH* (GenBank: NM_007113.3) in a German individual (Figure 2D-G; Table S5). No homozygous loss of function mutations were observed in *TGM3* or *TCHH* in ~60,000 sequenced individuals of the ExAC database.

PADI3, TGM3 and TCHH interplay in hair shaft formation

PADI3, a gene of the *PADI* family (*PADI1-4* and *6*), encodes the 664-amino acid peptidylarginine deiminase type III (Enzyme Commission number, EC.3.5.3.15).[27] This posttranslational modification enzyme converts positively charged L-arginine residues of proteins into neutral citrulline residues in the presence of calcium ions. The process is called deimination or citrullination. PADI3 is mainly detected in skin, including hair follicles where it modifies hair shaft proteins.[28; 29] Although the enzyme has already been a focus of interest in hair biology, it could not be linked to any disorder until now. *TGM3* encodes transglutaminase 3, a member of the transglutaminase family (EC.2.3.2.13), which catalyzes the calcium-dependent formation of isopeptide bonds between glutamine and lysine residues in various proteins including the archetypal hair shaft protein trichohyalin, encoded by *TCHH*. TCHH is a structural protein co-localized with PADI3 in the inner root sheath of the hair follicle and in the medulla of the hair shaft. Deimination by PADI3 reduces the overall charge of TCHH, and that enables its association with the keratin intermediate filaments (KIF). Then, TCHH and KIF are crosslinked together by TGM3. KIFs are then stabilized, hardened and linked to cornified envelopes through further crosslinking by transglutaminases, particularly by TGM3 (Figure 2H).[30-32] Thereby, TCHH and its sequential modifications by PADI3 and TGM3 have a very important role in shaping and mechanical strengthening of the hair. Of note, the *TCHH* mutation we identified leads to the synthesis, if any, of a very short protein, probably without any function in KIF interaction as the KIF interacting domain would be almost entirely missing (Figure 2G).

Missense mutations in *PADI3* affect the 3-D enzyme structure

We next investigated the consequences of *PADI3* mutations on the corresponding proteins. The p.Lys578* is expected to induce the synthesis of a truncated protein lacking the 87 amino acids of the carboxy terminal, in particular the Cys646 (Figure 2C, Table S6) absolutely necessary for the enzyme activity.[28] Intriguingly, we observed that the three PADI3 amino acids substituted as a result of the missense mutations correspond to residues that are conserved in the five human PADI proteins, and also in the PADI3 from other species, suggesting they have an important role (Figure S3). However, none of them is directly involved in the catalytic site or in one of the five calcium-binding sites of PADI3 (Table S6). Nevertheless, when we analyzed the effect of the *PADI*3 missense mutations on the predicted three-dimensional structure of the enzyme,[15] the mutations p.Ala294Val and p.Pro605Thr

were shown to induce clear modifications of beta-sheets and alpha-helices, in particular in the immunoglobulin-like NH2 domains, and also around the catalytic site and the calcium-binding sites. The effects of the p.Leu112His substitution were less drastic (Figure 3 and Figures S4, S5).

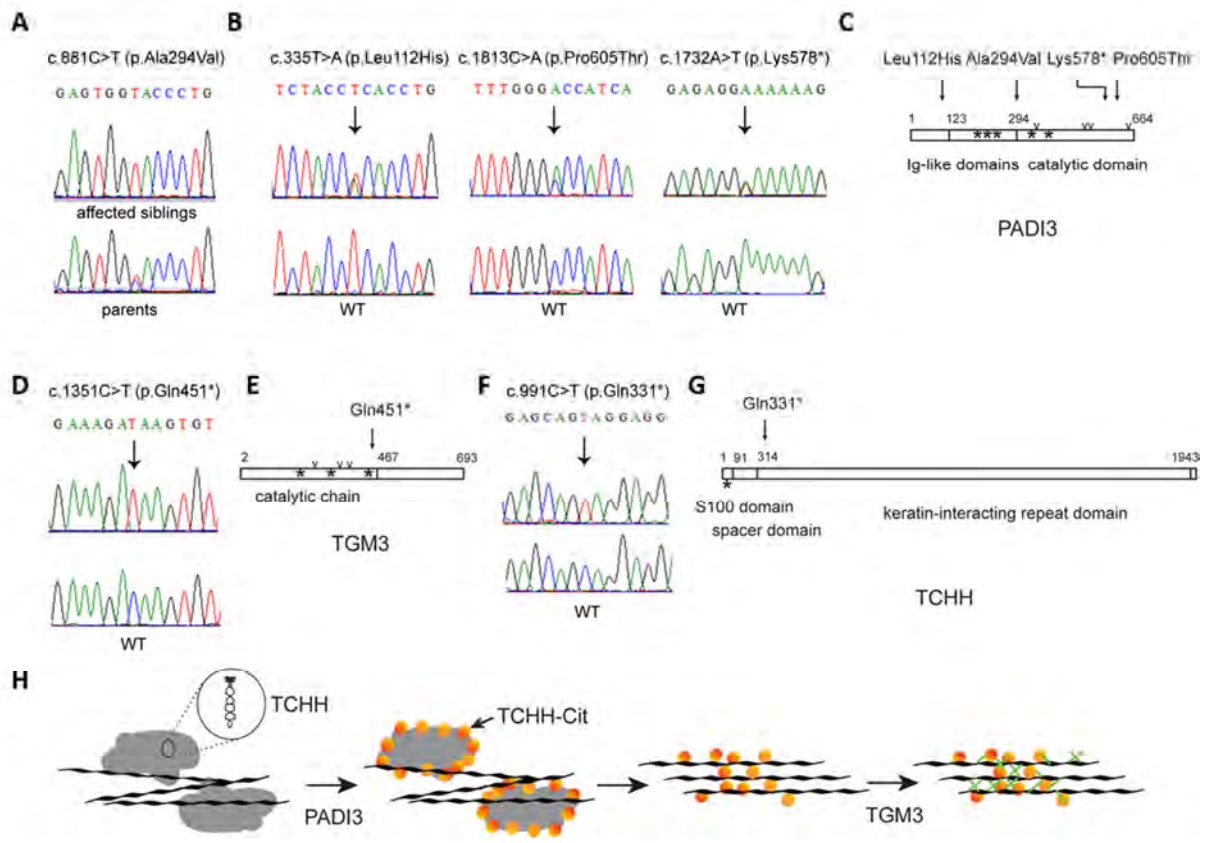


Figure 2. Mutations causing UHS and interplay of PADI3, TGM3 and TCHH. (A) The homozygous c.881C>T (p.Ala294Val) mutation in *PADI3* identified by exome sequencing in the UK siblings was verified by Sanger sequencing. The mutation co-segregates with the UHS phenotype in the pedigree as shown in Figure S1. (B) Electropherograms show the *PADI3* mutations c.335T>A (p.Leu112His), c.1813C>A (p.Pro605Thr) and c.1732A>T (p.Lys578*) in comparison to the wild type sequences. (C) Schematic representation of PADI3 showing the various domains of the protein, the positions of calcium-binding sites (*), and of major amino acids involved in the catalytic sites (v). The positions of the substitutions responsible for UHS are indicated by an arrow. (D) Electropherograms show the homozygous *TGM3* mutation c.1351C>T (p.Gln451*) identified in the Turkish male in comparison to the wild type sequence. (E) Schematic representation of TGM3. (F) Electropherograms show the homozygous *TCHH* mutation c.991C>T (p.Gln331*) identified in the German female in comparison to the wild type sequence. (G) Schematic representation of TCHH. (H) Cartoon depicting the cascade of interactions between TCHH, PADI3 and TGM3 in hair shaft biology. In trichohyalin granules (grey areas), TCHH appears as a dimer with a long rod-shaped domain and a globular end domain. After deimination by PADI3, TCHH is less structured, and the granules progressively dissolved. Citrullinated-TCHH (TCHH-Cit) interacts with keratin intermediate filaments (black lines) organizing them, and becomes a substrate for TGM3. Cross-links of TCHH to itself (intra- or inter-chains), to keratins and between keratins and the cornified cell envelope components are then catalyzed (green dash).

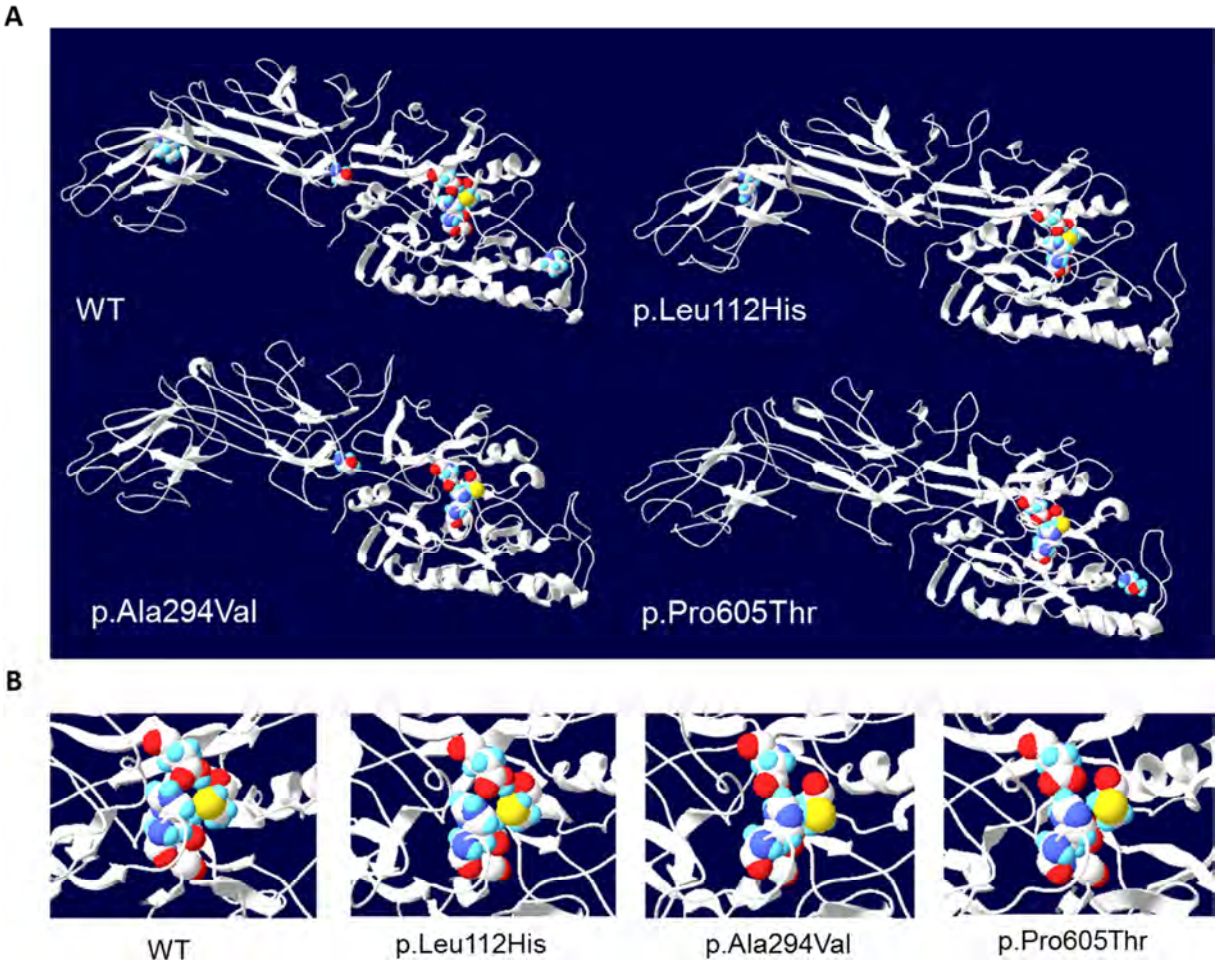


Figure 3. Topological tridimensional models of WT and mutant PADI3. (A) Overall view of the tridimensional solid-ribbon representation of calcium-bound WT and three mutant PADI3 models. The tridimensional solid residues Leu112, Ala294 and Pro605, with their respective lateral chains, are reported on the proposed model of the WT enzyme, as well as the corresponding substituted amino acids on the model of each mutant, p.Leu112His, p.Ala294Val and p.Pro605Thr. The four amino acids involved in the catalytic site are also shown. According to these models, the p.Ala294Val and p.Pro605Thr substitutions induce a profound disorganization of the predicted immunoglobulin-like domains, with disappearance of several beta-sheets, and modification of some alpha-helices of the catalytic domain, as compared to the WT. The effect of the p.Leu112His substitution is more discrete. (B) Zoom on the major amino acids involved in the catalytic site. Its proposed structure is clearly modified after p.Ala294Val and p.Pro605Thr substitutions. It should be noted that none of the substituted amino acids are directly involved in this site.

Aggregation and reduced enzymatic activity of PADI3 mutants

We then cloned the wild-type WT *PADI3* cDNA into a mammalian expression vector in order to induce the translation of a C-terminally V5-tagged PADI3 protein. Mutant constructs with the three recurrent missense mutations were generated by targeted mutagenesis. HaCaT cells were transiently transfected (5-10% transfection efficiency) with constructs encoding for WT and mutant forms of PADI3. Immunoblotting of cell extracts showed that all of the constructs led to translation of a protein of about 70 kDa (Figure 4A). The subcellular location of WT and mutated proteins was determined by immunofluorescence analyses that showed, as expected, a diffuse homogenous

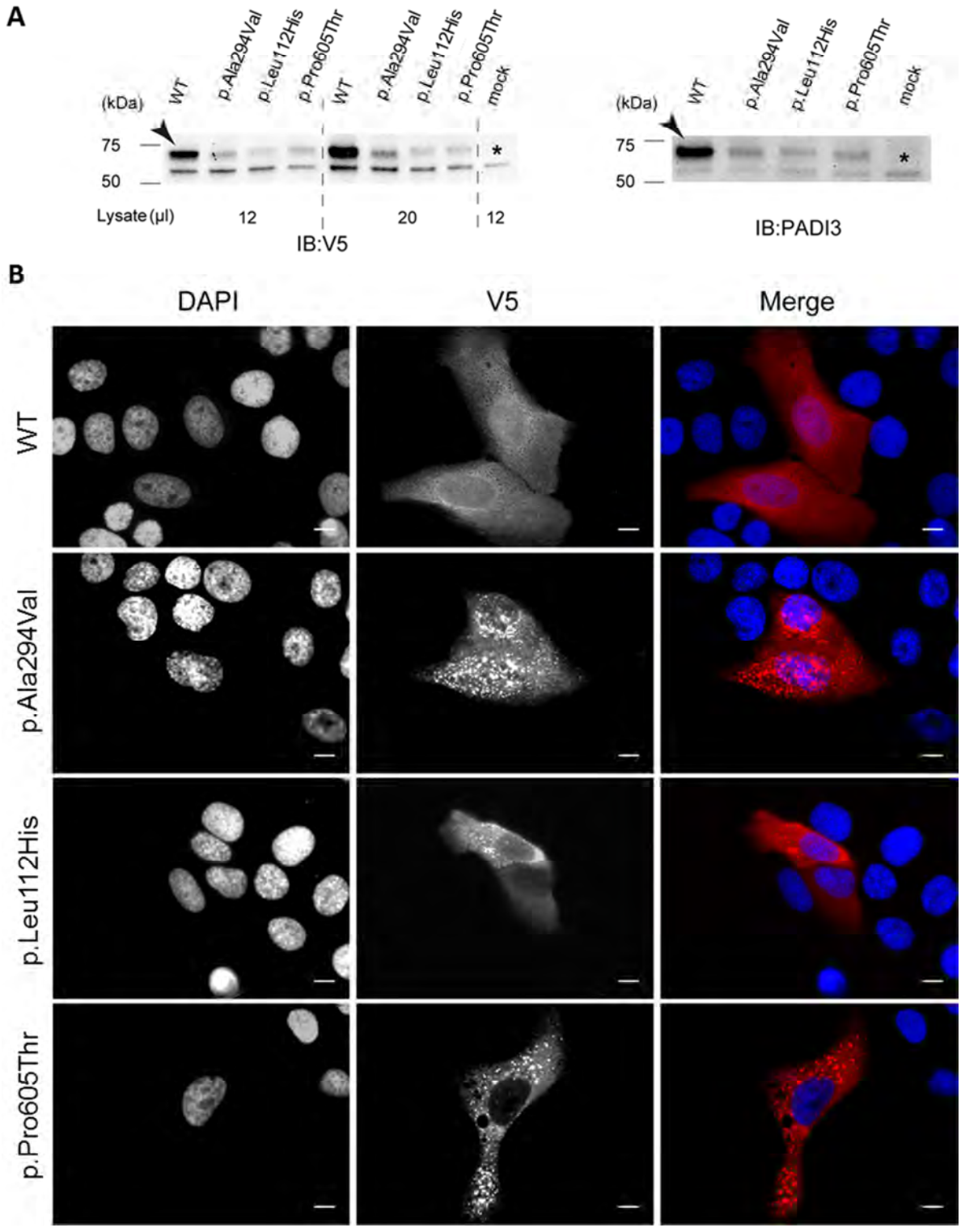


Figure 4. WT and mutant forms of PADI3 produced in HaCaT cell line. (A) Immunoblotting analysis shows the translation of WT and mutant PADI3 in transiently transfected HaCaT cells, which were collected 48 h post-transfection. Immunoblotting was performed with anti-V5 and anti-PADI3 antibodies. Antibody-specific bands are indicated with an arrow and a non-specific cross-reactive band around 55 kDa is indicated with an asterisk. Full length blot images can be seen in Figure S9. (B) Immunofluorescence analysis in HaCaT cells transiently transfected with WT and mutant PADI3 encoding plasmids shows the homogeneous cytosolic localization of WT PADI3 whereas the three mutant proteins are observed in the form of large aggregates. Scale bars, 10µm.

cytoplasmic distribution of the WT PADI3,[22] whereas in all three mutants the proteins were observed to form large aggregates throughout the cytoplasm (Figure 4B). To assess the enzymatic activity of WT and mutated PADI3, we performed double immunostaining with an anti-V5 monoclonal antibody and with human anti-citrullinated protein autoantibodies (ACPA) from individuals with rheumatoid arthritis, these antibodies specifically detecting citrullinated proteins.[18; 33] While translation of the WT PADI3 resulted in a strong labeling with the ACPA antibodies, the signal in the cells producing the mutant proteins was barely above background (Figure 5A). We also produced the WT and mutant PADI3 in *E. coli*. After incubation of the WT PADI3-containing bacterial extracts with calcium for two hours, deiminated proteins were detected. By contrast, when the extracts containing the mutated PADI3 were incubated for two hours, and even up to eighteen hours, no deiminated proteins were detected (Figure 5B and Figure S6). Altogether, the results suggested that the mutated forms of PADI3 are either not or only weakly active.

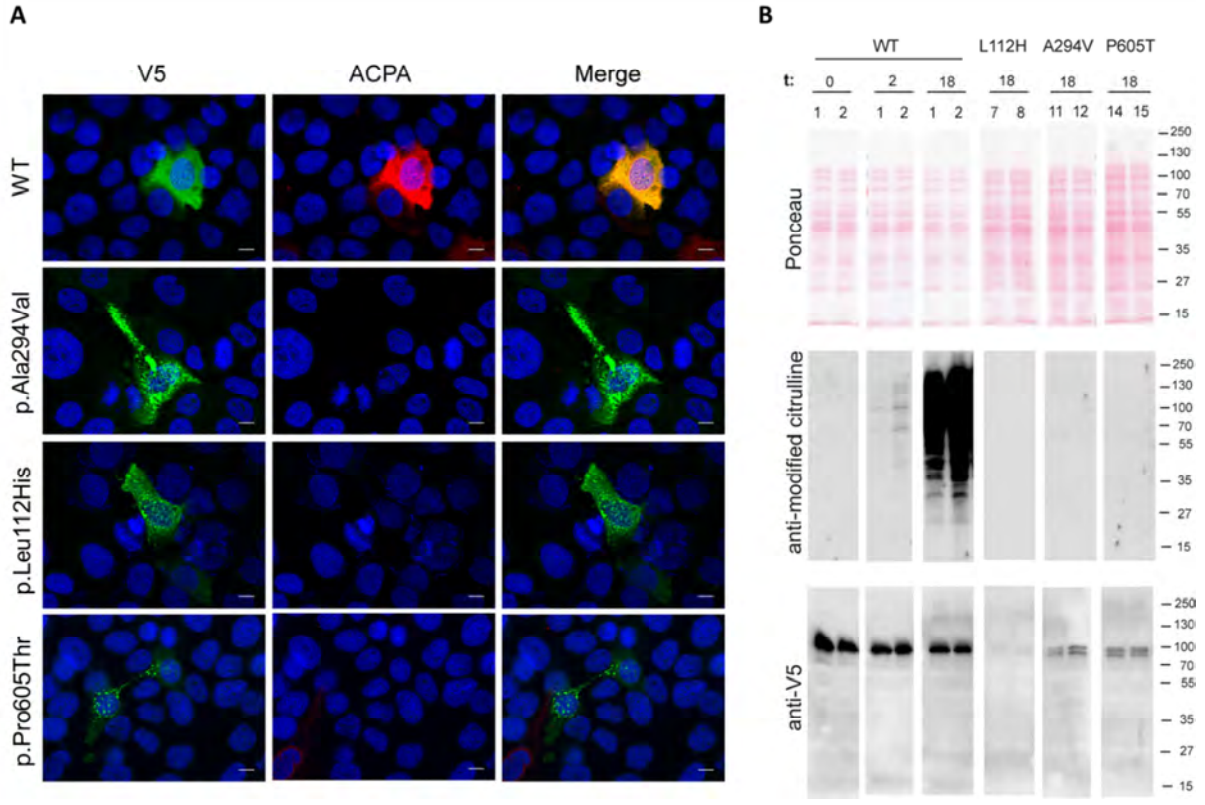


Figure 5. Consequences of *PADI*3 mutations on the enzyme activity. (A) Indirect immunofluorescence analysis of transfected HaCaT cells. HaCaT cells were double labeled with anti-V5 monoclonal antibody (green) and ACPA antibodies (red). Nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bars, 10 µm. The WT PADI3 is clearly active (merge image; yellow color) whereas the mutants display a low activity. (B) WT PADI3 (bacterial clones 1 and 2) and the mutant forms, p.Leu112His (clones 7 and 8), p.Ala294Val (clones 11 and 12) and p.Pro605Thr (clones 14 and 15), produced in *E. coli,* were extracted in Tris-HCl buffered salt. Soluble proteins were incubated for the indicated period of time (t; in hours) with calcium, separated by electrophoresis, transferred to membranes, stained with Ponceau Red and immunodetected with either the anti-modified citrulline rabbit antibodies or anti-V5 antibody. While citrullinated proteins were detected when the WT-containing extracts have been incubated for two hours, no citrullinated proteins were detected in the mutant-containing extracts, even after 18 hours of incubation. The substituted enzymes appear to be cleaved and a V5-reactive doublet is observed. Molecular mass markers are indicated on the right in kDa. Full length blot images can be seen in Figure S9.

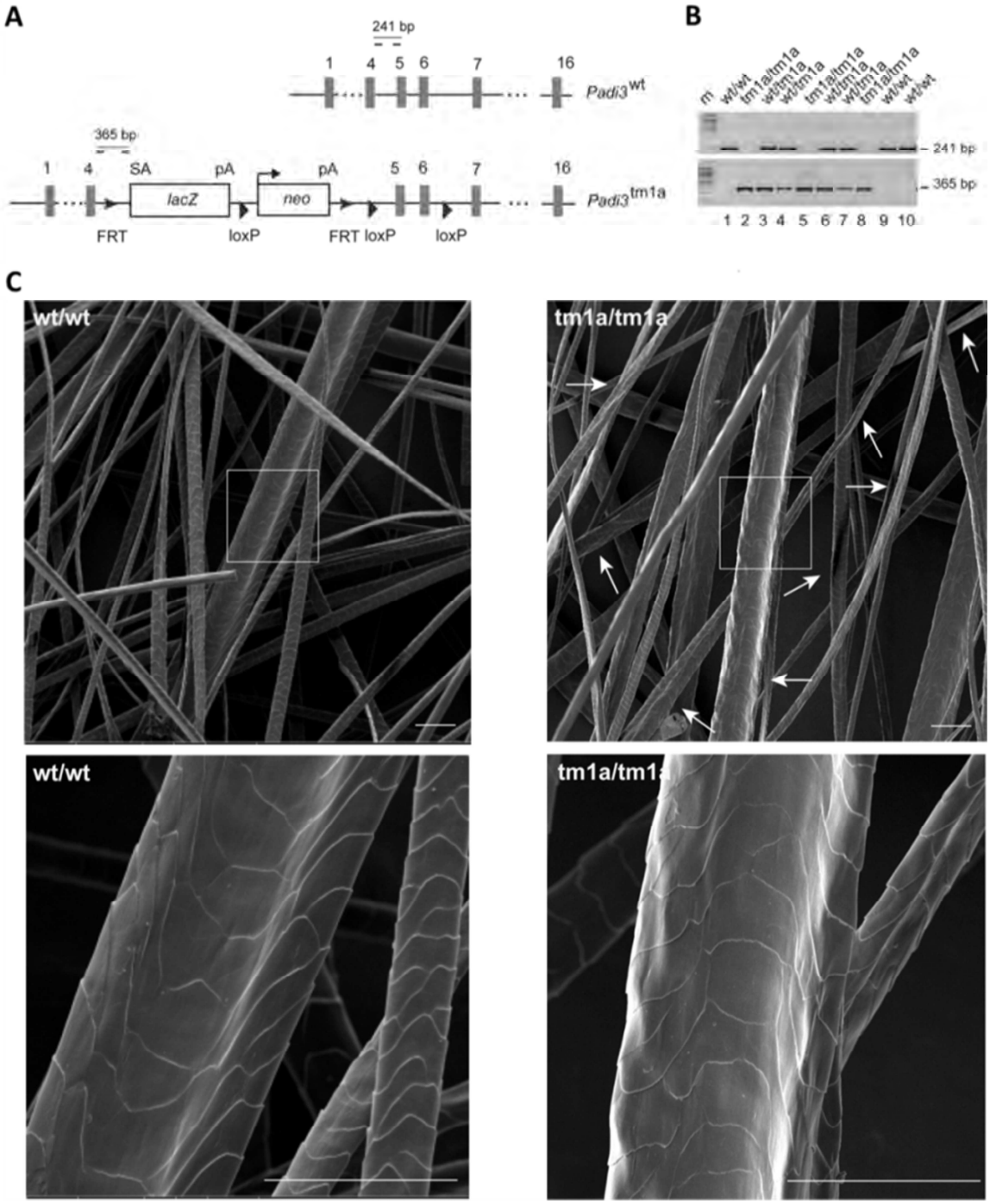


Figure 6. *Padi3* gene disruption in mice. (**A**) Schematic representation of the *Padi3* gene and the targeting vector. The exons are shown by numbered grey rectangles. A cassette containing the beta-galactosidase (LacZ) and neomycin (neo) genes is inserted between exons 4 and 5. This results in the production of a truncated Padi3 protein corresponding to amino acids 1-136 fused to β-galactosidase. The position of the inserted loxP and flippase recognition target (FRT) sites are indicated, as well as the splicing acceptor site (SA) and the polyadenylation sites (pA) of *LacZ* and *neo*. The positions of the oligonucleotides (dashes) used for genotyping are shown, as well as the length of the amplified PCR products in wildtype (Padi3wt) and targeted (Padi3tm1a) alleles. (**B**) PCR on genomic DNA from tail biopsies of 10 mice from the same littermate (five females, 1-5, and five males, 6-10) showing amplification of the 241 bp fragment for the Padi3wt allele and the 365 bp fragment for the Padi3tm1a allele. (**C**) Representative pictures of SEM analysis of back hair coat from the three wt and three Padi3tm1a/tm1a mice (7 weeks old). Most hairs of the knockout mice are rough, with an irregular surface (white arrows). This is evident for thick hairs (top and middle micrographs), but was also observed for thin hairs (bottom). In some cases the hairs are twisted. The boxed areas are enlarged in the middle. At least six vibrissae and 200 hairs were analyzed per animal. Scale bar = 50 µm.

***Padi3* knockout mice show whisker and hair anomalies**

In order to demonstrate the importance of PADI3 in hair shaft formation and structure, we generated *Padi3* knockout mice (Figure 6A-B). Breeding mice heterozygous for the *Padi3*^{tm1a} mutation produced offspring with the three possible genotypes at the expected Mendelian ratios, showing that absence of Padi3 is compatible with life. Grossly, the skin of 7-weeks old null mice appeared normal. A further characterization by SEM revealed alterations in the morphology of hair coat (Figure 6C) and, less markedly, of whiskers. The surface of the lower (proximal) part of the vibrissae and the hairs on their entire length were irregular and rough and appeared as hammered.

Nonsense mutation in *TGM3* leads to reduced enzymatic activity

We cloned the WT *TGM3* cDNA into a mammalian expression vector in order to induce the translation of an N-terminally FLAG-tagged TGM3 protein. Mutant construct was generated by targeted mutagenesis. HaCaT and HEK293T cell lines were transiently transfected with WT and mutant TGM3 encoding constructs. WT TGM3 construct led to translation of a protein of about 70 kDa, while the nonsense mutation resulted in a truncated protein of around 40 kDa with a lower detection level (Figure 7A and Figure S7). Immunofluorescence analysis showed that TGM3 is located in the cytoplasm and that the truncated form is present in a dramatically lower number of cells (Figure 7B) in accordance with the western blot results. Generally these cells had a smaller cytosolic surface area in comparison to those producing the WT TGM3 (Figure 7B). We performed a transglutaminase activity assay[23] with HEK293T cell lysates containing WT and mutated TGM3. The analysis results revealed that the WT had a significantly higher transglutaminase activity in comparison to the truncated protein and the latter did not differ from the mock transfected negative control (Figure 7C and Figure S8).

Discussion

In this study we identified disease causative mutations for UHS in *PADI3*, *TGM3* and *TCHH* with the former two genes encoding for posttranslational modification enzymes that act on the structural hair protein trichohyalin encoded by the latter gene. Our cell culture data show that the identified mutations in *PADI3* and *TGM3* lead to reduced or no enzymatic activity and the phenotype of the *Padi3* knockout mice we generated show structural alterations in the whiskers and hair coat morphology. Our findings are also supported by the phenotype of the already existing *Tgm3* knockout mice. These mice exhibit irregular, twisted whiskers and, at birth, have a wavy hair coat, which improves four weeks after birth.[34] Scanning and transmission electron microscopy analyses of hairs from adult *Tgm3*$^{-/-}$ mice reveal alterations such as irregular torsions, deformed grooves, abnormal cuticle and shorter KIF.[34] It is also convincing that, both nonsense and missense mutations in the *Tgm*3 gene are responsible for the wellhaarig mouse phenotype, named for the curly whiskers

and wavy coat of the mutant animals.[35] Based on the phenotype of the *Tgm3*$^{-/-}$ mice, John et al. have suggested that alterations in TGM3 or its substrates could be related to recessive forms of *pili torti* [MIM 261900] or similar hair phenotypes, which improve with age.[34] Our findings validate this hypothesis and furthermore identify UHS as the hair phenotype related to alterations not only in TGM3 but also in the other proteins of the TCHH-PADI3-TGM3 cascade. In some affected individuals, TCHH would not be produced, or produced as a truncated form unable to interact with KIF; in others,

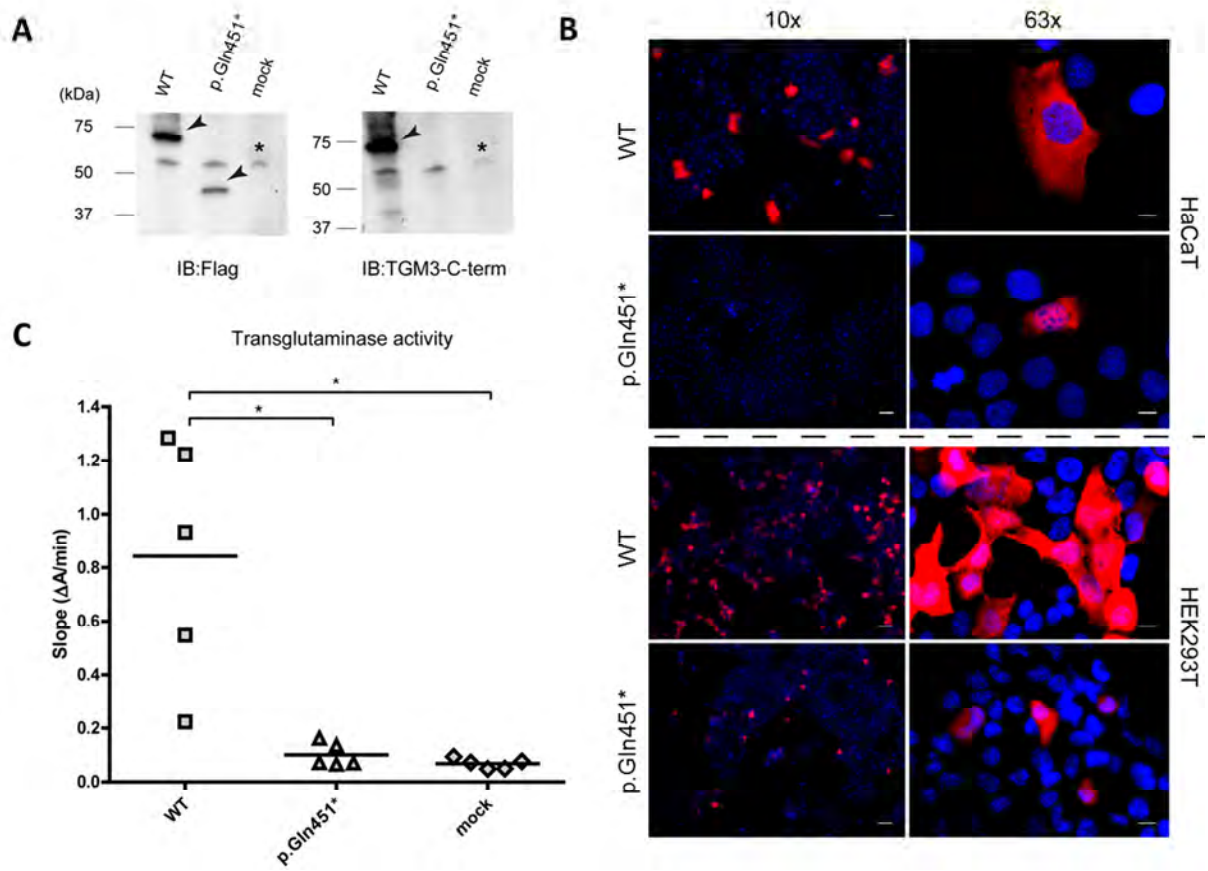


Figure 7. WT and mutant forms of TGM3 produced in HaCaT and HEK293T cell lines. (A) Immunoblotting analysis shows the translation of WT and truncated TGM3 in transiently transfected HaCaT cells, collected 48 h post-transfection. Immunoblotting was performed with anti-Flag and anti-TGM3 antibodies. Antibody-specific bands showing the WT (~70 kDa) and truncated TGM3 (~40 kDa) are indicated with an arrow and a non-specific cross-reactive band around 55 kDa is indicated with an asterisk. The truncated TGM3 can only be detected with the antibody against the Flag epitope fused to the N-terminus and not with the antibody against the C-terminus of TGM3 as expected. Full length blot images can be seen in Figure S9. Immunoblotting analysis with HEK293T cells is presented in Figure S7. (B) Immunofluorescence analyses in HaCaT and HEK293T cells transiently transfected with WT and mutant TGM3 encoding constructs are presented by images captured with 10x and 63x objectives. The analyses show clear differences in the number of cells producing the WT and mutant TGM3 (10x images). Scale bars, 50 µm and 10 µm for 10x and 63x objectives, respectively. (C) Transglutaminase activity of WT and mutated TGM3 produced in HEK293T cells. Mock transfected cell lysates were used as negative control. The transglutaminase activity, represented by the mean slope of 10-minute long measurements from technical triplicates (given in Figure S8), is presented as a dot plot. The enzymatic activity assay was performed with samples emerging from five independent transfections. Horizontal lines represent the mean values (mean ± SD; WT: 0.84±0.45; p.Gln451*: 0.10±0.04; mock: 0.07±0.02). Results demonstrate that the mutated protein did not differ from the mock transfected negative control in terms of activity and WT TGM3 had a significantly higher activity in comparison to both (*P<0.05, Dunn's Test).

because of a PADI3 activity defect, TCHH would remain insoluble preventing its interaction with KIF; in the last group, TCHH/KIF interaction would not be stabilized by TGM3-mediated crosslinks. Taken together, this suggests that one of the particular processes in hair shaft formation that leads to UHS when disturbed might be the interaction of TCHH and KIF. This interaction is known to be crucial for shaping and mechanical strengthening of the hair shaft. These findings also show that the compromise of any one of the proteins that play a role in this process would be enough to lead to the same phenotype.

It is intriguing that, despite the defects affecting a structural component of the hair shaft, the phenotype in UHS is commonly reported to improve with age, similar to the hair coat phenotype of *Tgm3*$^{-/-}$ mice. Interestingly, improvement with age has also been observed in other hair shaft disorders (e.g. *pili annulati*, *pili torti*). The improvement in UHS might be due to the compensatory expression of another isoform of peptidylarginine deiminase, transglutaminase or other structural hair shaft components. On the other hand, aging related changes in hair follicles such as increase in diameter and length can have mechanistic influences that might account for this improvement.

TGM3 and PADI3 are strongly detected in the upper epidermis. Nevertheless, no anomalies have been reported in the interfollicular epidermis of individuals with isolated UHS. Similarly, *Tgm3*$^{-/-}$ mice show no obvious skin defects.[34] This is probably due to the fact that other isoforms of these enzyme families are present in the epidermis, which can compensate for the loss of PADI3 and TGM3 activity, whereas these two are the only isoforms detected in the hair cuticles and medulla.[27; 28; 30]

Up to now, both simplex and familial cases of UHS have been reported with suggested autosomal dominant and recessive inheritance with variable levels of penetrance. In this study we consistently observed an autosomal recessive inheritance pattern in a total of 11 familial and simplex cases. Based on the pedigrees reported in literature, it is most likely that autosomal dominant forms of this condition exist[7; 36; 37] which might be underlined by defects in other genes involved in hair shaft formation and maintenance related processes. It would be of interest then to investigate closely whether differences could be observed in the phenotypes of these individuals in comparison to the individuals who carry recessive mutations in PADI3-TCHH-TGM3 cascade.

An interesting observation was that, 5 out of 60,659 individuals in ExAC are homozygous for c.881C>T (p.Ala294Val). UHS is a non-debilitating phenotype that resolves with age and therefore, it is likely that these presumably affected individuals had participated in the ExAC project as "healthy" controls. This data also indicates that UHS is a more common phenotype than estimated.

In summary, we elucidated the molecular genetic background of UHS by identifying recessive mutations in *PADI3*, *TCHH* and *TGM3*. The three genes encode for proteins that play an essential role during hair shaft formation through their sequential interactions. This finding, in combination with the data describing the functional effects of the mutations in *PADI3* and *TGM3*, provides valuable

information regarding the pathophysiology of UHS. Furthermore, it contributes to a better understanding of the protein interaction cascades in molecular histogenesis of the hair. This could be of further value for cosmetics and pharmaceutics industries paving the way for development of novel products.

Acknowledgments

P.N. is a founder, CEO, and shareholder of ATLAS Biolabs GmbH. ATLAS Biolabs GmbH is a service provider for genomic analyses. All other authors declare that they have no conflict of interest.

We would like to thank the individuals and their families for participating in this study. We would like to acknowledge Dr Marianne Chabod, the technical assistance of Carole Pons and Géraldine Offer, the Toulouse Rio Imagerie imaging (INSERM U1043) and electron microscopy (University of Toulouse) facilities, and the TAMM animal facility, in particular Laëtitia Trottereau. We would like to thank Dr. Thomas Zillinger for providing us with HEK293T cells. We would like to acknowledge Dr. Thomas Butterbrodt from Bio-Rad Laboratories GmbH and Dr. Kourosh Zolghadr from Leica Biosystems for their technical assistance. S.S. is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB1089), the German Ministry of Research and Education (BMBF, 01GQ0806), and the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°602102 (EPITARGET). V.O is supported by the German Research Foundation (DFG) (OJ 53/3-1). M.S. and G.S. are supported by The University of Toulouse, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. This work was further supported by local funding (BONFOR to R.C.B. and S.S.). R.C.B. is a member of the DFG-funded Excellence Cluster ImmunoSensation and was a recipient of a Heisenberg Professorship of the DFG (BE 2346/4-2).

Web Resources

https://varbank.ccg.uni-koeln.de/
NCBI Blast&Align: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Mendelian Inheritance in Man (MIM): http://www.omim.org
USCS Genome Bioinformatics website: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
Exome Aggregation Consortium database ExAC (accessed 5 March 2015),
http://exac.broadinstitute.org/
http://www.mousephenotype.org/data/search/gene?kw=padi3

References

1. Dupré, A., Rochiccioli, P., Bonafé, J.L. (1973). Cheveux incoiffables: anomalie congénitale des cheveux. Bull Soc Fr Dermatol Syph 80, 111-112.
2. Stroud, J.D., Mehregan, A.H. . (1973). The first human hair symposium. Medcom Press, New York.
3. Calderon, P., Otberg, N., and Shapiro, J. (2009). Uncombable hair syndrome. J Am Acad Dermatol 61, 512-515.
4. Trueb, R.M., Spycher, M.A., Schumacher, F., and Burg, G. (1994). [Pili torti et canaliculi in ectodermal dysplasia]. Hautarzt 45, 372-377.
5. Navarini, A.A., Kaufmann, F., Kaech, A., Trueb, R.M., and Weibel, L. (2010). Picture of the month. Uncombable hair (pili trianguli et canaliculi). Arch Pediatr Adolesc Med 164, 1165-1166.
6. Ferrando, J., Fontarnau, R., Gratacos, M.R., and Mascaro, J.M. (1980). [Pili canaliculi (uncombable hair syndrome or spun glass hair syndrome). A scanning electron microscope study of ten new cases (author's transl)]. Ann Dermatol Venereol 107, 243-248.
7. Hebert, A.A., Charrow, J., Esterly, N.B., and Fretzin, D.F. (1987). Uncombable hair (pili trianguli et canaliculi): evidence for dominant inheritance with complete penetrance based on scanning electron microscopy. Am J Med Genet 28, 185-193.
8. Mallon, E., Dawber, R.P., De Berker, D., and Ferguson, D.J. (1994). Cheveux incoiffables--diagnostic, clinical and hair microscopic findings, and pathogenic studies. Br J Dermatol 131, 608-614.
9. Hicks, J., Metry, D.W., Barrish, J., and Levy, M. (2001). Uncombable hair (cheveux incoiffables, pili trianguli et canaliculi) syndrome: brief review and role of scanning electron microscopy in diagnosis. Ultrastruct Pathol 25, 99-103.
10. Shelley, W.B., and Shelley, E.D. (1985). Uncombable hair syndrome: observations on response to biotin and occurrence in siblings with ectodermal dysplasia. J Am Acad Dermatol 13, 97-102.
11. Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25, 1754-1760.
12. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 20, 1297-1303.
13. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078-2079.
14. Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J Cell Biol 106, 761-771.
15. Mechin, M.C., Coudane, F., Adoue, V., Arnaud, J., Duplan, H., Charveron, M., Schmitt, A.M., Takahara, H., Serre, G., and Simon, M. (2010). Deimination is regulated at multiple levels including auto-deimination of peptidylarginine deiminases. Cell Mol Life Sci 67, 1491-1503.
16. Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., and Sato, M. (2004). Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. Nat Struct Mol Biol 11, 777-783.
17. Posch, A., Kohn, J., Oh, K., Hammond, M., and Liu, N. (2013). V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting. J Vis Exp, 50948.
18. Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T., and Serre, G. (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. J Immunol 166, 4177-4184.
19. Anquetil, F., Clavel, C., Offer, G., Serre, G., and Sebbag, M. (2015). IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. J Immunol 194, 3664-3674.
20. Mechin, M.C., Enji, M., Nachat, R., Chavanas, S., Charveron, M., Ishida-Yamamoto, A., Serre, G., Takahara, H., and Simon, M. (2005). The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations. Cell Mol Life Sci 62, 1984-1995.
21. Senshu, T., Akiyama, K., Kan, S., Asaga, H., Ishigami, A., and Manabe, M. (1995). Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. J Invest Dermatol 105, 163-169.
22. Nachat, R., Mechin, M.C., Takahara, H., Chavanas, S., Charveron, M., Serre, G., and Simon, M. (2005). Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. J Invest Dermatol 124, 384-393.

23. Aufenvenne, K., Oji, V., Walker, T., Becker-Pauly, C., Hennies, H.C., Stocker, W., and Traupe, H. (2009). Transglutaminase-1 and bathing suit ichthyosis: molecular analysis of gene/environment interactions. J Invest Dermatol 129, 2068-2071.
24. Nissen, C.V., and Svendsen, M.T. (2013). [Uncombable hair syndrome]. Ugeskr Laeger 175, 2878.
25. Novoa, A., Azon, A., and Grimalt, R. (2012). [Uncombable hair syndrome]. An Pediatr 77, 139-140.
26. Kilic, A., Oguz, D., Can, A., Akil, H., and Gurbuz Koz, O. (2013). A case of uncombable hair syndrome: light microscopy, trichoscopy and scanning electron microscopy. Acta Dermatovenerol Croat 21, 209-211.
27. Kanno, T., Kawada, A., Yamanouchi, J., Yosida-Noro, C., Yoshiki, A., Shiraiwa, M., Kusakabe, M., Manabe, M., Tezuka, T., and Takahara, H. (2000). Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. J Invest Dermatol 115, 813-823.
28. Mechin, M.C., Sebbag, M., Arnaud, J., Nachat, R., Foulquier, C., Adoue, V., Coudane, F., Duplan, H., Schmitt, A.M., Chavanas, S., et al. (2007). Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. Int J Cosmet Sci 29, 147-168.
29. Takahara, H.S., G.; Simon, M. (2014). Deimination in skin and regulation of peptidyl-arginine deiminase expression in keratinocytes. In Protein Deimination in Health and Disease A. Nicholas, ed. (NEW YORK, Springer), pp 113-128.
30. Steinert, P.M., Parry, D.A., and Marekov, L.N. (2003). Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root shealth. J Biol Chem 278, 41409-41419.
31. Tarcsa, E., Marekov, L.N., Andreoli, J., Idler, W.W., Candi, E., Chung, S.I., and Steinert, P.M. (1997). The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. J Biol Chem 272, 27893-27901.
32. Westgate, G.E., Botchkareva, N.V., and Tobin, D.J. (2013). The biology of hair diversity. Int J Cosmet Sci 35, 329-336.
33. Vincent, C., Nogueira, L., Clavel, C., Sebbag, M., and Serre, G. (2005). Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. Autoimmunity 38, 17-24.
34. John, S., Thiebach, L., Frie, C., Mokkapati, S., Bechtel, M., Nischt, R., Rosser-Davies, S., Paulsson, M., and Smyth, N. (2012). Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. PLoS One 7, e34252.
35. Brennan, B.M., Huynh, M.T., Rabah, M.A., Shaw, H.E., Bisaillon, J.J., Radden, L.A., 2nd, Nguyen, T.V., and King, T.R. (2015). The mouse wellhaarig (we) mutations result from defects in epidermal-type transglutaminase 3 (Tgm3). Mol Genet Metab 116, 187-191.
36. Garty, B., Metzker, A., Mimouni, M., and Varsano, I. (1982). Uncombable hair: a condition with autosomal dominant inheritance. Arch Dis Child 57, 710-712.
37. de Luna, M.M., Rubinson, R., and de Kohan, Z.B. (1985). Pili trianguli canaliculi: uncombable hair syndrome in a family with apparent autosomal dominant inheritance. Pediatr Dermatol 2, 324-327.

Supplemental Note: Case Reports

Clinical data for individuals with *PADI3* mutations

The English family has also been described in the manuscript. The female sibling was referred to the Department of Dermatology in Brigthon at the age of 11 years with a lump in her right and left arm. The clinical and later histological diagnosis was of pilomatrixomas. At the same appointment it was noted that she had abnormal hair. This was first noticed by the parents after 8 weeks of hair shedding in early childhood. The hair was then very slow growing, came out easily and painlessly. Her hair was hard to brush or comb and she rarely had to have her hair cut. Teeth and nail development was normal. The girl has recently been diagnosed as diabetic. Her brother was examined at the age of 15 years and had white brittle nails. His hair when long was described as being like sheeps wool which had improved with age (Figure 1J). The hair had a spangly appearance. The features of the hair shaft observed by electron microscopy were diagnostic of uncombable hair with longitudinal running ridges (Figure 1K), some twisting and triangular or heart shaped cross sections (Figure 1L).

A 3-year old Danish girl was referred for evaluation of abnormal hair (Figure 1F). Besides hair shaft anomaly she was otherwise healthy. From birth she had sparse hair until the age of 1.5 years, when the parents noted her dry and unruly hair which could not be properly combed. It was also noted that she could never grow her hair long. Hair microscopy showed hair shaft anomalies with pilli canaliculi et trianguli. When she was 4 years old biotin therapy 5 mg daily was given for 6 months, which apparently improved the hair texture. Today the girl is 8 years old, and overall there has been also a spontaneous improvement of the condition (Figure 1G). This clinical signs of this girl have been described in detail elsewhere.[1]

A German boy was seen at the age of 3 and 8 years with unimproved wiry hair. The blond, lusterless hair was closely cropped and irregularly stuck out from the scalp growing in lots of different directions. Of interest, the hair originating from a congenital melanocytic nevus of 2.5 x 1.5 cm size at the right temporal side of the scalp was not only darker but also appeared structurally normal without any signs of uncombability (Figure 1D).

An 18-month old Swiss boy was referred to the Department of Dermatology in Zurich for the evaluation of abnormal hair. From early infancy the parents noted dry, unruly and slow growing hair which did not maintain its shape after styling. Apart from mild obstipation he was otherwise well. No one else in the family hat any similar hair problems. On examination the boy's entire scalp was observed to be covered with brown, dry, frizzy hair that projected outward and resisted any attempt to flatten it. On hair shaft microscopy longitudinal grooving and triangular cross

sections were observed, consistent with *pili canaliculi et trianguli*. Today the boy is nearly 6 years old, and there is an improvement in the hair phenotype (Figure 1E).

A Spanish girl was seen at the age of 4 years for 'funny looking' hair. Clinical examination revealed normal brown light hair without any clear alteration on eyelashes nor eyebrows. Teeth and nails are normal. Under the scanning and optical microscope typical finding of *pili canaliculi* were seen. This clinical signs of this girl have been described in detail elsewhere.[2]

The scalp hair of a German girl was normal at birth and started to grow curly and badly combable from the age of 3 months. Hair growth was claimed to be decelerated by the mother. On clinical examination at the age of 3.5 years her shoulder-length light hair appeared dry and stood out in all directions. Hair density was not reduced, and no other abnormalities could be identified (no picture available).

Another German girl presented with very fair, uncombable hair at the age of 6 years (Figure 1B). Physical examination was within normal ranges. Until the age of 15 years the structure of the hair remained unchanged.

Another German girl was examined at the age of 4 years because of uncombable hair from infancy on (Figure 1A). Short hairstyles were preferred until spontaneous improvement occurred at the age of 10-11 years, when scalp hair gradually became more flat and easier to manage. Today, at the age of 25 years, few untamable hairs are left over in the frontal area which are straightened with hair gel.

A little German girl presented with normal hair at birth; soon after birth, the regrowing hair was noticeable, and UHS syndrome was diagnosed (Figure 1C). Nowadays, at the age of 10 years, the girl has long pretty hair that is well combable. There are no other abnormalities, a sibling has normal hair. No other individual in this family has abnormal hair structure.

Clinical data for the individual with the *TGM3* mutation

The clinical signs of this young men have recently been described elsewhere.[3]

Clinical data for the individual with the *TCHH* mutation

The German girl with the *TCHH* mutation came to the clinics at the age of 19 years complaining that her hair grows too slowly being otherwise healthy. Since her childhood, she haid brittle, curly hair, which was barely combable. These symptoms improved until her 14th year of life.

Supplemental figures

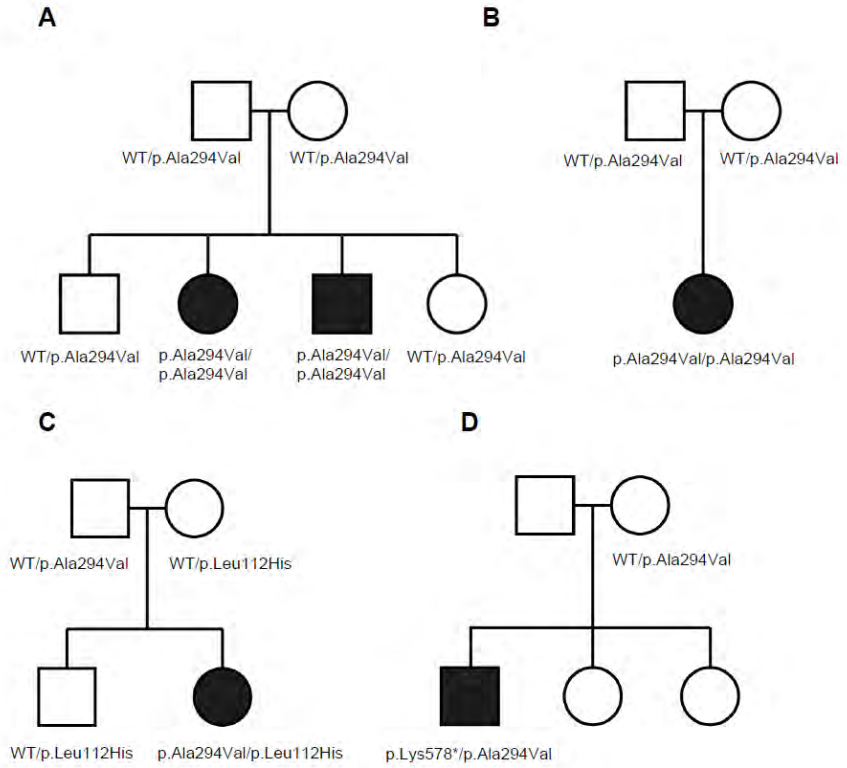


Figure S1. Co-segregation of the disease-causing mutations in pedigrees. (A) Discovery pedigree from the UK with two affected and two unaffected siblings. (B) Danish family with an affected daughter. (C) Spanish family showing compound heterozygosity for the mutations p.Leu112His and p.Ala294Val in the affected daughter. (D) Swiss family showing compound heterozygosity for the mutations p.Ala294Val and p.Lys578* in the affected son. DNA was not available from the healthy father and siblings. WT, wild type.

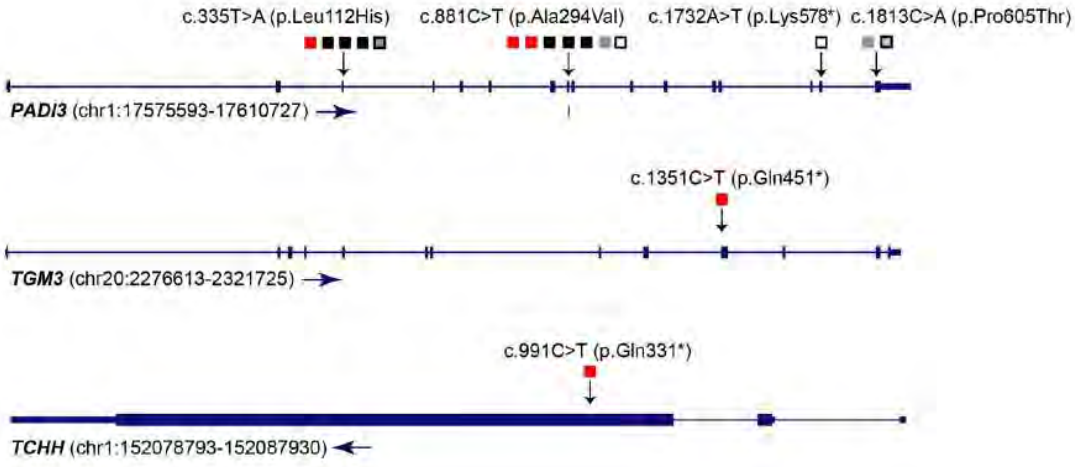
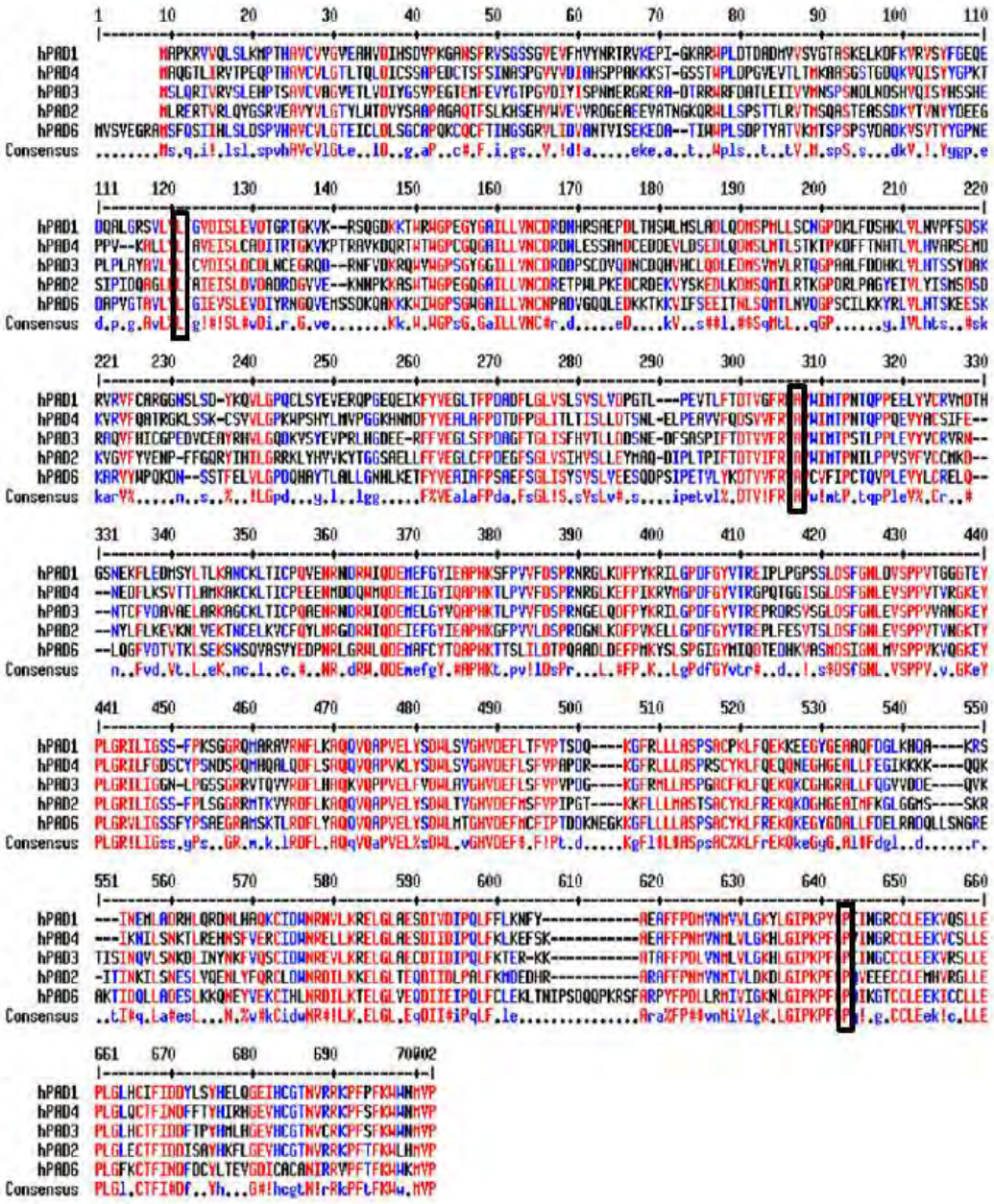


Figure S2. Cartoons depicting the positions of the mutations in *PADI3*, *TGM3* and *TCHH*. The start/end positions of the genes are based on hg19. Direction of transcription is depicted with the arrow heads. Squares indicate individuals carrying the respective mutation. Red squares denote homozygotes. Black squares denote individuals carrying p.Leu112His and p.Ala294Val, grey square denotes the individual carrying p.Ala294Val and p.Pro605Thr, grey square with a black frame denotes the individual carrying p.Leu112His and p.Pro605Thr, and white square denotes the individual carrying p.Ala294Val and p.Lys578*.

A



B

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  MSLQRIVRVSLEHPTSAVCVAGVETLVDIYGSVPEGTEMFEVYGTPGVDIYISPNMERGR 60
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  MSLQRIVRVSLEHPTSAVCVAGVETIVDIYGAVPEGTDMFEVYGTPGVDIYVSPSMERSR 60
SP|O02849|PADI3_SHEEP  MSLQRIVRVSLEHPTSAVCVAGVETLVDVYGSVPEGTEMFEVYGTPGVDVYICPSVERDR 60
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA MSLQRIVRVSLEHPTSAVCVAGVETLVDIYGSVPEGTETFEVYGTPGVDIYISPNMKASR 60
TR|E2R691|E2R691_CANFA MSPQRIVRVSLEHPTSAVCVAGVETLVDIYGSVPEGTEMFEVYGTPGVDVYISPSMERGR 60
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK MAQQRRVQLCTQRPTSTVCVLGTELSLDIQGSAPKDAIAFHVQGTPGVKVYVVHETQSVK 60
                        *: ** *::. ::***:*** *.*  :*: *:.*: :  *.* *****.:*:  . :  :

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  ERADTRRWRFDATLEIIVVMNSPSNDLNDSHVQISYHSSHEPLPLAYAVLYLTCV---DI 117
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  ERADTRRWCFNKGLEIIVIMNSPSNDLNDSHVQIAYHSSREHLPLAYAVLYLTCV---DI 117
SP|O02849|PADI3_SHEEP  ERAVARRWHFDMGSQIVVVMNSPSNVNDTVTFKFPTIPAETPRPLAYAVLYLTCV---DI 117
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA ERADTRRWHFNRGLEIIVVMNSPSNDVNDSHVQISYHSRKEPLALAYAVLYLTCVEWTDI 120
TR|E2R691|E2R691_CANFA ERADTRRWHFDNGLEIIVVMNSPSNDLNDSHVQISYHSSHEPLPLAYAVLYLTCV---DI 117
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK LPSSVTRWPLATGTEVLLTMEAISKDVGDEKVRISYFGEASGVPVGRAMLYLTCV---DI 117
                          : . ** :    :::: *:: *:       .::           :. *:******   **
```

```
SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  SLDCDLNCEGRQDRNFVDKRQWVWGPSGYGGILLVNCDRDDPSCD-----------VQDN 166
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  TLDCDMNCADRQDRSFVDKRQWVWGPDGYGAILLVNCDRDNVDSN-----------AQDN 166
SP|O02849|PADI3_SHEEP  TLDCDLNCEGRQDRDFVDKLQWVWGPSGHGAVLLVNCDRDSMSSN-----------DQEH 166
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA SLDTDMNCNGKVERNYVDKRQWVWGPGGHGAVLLVNCDRDDLTCD-----------KRDN 169
TR|E2R691|E2R691_CANFA ALDCDLNCEGRQDRSYVDKRQWVWGPGGYGAVLLVNCDRDDVTCY-----------DQDN 166
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK SLDADTGRNGSVSKTLVDKATWTWGPDGHGAILLVNCDCDDPKSRLMGDSSEPQSQLTDN 177
                        :** *       .:  ***  *.*** *:*.:****** *.  .             :.

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  CDQHVHCLQDLEDMSVMVLRTQGPAALFDDHKLVLHTSSYDAKRAQVFHICGPEDVCEAY 226
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  CDQYVRCLQDLEDMSVMVLRTQGPEALFEDHRLILHTSSCDAERARVFHVCGPEDSCESY 226
SP|O02849|PADI3_SHEEP  CDHHVRCLQDLEDMSVMILRTQGPDALFDDHKLVLHTSRADAERARVFHACGPEDSCEAY 226
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA CDKCVRCLEDLQDMSLMILRTQGPTALFDDHKLVLHVSSFDAERARVFHACGPEDVCESY 229
TR|E2R691|E2R691_CANFA CDRHVNCLQDLEDMSVMVLRTQGPAALFDDHKLILHTSSYDAKWARVFHACGPEDSCEAY 226
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK RDTVVCSYEDLKDMSQMVLRTRGPRTIFTGHGLVLHVNFSDADKVGVFYG-GNSIALEEY 236
                         *  * . :**:*** *:***:** ::*  * *:**..  **. . **:  * .   * *

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  RHVLGQDKVSYEVP-RLHGDEERFFVEGLSFPDAGFTGLISFHVTLLDDSNEDFSASPIF 285
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  KCVLGPDRMSYEVP-RLKGYEERFFVEGLSFPDAGFPGLISFHVTLLDDSNEDFSETPIF 285
SP|O02849|PADI3_SHEEP  RHVLGQNKVSYEVP-RFHGEEERFFVEGLSFPDAGFSGLVTFHVTLLDDSNEDFSESPIF 285
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA RYALGPNKVSYVVP-RSNGEEERLYVEGLSFPDAGFSGLITFHVTLLDDSNQDFPESPIF 288
TR|E2R691|E2R691_CANFA RHVLGQNKVSYEVP-RFHGDEERFFVEGLSFPDARFTGLVSFHVTLLDDSNEDFSESPIF 285
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK KHVLGGEKLAYAVKPSQHQEESIFYVEGLAFPDVSFSGLVAFHVTLLESPEKGLLETPIF 296
                       : .** ::::* *    .  *. ::****:***. * **::******:. :: :  :***

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  TDTVVFRVAPWIMTPSTLPPLEVYVCRVRNNTCFVDAVAELARKAGCKLTICPQAENRND 345
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  TDTAVFRVAPWIMTPSTLPPLEVYVCRVRNNTCFVEAVEELARKAGCKLTICPQAENRND 345
SP|O02849|PADI3_SHEEP  TDTVVFRVAPWIMTPSTQPPLEVYVCRVRNNTCFVDAVAELARRAGCKLTVCPQAENRND 345
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA TDTVIFRVAPWIMTPSTLPPVEVYVCKVRNNTHFVEAVAELARKADCKLTICPQAENRND 348
TR|E2R691|E2R691_CANFA TDTVVFRVAPWIMTPSTLPPLEVYVCRVRNNTCFVDAVAELARKAGCKLTVCPQKENRND 345
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK TDTVVFRMAPWIMTPNTLAPLEVFVCSVKDNEDFVAAVSALAEEAKCPVTICPLPENRND 356
                       ***.:**:*******.*  *:**:** *::*  ** **  **..* * :*:**  *****

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  RWIQDEMELGYVQAPHKTLPVVFDSPRNGELQDFPYKRILGPDFGYVTREPRDRSVSGLD 405
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  RWIQDEMELGYVQAPHKTLPVVFDSPRNGELQGFPYKRILGLDFGYVTREPKDSSVSGLD 405
SP|O02849|PADI3_SHEEP  RWIQDEMELGYIQAPHKTFPVVFDSPRNGELQNFPYKRILGPDFGYATREPRDNSVSGLD 405
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA RWIQDEMELGYIQAPHKTFPVVFDSPRNGELQDFPYKRILGPDFGYVTREPRNKSVSGLD 408
TR|E2R691|E2R691_CANFA RWIQDEMELGYVQAPHKTFPVVFDSPRNGELQDFPYKRILGPDFGYVTREPQDSSVSGLD 405
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK RWIQDEVEFGYVQAPHKMFPVVLDSPRDRGLKDFPVRSILGPDFGYVAQETPE-NTSSLD 415
                       ******:*:**:***** :***:****:  *: ** : *** ****.::*  : ..*.**

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  SFGNLEVSPPVVANGKEYPLGRILIGGNLPGSSGRRVTQVVRDFLHAQKVQPPVELFVDW 465
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  SFGNLEVSPPVVANGKEYPLGRILIGGNLPGSSGRRVTQVVRNFLHAQKVQPLVELFVDW 465
SP|O02849|PADI3_SHEEP  SFGNLEVSPPVVANGKEYPLGRILFGGNLPGSSGRRVTQVVRDFLHAQKVQPPVELFVDW 465
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA SFGNLEVSPPVVANGKEYPLGRILIGGNLPGSSGRRVTQVVRDFLYAQKVQPPVELFVDW 468
TR|E2R691|E2R691_CANFA SFGNLEVSPPVVADGKEYPLGRILIGGNLPGSSGRRVTQVVRDFLYAQRVQPPVELFVDW 465
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK SFGNLEVSPPVTVRSKEYPLGRILIGSSFPRFGGRRMAKAVRNFLAAQRVQAPVELFSDW 475
                       ***********.. .*********:*..:*   ***:::.**:** **:**  **** **

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  LAVGHVDEFLSFVPAPDGKGFRMLLASPGACFKLFQEKQKCGHGRALLFQGVVDDEQVKT 525
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  LAVGHVDEFLSFVPAPDGKGFRLLLASPGACFRLFQEKQKWGHGRSLLFEGVIGDRRVQT 525
SP|O02849|PADI3_SHEEP  LAVGHVDECLSFVPATDGKGFRMPLASPSACFKLFQEKQKWGHGGALLFQGVIGNQQVNT 525
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA LAVGHVDEFLSFVPVPDDKGFRLLLASPGACFKLFQEKQKWGHGQALLFEGVVGSNQVKT 528
TR|E2R691|E2R691_CANFA LAVGHVDEFLSFVPAPDGKGFRMLLASPSACFKLFQEKQKWGHGRALLFKGVVGDKPVHT 525
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK LQVGHVDEFLSFIPAPDRKGFRLLLASPSACYQLLREKQEMGYGEATMFQGLHGV---PK 532
                       * ****** ***:*. * ****: ****.**::*::***: *:* : :*:*:       .

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  ISINQVLSNKDLINYNKFVQSCIDWNREVLKRELGLAECDIIDIPQLFKTER-KKATAFF 584
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  VSINQILNNQSLINFNKFAQSCIDWNREVLKRELGLAEGDIIDIPQLFKTEK-RKAVAFF 584
SP|O02849|PADI3_SHEEP  VSISQVLSNGSLIGYNKFVQSCIDWNREVLKRELGLAERDIVDIPQLFKMER-RKAVAFF 584
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA MSINQILSNENLISYNKFVQSCIDWNREVLKRELGLTDRDIIDIPQLFKRER-RKAVAFF 587
TR|E2R691|E2R691_CANFA VSINQVLSNVDLISYNKFVQSCIDWNREVLKRELGLTERDIVDIPQLFKTER-KKAVAFF 584
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK PSISEILGNEALRKFNAYAQSCISWNRDILKRELGLAEQDIIDIPQLFQADHQARAVAYF 592
                        **.::* *  *  :* :.****.***::*******:: **:******: ::  :*.*:*

SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPIINGCCCLEEKVRSLLEPLGLHCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPIINGRCCLEEKVRSLLEPLGLHCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
SP|O02849|PADI3_SHEEP  PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPVINGRCCLEEKVRSLLEPLGLRCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA PDLVNMLVLGRHLGIPKPFGPIINGRCCLEEKVRSLLEPLGLQCNFIDDFTPYHMLHGEV 647
TR|E2R691|E2R691_CANFA PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPIINGQCCLEEKVRSLLEPLGLHCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK PDMVNMLVLGRHLGIPKPFGPLVDGQCCLEERVRALLQPLGLSCTFINDYFSYHKLAGEV 652
                       **:*******:**********:::* *****:**:**:**** *.**:*:  ** * ***
```

```
SP|Q9ULW8|PADI3_HUMAN  PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPIINGCCCLEEKVRSLLEPLGLHCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
SP|Q9Z184|PADI3_MOUSE  PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPIINGRCCLEEKVRSLLEPLGLHCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
SP|O02849|PADI3_SHEEP  PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPVINGRCCLEEKVRSLLEPLGLRCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
TR|G3VER6|G3VER6_SARHA PDLVNMLVLGRHLGIPKPFGPIINGRCCLEEKVRSLLEPLGLQCNFIDDFTPYHMLHGEV 647
TR|E2R691|E2R691_CANFA PDLVNMLVLGKHLGIPKPFGPIINGQCCLEEKVRSLLEPLGLHCTFIDDFTPYHMLHGEV 644
TR|F1NP39|F1NP39_CHICK PDMVNMLVLGRHLGIPKPFGPLVDGQCCLEERVRALLQPLGLSCTFINDYFSYHKLAGEV 652
                       **:*******:**********:::* *****:**:**:**** *.**:*:  ** * ***
```

Figure S3. Sequence alignments for PADI3. When we assessed evolutionary conservation of the three substituted amino acids, we found that all of them were located. (A) at well-conserved positions across various human PADIs and (B) across PADI3 from distinct species, thus suggesting that these mutations may alter the protein function. (A) The sequences of human PADI3 and paralogous genes (GenBank accession numbers AB033768, AB03176, AB026831, AB017919 and AY422079) were aligned using MultAlin.4 Amino acids conserved at 90% and 50% are indicated in red and blue, respectively. The three mutated amino acids of PADI3 are surrounded. (B) Primary sequences of human PADI3 and Padi3 from other species (chicken, mouse, sheep, dog (CANFA) and Tasmanian devil (SAHRA) were aligned using Clustal Omega (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute). The three mutated amino acids of PADI3 are depicted in red.

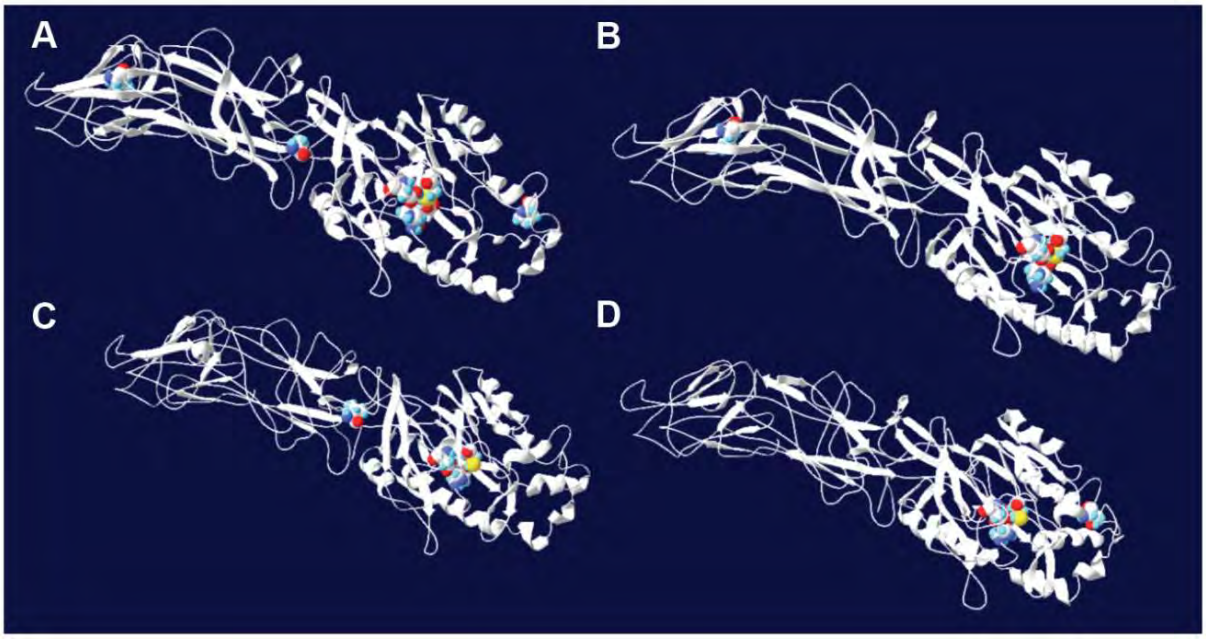


Figure S4. Topological tridimensional models of WT and mutant PADI3. Localization of the 4 major amino acids involved in the catalytic sites and of the 3 amino acids involved in the UHS missense mutations. Overall view of the tridimensional solid ribbon representation of calcium-bound PADI3 models, including WT and three missense mutants. Residues Leu112, Ala294 and Pro605 are reported on the model of the (A) WT enzyme, as well as the corresponding substituted amino acids on the structure of the three mutants (B) p.Leu112His, (C) p.Ala294Val and (D) p.Pro605Thr. (A-D) The four major amino acids involved in the catalytic site are also shown. According to these models, the (C) p.Ala294Val and (D) p.Pro605Thr substitutions induce a profound disorganization of the immunoglobulin-likes domains, with clear disappearance of several beta-sheets, and disruption of some alpha-helices in the catalytic domain, as compared to the WT. Effects of the (B) p.Leu112His substitution are more discrete.

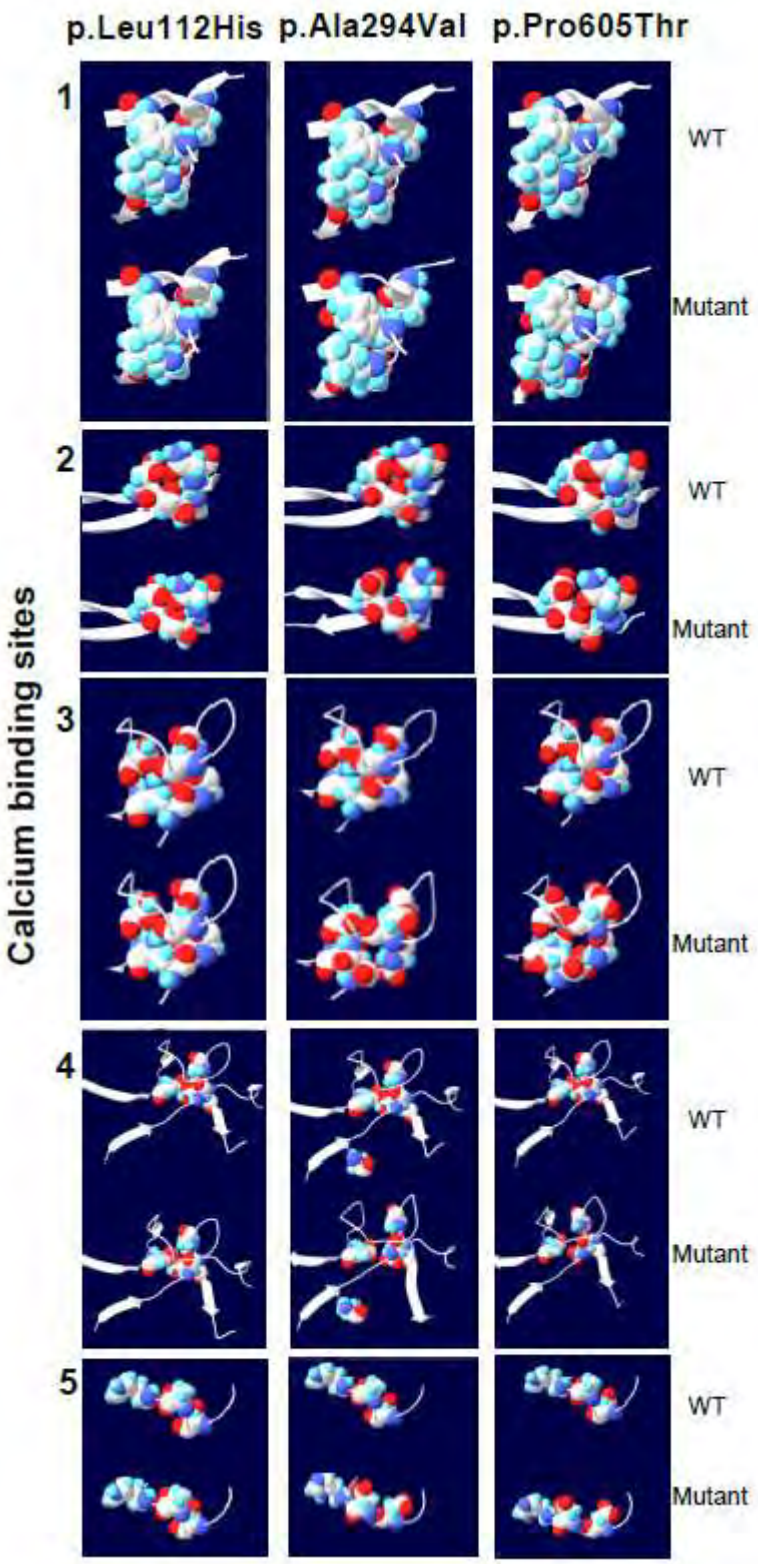


Figure S5.Topological tridimensional models of WT and mutant PADI3 : Predicted calcium binding sites. Zoom on the amino acids involved in the five calcium-binding sites (1-5). As previously published,5 these amino acids (Table S2) were defined by analogy, after a multiple alignment, to the residues of the five calcium binding sites of PADI4 [MIM 605347].[6] None of the substituted amino acids are directly involved in calcium binding. Nevertheless, the predicted models of p.Ala294Val and p.Pro605Thr mutants show clear spatial modifications of, at least, the calcium-binding sites 2-5.

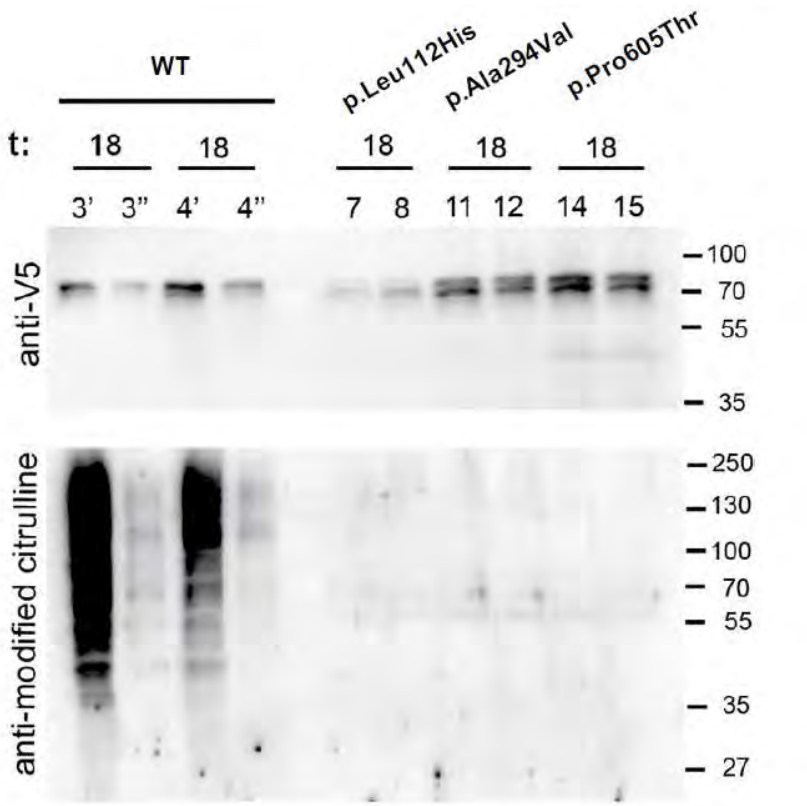


Figure S6. Absence of activity of mutant PADI3 produced in bacteria. Extracts of *E. coli* producing WT PADI3 were diluted either four (3' and 4') or eight times (3" and 4") in order to adjust the amounts of PADI3, as compared to undiluted extracts containing the mutant enzymes, p.Leu112His (clones 7 and 8), p.Ala294Val (clones 11 and 12) and p.Pro605Thr (clones 14 and 15). The extracts were then incubated for 18 hours with calcium, as indicated. After incubations, proteins were immunodetected with either the anti-V5 antibody or anti-modified citrulline antibodies. While citrullinated proteins were detected in the WT-containing extracts, no citrullinated proteins were detected in the mutant-containing extracts. Molecular mass markers are indicated on the right in kDa.

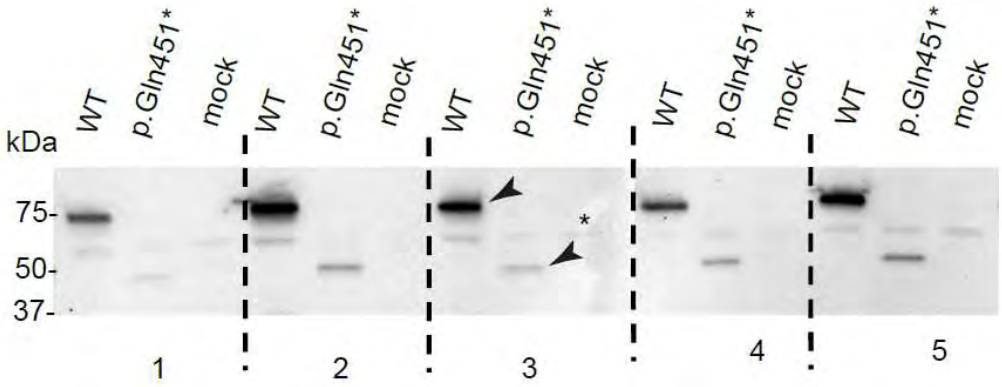


Figure S7. Immunoblotting of HEK293T extracts producing WT and mutant TGM3. Immunoblotting analysis shows the detection of WT and truncated TGM3 in transiently transfected HEK293T cells, which were collected 48 h post-transfection. Cell extracts from independent transfections (1-5), were concurrently immunoblotted (1-3, 4-5) with an anti-Flag antibody. Antibody- specific bands showing the WT (~70 kDa) and truncated TGM3 (~40 kDa) are indicated with an arrow and a non-specific cross-reactive band around 55 kDa is indicated with an asterisk. A persistent lower detection level was observed for the mutated protein in comparison to the WT TGM3. Relative protein quantification was performed using Stain-Free technology that is based on normalization by the total lane protein content (Bio-Rad Laboratories).

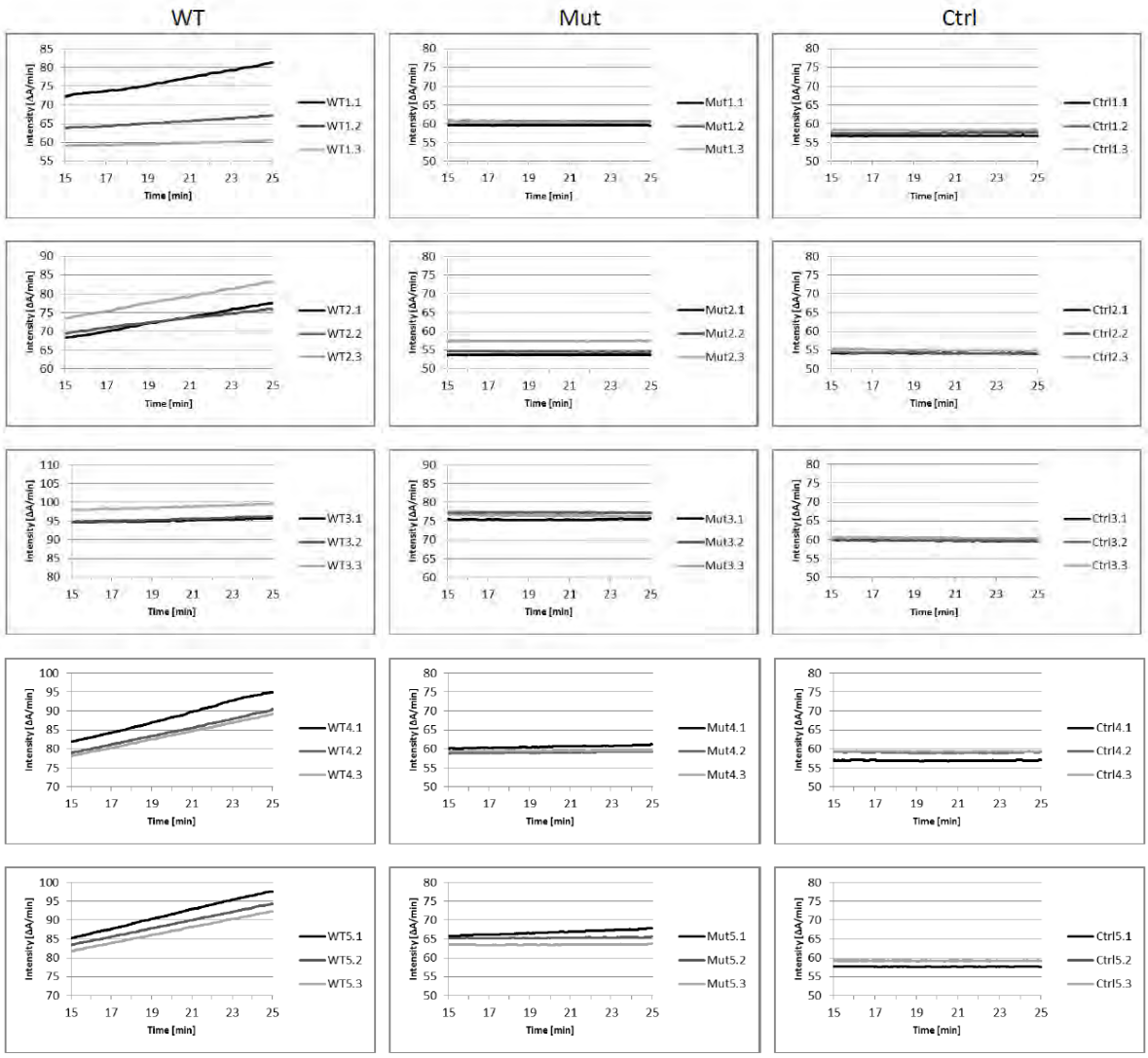


Figure S8. Transglutaminase activity of TGM3 produced in HEK293T cells. Fluorescence intensity augmentation by incorporation of monodansylcadaverine into casein. Measurements from five independent transfections are presented in rows. Three technical replicates for each sample are depicted with color-coded lines. Linear slopes of the measurements represent the transglutaminase activity.

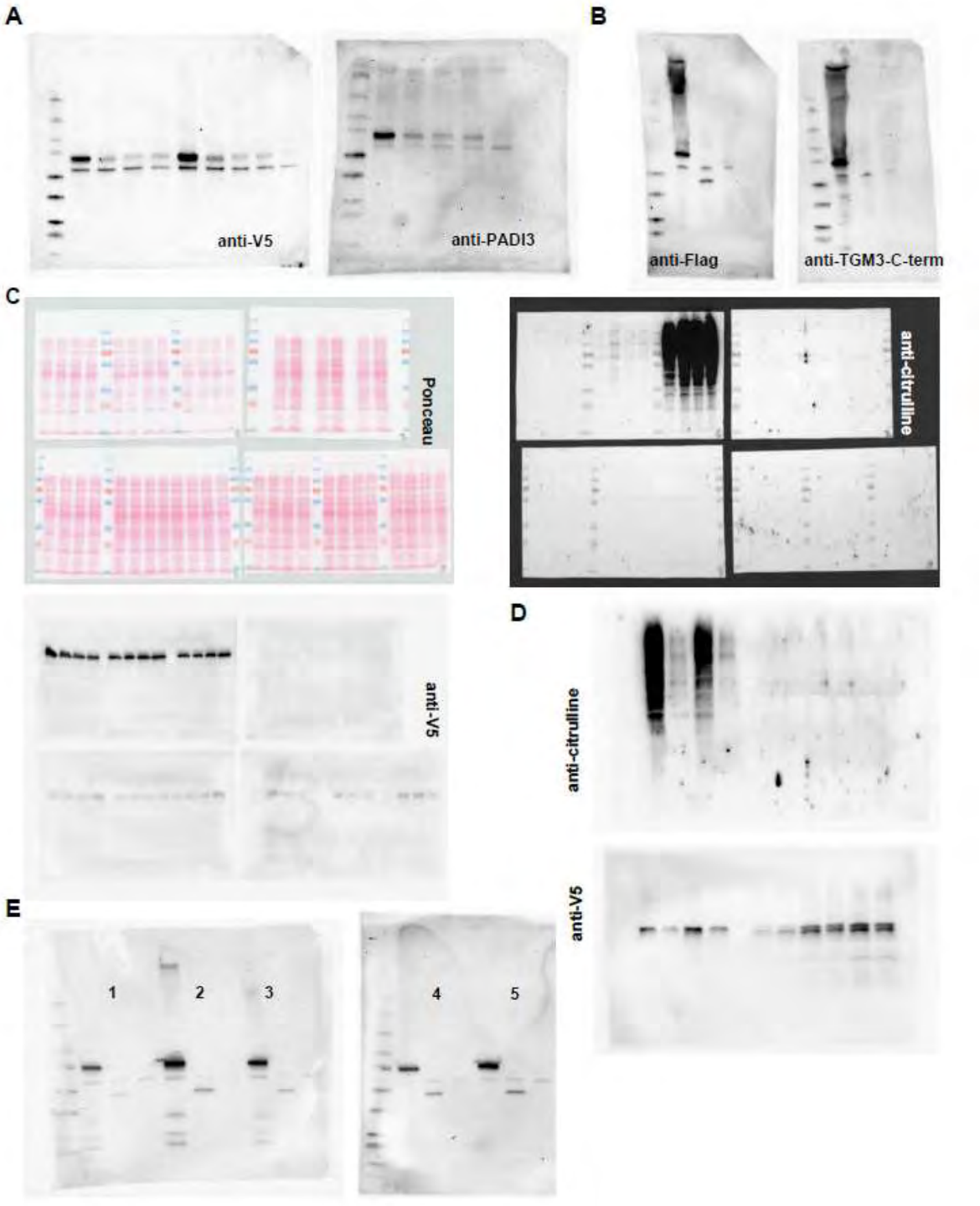


Figure S9. Full-length gel and blot images from the main figures. Full-length images of the blots/gels in (A) Figure 4A, (B) Figure 7A, (C) Figure 5B, (D) Figure S6 and (E) Figure S

Supplemental tables

Table S1. Primers used for sequencing of *PADI3*

Amplicon	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
PADI3_Ex1	CTGAGCTCTCAGCTCTGGGA	TCTTCTACCTGGCTCAGCC
PADI3_Ex 2	GCTTGACTCGCAGGAGCTTA	TCTGTAACTTGCAGAGCTGG
PADI3_Ex 3	GGCACAGAGGAGGTTAAAGAA	TCCATTTGTGGAGGCTTAGC
PADI3_Ex 4	CCTCTTGGATGGTGTCTCCTT	AGTCCAGAAGGTCTTGATCCC
PADI3_Ex 5	GCCATTGACATGTCTTGAGAA	AGCATCGAGGTGTGTCTGG
PADI3_Ex 6	CAGCTGGCTATGCCACACT	TTCTGACTGTTCTTACTGCG
PADI3_Ex 7	CCACTGTGTATTACCTGTCCT	TGATCATGGCTCACTGCAAC *TAGGTGTACACCACTATACC**
PADI3_Ex 8/9	GGTTCATTTCCATCTTGCAGA	TGTTGAATCCAGGATCAGC
PADI3_Ex 10	CTGACCTGGGCACATTTATG	TTTAGGGCTGCCAGATTCAG
PADI3_Ex 11	CTCAGGCTCCATGTCCGAT	AATGATCTCTTAGGTCTCTGC
PADI3_Ex 12/13	AGATTTTCCTGGATGGTGGG *GCAGGAATGCTAAACTCTTGT**	AGTCCATGTCCACCTTCTATC
PADI3_Ex 14/15	GGCTGCTGACTCGGCAAGA	TCCCAGCTGATGCCATGTGC
PADI3_Ex 16	CCAGAGTGAGTTCTGCGGAT	AAGTCTGAGAACCACATGGG

Primer pairs are used both for amplicon generation and Sanger sequencing reactions. *Additional primers were used for the cycle sequencing reaction in order to cover the whole region.

Table S2. Primers used for sequencing of *TGM3*

Amplicon	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TGM3_Ex 1	AGGCAATCCTTGGCAGCCTG	GATGTCCAGCTGCACTGAACA *AAGGCAGGCAGCTGTCCTGG**
TGM3_Ex 2	AGGATGCACAGAGGTTCAGC	AGAGATGGACAGCAACTTGC
TGM3_Ex 3	GTTGTATTGGAACCTGGTCT	TGCTTAAGTGTCAGAGCTCC *TAGGCCAGGGCTGAGAGTGTG**
TGM3_Ex 4	AAGCAGCTGTCTGAGTGTGG	ACACTAAGGAAGTGTCATCGC
TGM3_Ex 5	TCAGTAGCTCTCAGTTCCAG	TACTCACTGTGTGCCTCAGG
TGM3_Ex 6/7	ACTGTGACAGCAGTGATAGCC	AGACTAGCAGACCGCAGAGC *GTGAGAGCGAGAAGCCACTCA**
TGM3_Ex 8	ACTCACTCGATGCATGTTGTC	AGGCTCTGTGCAGCAACAGTG
TGM3_Ex 9	TTGCAGTGGTCCTGGAAGGC	AGGCAGAACTGGCTGCCAGTG
TGM3_Ex 10	TCCGGTTAAGACAGGCGAGC	TGTGCCATAGCTATGAACTGC
TGM3_Ex 11	TGGCCCAAGGAGGGCTCAGTC	TGGGAGAGCTGTGGCTCACAG
TGM3_Ex 12	AGCACAGGATAATGTCCTGG	AGATTCTAGAGTTCCAAGACC
TGM3_Ex 13	AACAGGACAGGAGGTCACAG	TCCATGGTGAGCTCTCCCTG

Primer pairs are used both for amplicon generation and Sanger sequencing reactions. *Additional primers were used for the cycle sequencing reaction in order to cover the whole region.

Table S3. Primers used for sequencing of *TCHH*

	Sequence (5'-3')
TCHH_EX 2F TCHH_EX 2R	**GGTGGAGAGCTGGAAGAAAGACA TGGGGGATGTAGTGTAGACCTGTT**
TCHH_EX 3F TCHH_EX 3R	**TGAGCTCTTCATGGGACATTACCACA TGCACTTTCCACAAGATGGGTCA**
TCHH_SF1	*GCTCTGAATGTCTCTTGAATGTCA*
TCHH_SF2	*CAAAGGCAAGAATGGCAAGAA*
TCHH_SF5	*CTAGCTGAGGAGGAGCAGGAACA*
TCHH_SF6	*GTGGCAACTAGAAGAAGAAAGGA*
TCHH_SF8	*CAAAGGCAGAGAGAATGAACAGTT*
TCHH_SF16	*CAGCAGCGGGAACAACGGTTTCT*
TCHH_SF20	*CGAACAGGAACTGCGCAGTCAGGA*
TCHH_SF23	*GAGCAGCTGCTGAGAGAGGAACA*
TCHH_SEQ1F	*TGGAGCGGCAAGAGCTGAG*
TCHH_SEQ3F	*TCGGAAGGATAAGAAGCTG*
TCHH_SEQ5F	*AGAGTCGTCGTGAGGAACAAG*
TCHH_ EX3.2F	*CGCAGGCAGAAGAGGCAGGAA*
TCHH_ EX3.3F	*GCGGTTGAGGAGCGAGCAAC*
TCHH_ EX3.4F	*CCAGCAGCGGGAACAACGGT*
TCHH_ EX3.5F	*GCGGGAGAGGCAGTATCGGG*
TCHH_ EX3.6F	*CAGCGCGACAGGCATTTCC*
TCHH_ EX3.7F	*CAACAGCTGCGTCACGACCG*
TCHH_ EX3.1R	*CTGTCTTGCCGCTCTCGCCT*
TCHH_ EX3.3R	*CTTGGCGTACAGCGTGTGGC*
TCHH_ EX3.4R	*TGTCGCGCAGCTGGGAATCT*
TCHH_SR2	*TCCTTTCTTCTTCTAGTTGCCAC*
TCHH_SR3	*CAGCTTCTTATCCTTCCGA*
TCHH_SR4	*AACTGTTCATTCTCTCTGCCTTTG*
TCHH_SR5	*CTTGTTCCTCACGACGACTCT*
TCHH_SR9	*GACGGAGCTGCTCTTCCTCTAGGAT*
TCHH_SR10	*CCAGCGATACTTTCCGTCACGCTGTT*
TCHH_SR11	*GAGGAAGAACAGCTGGAGCGAGA*

Primer pairs used for amplicon generation are given in bold and primers used for cycle sequencing reactions are given in italic. Presence of *TCHH* mutations in the coding sequence in screened individuals could not be entirely excluded as overlapping and/or individual regions could not be sequenced in different individuals due to technical limitations arising from the repetitive regions

Table S4. Primers used for cloning and mutagenesis

Construct	**Primers**
PADI3 WT	PADI3-WT-F: 5' ACCATGTCGCTGCAGAGAATCGTG 3'' PADI3-WT-R: 5' GGGCACCATGTTCCACCAC 3'
PADI3 p.Leu112His	PADI3-Mut-p.L112H-F:5' CCTATGCGGTGCTCTACC**A**CACCTGTGTTGACATCTC 3' PADI3-Mut-p.L112H-R: 5' GAGATGTCAACACAGGTG**T**GGTAGAGCACCGCATAGG 3'
PADI3 p.Ala294Val	PADI3-Mut-p.A294V-F: 5' GTGGTGTTCCGAGTGG**T**ACCCTGGATCATGACG 3' PADI3-Mut-p.A294V-R: 5' CGTCATGATCCAGGGT**A**CCACTCGGAACACCAC 3'
PADI3 p.Pro605Thr	PADI3-Mut-p.P605T-F: 5' CCCCAAGCCCTTTGGG**A**CCATCATCAATGGCTG 3' PADI3-Mut-p.P605T-R: 5' CAGCCATTGATGATGG**T**CCCAAAGGGCTTGGGG 3'
TGM3 WT	TGM3-WT-F: 5'ACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGCCAGGACCAATGGCTGCT CTAGGAGTCC 3' TGM3-WT-R: 5' TCATTCGGCTACATCGATG 3'
TGM3 p.Gln451*	TGM3-Mut-p.Q451*-F: 5' GCTCTGACCAGGAAAGATAAGTGTTCCAAAAGGCT 3' TGM3-Mut-p.Q451*-R: 5' AGCCTTTTGGAACACTTATCTTTCCTGGTCAGAGC 3'

The N-terminal flag tag sequence fused to *TGM3* is given in italic. The locations of the mutations are given in bold in the respective mutagenesis primers. WT; wild type; Mut, mutant; F; forward; R; reverse.

Table S5. PADI3, TGM3 and TCHH mutations in ExAC database

Variant[a]	Gene	Consequence	Allele count	Total allele	Homozygous individuals	Allele frequency
1:17588689 T / A (rs142129409)	*PADI3*	p.Leu112His	459	111360	0	0.004122
1:17597423 C / T (rs144080386)	*PADI3*	p.Ala294Val	809	121318	5	0.006668
1:17609392 C / A (rs144944758)	*PADI3*	p.Pro605Thr	51	113490	0	0.0004494
20:2312665 C / T (rs779702016)	*TGM3**	p.Gln451*	1	114212	0	0.000008756
1:152084702 G / A (rs201930497)	*TCHH**	p.Gln331*	43	112892	0	0.0003809

[a]Variants are annotated by genomic location based on hg19, nucleotide substitution and their dbSNP IDs.* None of the sequenced individuals in ExAC database carry a loss of function mutation in homozygous state in these genes.

Table S6. Amino acid residues and positions[#] involved in the 5 calcium binding sites and the catalytic site of PADI3

Calcium binding sites	Residue-position
1	Gln-349 / Glu-353 / Phe-407 / Leu-410 / Glu-411
2	Glu-351 / Asp-369 / Ser-370 / Asn-373
3	Asn-153 / Asp-155 / Asp-157 / Asp-165 / Asp-176 / Asp-179
4	Asp-155 / Asp-157 / Asp-179 / Asp-388
5	Asp-165 / Asp-168 / His-170
Catalytic site*	Asp-350 / His-470 / Asp-472 / Cys-646

[#]Positions of calcium-coordinating and catalytic site residues are reported according to the PADI3 primary sequence (GenBank accession number AB026831) after a multiple alignment, as previously described.[7] They have been defined by analogy to the analysis of PADI4 crystal structure analysis.[6] *The 4 major amino acids of the catalytic site are mentioned.

Supplemental References

1. Nissen, C.V., and Svendsen, M.T. (2013). [Uncombable hair syndrome]. Ugeskr Laeger 175,2878.
2. Novoa, A., Azon, A., and Grimalt, R. (2012). [Uncombable hair syndrome]. An Pediatr 77, 139-140.
3. Kilic, A., Oguz, D., Can, A., Akil, H., and Gurbuz Koz, O. (2013). A case of uncombable hair syndrome: light microscopy, trichoscopy and scanning electron microscopy. Acta Dermatovenerol Croat 21, 209-211.
4. Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res 16, 10881-10890.
5. Mechin, M.C., Coudane, F., Adoue, V., Arnaud, J., Duplan, H., Charveron, M., Schmitt, A.M., Takahara, H., Serre, G., and Simon, M. (2010). Deimination is regulated at multiple levels including auto-deimination of peptidylarginine deiminases. Cell Mol Life Sci 67, 1491-1503.
6. Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., and Sato, M. (2004). Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. Nat Struct Mol Biol 11, 777-783.
7. Mechin, M.C., Sebbag, M., Arnaud, J., Nachat, R., Foulquier, C., Adoue, V., Coudane, F., Duplan, H., Schmitt, A.M., Chavanas, S., et al. (2007). Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. Int J Cosmet Sci 29, 147-168.

DISCUSSION ET PERPSECTIVES

Afin de démontrer l'importance de la désimination dans l'homéostasie épidermique et le follicule pileux, plusieurs approches ont été employées au cours de ma thèse.

Dans les deux premières études que j'ai menées, correspondant aux articles 1 et 2, j'ai utilisé des épidermes reconstruits humains (ERHs), produits *in vitro* à partir de kératinocytes primaires isolés de plasties abdominales humaines. Ce type de modèle, de plus en plus utilisé, permet de travailler sur des cellules humaines, dans un contexte proche de celui que l'on trouve *in vivo*. Les ERHs présentent en effet les quatre couches cellulaires de l'épiderme (couche basale à couche cornée) avec une expression des marqueurs de la différenciation semblable à celle de l'épiderme, et constituent donc un puissant outil pour l'étude de l'homéostasie et de la différenciation épidermique humaine, en comparaison aux cultures de kératinocytes en monocouche, dans lesquelles l'induction de la différenciation est limitée par le fait que les cellules sont immergées.

Dans ma première étude, l'utilisation d'ERHs m'a permis de tester l'influence du taux d'humidité ambiante sur la fonction de barrière épidermique et sur la protéolyse de la FLG, et d'ainsi mettre en exergue le rôle essentiel que joue la désimination dans ce processus. Les ERHs m'ont permis de confirmer, dans un modèle humain, des résultats obtenus avec des modèles murins dans les années 1980 à 2000 ; et cette étude n'aurait évidemment pas été réalisable avec des cultures de kératinocytes en monocouche.

Pour le second axe de mon projet, le Cl-amidine, un inhibiteur spécifique des PADs, a été utilisé dans les ERHs. Comme discuté en introduction (paragraphe IV.H), ce composé constitue un outil précieux pour l'étude du rôle des PADs. Il m'a ici permis de mettre en évidence un rôle potentiel de la désimination dans les processus autophagiques qui ont récemment été impliqués dans le programme complexe responsable de la différenciation terminale de l'épiderme.

Enfin, le troisième projet auquel j'ai participé correspond à une étude de cas cliniques dont l'objectif était d'identifier les mutations génétiques responsables d'une maladie du cheveu, le syndrome des cheveux incoiffables (article 3). Les conséquences fonctionnelles des mutations identifiées sur les gènes *PADI3* et *TGM3* ont notamment été analysées via des mesures d'activité des formes sauvages et mutées des enzymes correspondantes, produites par mutagénèse dirigée, et via la modélisation *in silico* des structures tridimensionnelles des PAD3 sauvage et mutées. En plus de contribuer à la compréhension de la maladie, cette étude collaborative a permis de démontrer le rôle de ces deux enzymes dans le métabolisme de la TCHH, troisième cible des mutations identifiées dans ce travail.

I. ROLE MAJEUR DE LA DESIMINATION DANS LE CONTROLE DU METABOLISME DE LA FILAGGRINE PAR LE TAUX D'HUMIDITE AMBIANTE

Scott et Harding en 1986, puis l'équipe de Denda dans les années 2000, ont montré dans des modèles murins que le taux d'humidité ambiante a une influence certaine sur la fonction de barrière de l'épiderme, et en particulier sur le métabolisme de la Flg (Scott et Harding, 1986; Denda *et al.*, 1998 ; Sato *et al.*, 2001 ; Katagari *et al.*, 2003). Par ailleurs, Akiyama et Senshu ont également montré dans l'épiderme de souris nouveau-nées que le déclenchement de la protéolyse de la Flg a lieu quelques heures après la naissance et qu'il est accompagné d'une augmentation du taux de protéines citrullinées au niveau de la couche cornée (Akiyama et Senshu, 1999).

Je me suis donc demandé si une telle régulation de la protéolyse de la FLG et de la désimination par le taux d'humidité ambiante existe aussi dans l'épiderme humain, et s'il y a un lien de cause à effet entre ces deux phénomènes. Pour répondre à cette question, des ERHs, produits dans une atmosphère humide ou sèche (humidité relative >95% versus 30-50%), ont été comparés.

A. Influence du taux d'humidité ambiante sur la fonction de barrière de l'épiderme humain

L'analyse comparative que j'ai menée m'a permis de démontrer que les variations d'humidité ambiante peuvent engendrer d'importants changements des propriétés structurales, biochimiques et fonctionnelles de l'épiderme humain (Figure 68). En particulier, la couche cornée des ERHs produits en condition sèche est composée d'un plus grand nombre d'assises de cornéocytes (environ 2 fois plus) que celle des ERHs produits en condition humide. Elle est ainsi plus épaisse. De plus, lorsque les ERHs sont produits en condition sèche, ils présentent une perte en eau trans-épidermique réduite et contiennent une quantité de PCA (dérivé de glutamine hautement hygroscopique composant le FNH) plus élevée. Ces données sont en accord avec celles obtenues par Denda *et al.* en 1998. Une hyperkératose (épaississement de la couche cornée) et une diminution de la perte en eau trans-épidermique ont été observées dans l'épiderme de souris *hairless* maintenues pendant deux semaines dans un environnement très sec (<10 % d'humidité relative). De plus, une augmentation de la quantité de lipides de la couche cornée, associée à une augmentation du nombre et de la sécrétion des corps lamellaires, a été rapportée par ces mêmes auteurs (Denda *et al.*, 1998). J'ai moi-même observé dans mon modèle une augmentation du nombre de corps lamellaires, en particulier au niveau de la seconde assise de la couche granuleuse en partant de la couche cornée (données non illustrées). Une étude récente rapporte également un épaississement de la couche cornée dans des

ERHs produits à 50% d'humidité relative, par rapport aux ERHs produits dans une atmosphère saturée en humidité. Une normalisation de l'aspect ultrastructural des *lamellae* lipidiques intercornéocytaires a aussi été observée, celui-ci se rapprochant de celui observé dans l'épiderme humain normal (Sun *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les analyses moléculaires de ce travail de thèse ont révélé, de manière originale, que les quantités de loricrine et d'involucrine, deux composants majoritaires de l'enveloppe cornée, détectées en western blot sont inversement modifiées entre conditions humide et sèche. En effet, la quantité de loricrine diminue en condition sèche alors que celle de l'involucrine augmente. En outre, l'expression de la TGase 5, une des enzymes clés impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée, ainsi que le nombre d'assises cellulaires présentant une activité Tgase, sont augmentés en condition sèche. Ceci répond tout d'abord au besoin de produire plus de cornéocytes et, de plus, suggère que la composition des enveloppes cornées est modifiée dans le but de s'adapter au taux d'humidité ambiante plus faible. En lien avec cette hypothèse, Sun *et al.* ont rapporté une augmentation de l'épaisseur de l'enveloppe cornée dans les ERHs produits à 50% d'humidité relative (8,6 ± 0,7 nm versus 11,1 ± 1,1 nm ; Sun *et al.*, 2015).

Enfin, il est particulièrement intéressant de noter que les ERHs que j'ai utilisés sont composés uniquement de kératinocytes. Les résultats que j'ai obtenus démontrent donc la capacité intrinsèque des kératinocytes épidermiques humains à s'adapter aux variations d'humidité ambiante. En modulant leur programme de différenciation, les kératinocytes sont ainsi capables à eux seuls de réagir au stress induit par la sécheresse de l'atmosphère, et d'ainsi renforcer l'efficacité de la barrière épidermique afin de limiter les déperditions en eau (Figure 68).

B. Influence du taux d'humidité ambiante sur le métabolisme de la FLG humaine

Mon travail de thèse a également permis de démontrer pour la première fois que le taux d'humidité ambiante contrôle la synthèse et la protéolyse de la FLG chez l'homme. En effet, une augmentation de la densité des granules de kératohyaline, associée à une augmentation du taux d'ARNm de *FLG*, a été mesurée dans les ERHs produits en condition sèche. La synthèse de la FLG (proFLG) est donc accrue lors d'une exposition de l'épiderme humain à un environnement sec. Ces résultats sont en accord avec les données précédemment observées dans l'épiderme de souris *hairless*, qui présente aussi une augmentation de la quantité de granules de kératohyaline lorsque les souris sont maintenues dans une atmosphère très sèche (Denda *et al.*, 1998).

De plus, la détection de la proFLG en immunofluorescence indirecte est nettement accrue au niveau de la couche granuleuse des ERHs produits en condition sèche, ce qui est en accord avec l'augmentation de la densité des granules de kératohyaline et du taux d'ARNm de *FLG*. Par contre, le

marquage de la couche cornée, correspondant aux monomères de FLG, diminue drastiquement. En accord avec cela, la détection des monomères de FLG en western blot est également fortement diminuée. De plus, les concentrations en UCA et PCA, deux dérivés d'acides aminés composant le FNH et générés suite à la protéolyse du monomère de FLG, sont en parallèle nettement augmentées. Ceci prouve donc pour la première fois que la synthèse de la FLG humaine et sa protéolyse complète sont activement stimulées lorsque l'épiderme humain est confronté à une atmosphère sèche. Tout tend à « produire plus pour consommer plus ».

Des observations similaires ont été faites antérieurement chez des rongeurs. Par exemple, durant les étapes tardives du développement fœtal du rat, la Flg est produite et s'accumule sur toute l'épaisseur de la couche cornée (Figure 64A.0). Quasi-immédiatement après la naissance, la protéolyse de la Flg est mise en place dans la couche cornée. Parallèlement la détection de la proFlg augmente fortement au niveau de la couche granuleuse, suggérant que la synthèse de proFlg est accrue (Figure 64A, panel de gauche, et 64B, symboles vides). Par contre, si les rats nouveau-nés sont maintenus dans un environnement saturé en vapeur d'eau, l'activation de la synthèse de proFlg et de la protéolyse de la Flg est bloquée (Figure 64A, panel de droite et 64B, symboles pleins). De plus, l'occlusion de la surface de la peau de rats adultes avec un film imperméable, mimant une humidité de 100%, empêche également la protéolyse normale de la Flg (Scott et Harding, 1986).

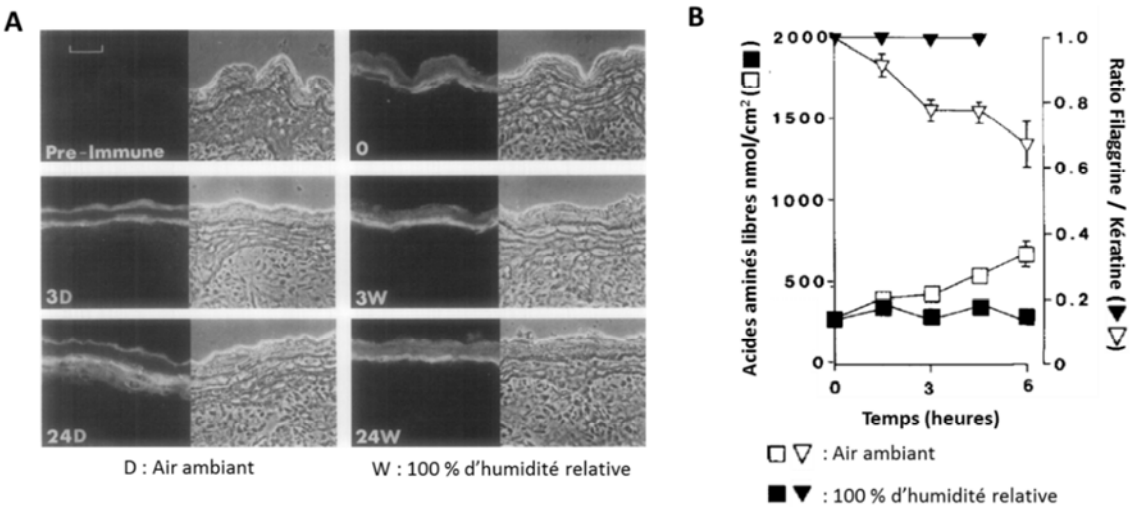


Figure 64 : Effet de l'humidité ambiante sur la protéolyse de la filaggrine dans l'épiderme de rat durant les heures suivant la naissance. (A) Immunodétection de la (pro)Flg sur cryocoupes de peau de rats nouveau-nés transférés dans les 10 minutes suivant la naissance dans une chambre à 37°C, contenant une atmosphère soit à humidité ambiante (40-60% d'humidité relative, D) soit saturée en vapeur d'eau (W). Pre-immune : sérum contrôle pré-immun purifié. 0 : épiderme de rat prélevé immédiatement après la naissance. 3D, 24D : épidermes de rats maintenus à humidité ambiante prélevés 3 et 24 heures après la naissance. 3W, 24W : épidermes de rats maintenus dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau prélevés 3 et 24 heures après la naissance. Barre d'échelle = 30 µm. (B) Des ratons nés par césarienne à 21 jours de gestation ont été directement placées dans une chambre à 37°C contenant une atmosphère soit à humidité ambiante (40-60% d'humidité relative, symboles vides) soit saturée en vapeur d'eau (symboles pleins). Les animaux ont été sacrifiés 0, 3 et 6 h après la naissance et des extraits de protéines totales et d'acides aminés libres de leur épiderme ont été préparés. Les quantités de monomères de Flg et kératines ont été estimées après analyse des protéines totales par SDS-PAGE, coloration au bleu de Coomassie et mesure de l'intensité des bandes correspondantes par densitométrie. D'après (Scott et Harding, 1986).

Cependant, certains résultats obtenus chez la souris *hairless* par l'équipe de Denda semblent en désaccord avec les données précédentes. Lorsque des souris *hairless* adultes sont transférées d'un environnement présentant une humidité normale (40-70% d'humidité relative) ou élevée (>80 % d'humidité relative) à un environnement très sec (<10% d'humidité relative), la détection de la (pro)Flg ainsi que la quantité d'acides aminés libres produits diminuent fortement dans les premières 24 heures après le transfert (Figure 65A et 65B). Pour les souris provenant de l'environnement normal, les quantités de (pro)Flg et d'acides aminés libres reviennent à un niveau normal après quelques jours passés dans l'environnement sec. Par contre, pour les souris provenant de l'environnement humide, les quantités de (pro)Flg et d'acides aminés libres restent faibles, même 7 jours après le transfert (Sato *et al.*, 2001 ; Katagiri *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent donc que quelques jours sont nécessaires à ce que la synthèse et la protéolyse de la Flg soient rééquilibrées lors d'une diminution de l'humidité ambiante. Cependant, si cette diminution est trop abrupte (>80 % d'humidité relative vers <10% d'humidité relative), il semble que les kératinocytes n'arrivent plus à adapter le métabolisme de la Flg, même au bout d'une semaine. On peut donc supposer que, lors d'une chute trop drastique de l'humidité ambiante, soit les kératinocytes ne sont plus aptes à s'adapter, soit le délai d'adaptation est prolongé, plusieurs semaines étant alors nécessaires.

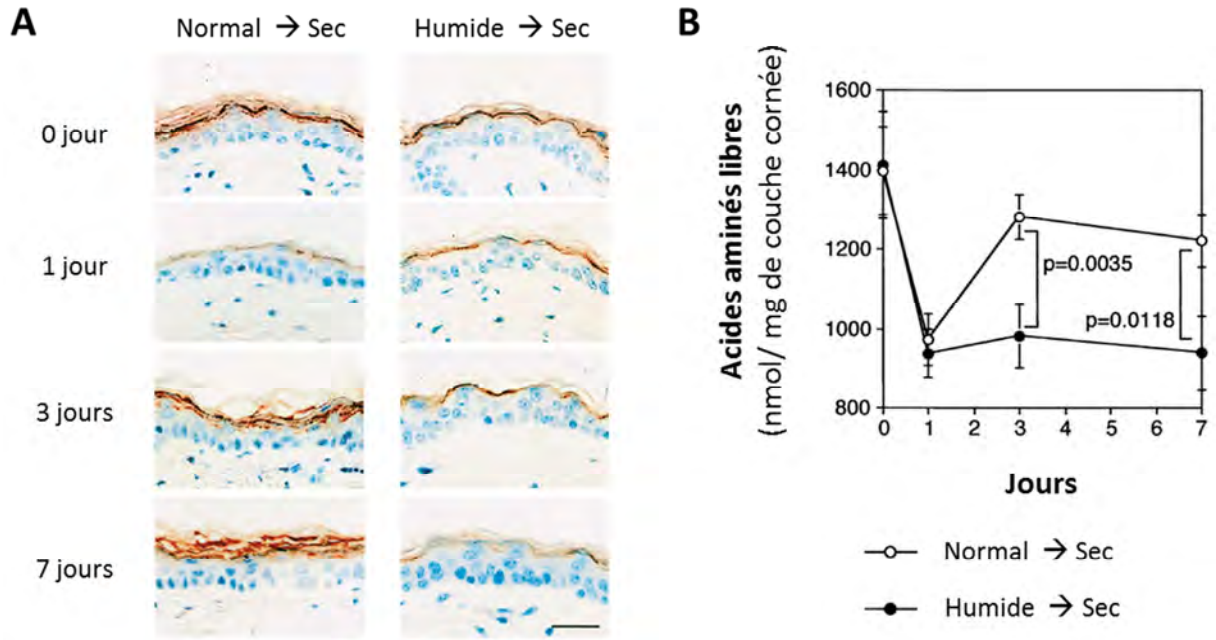


Figure 65 : Effet d'une diminution abrupte de l'humidité ambiante sur la protéolyse de la filaggrine dans l'épiderme de souris hairless. Des souris *hairless*, préalablement maintenues pendant deux semaines dans un environnement à 23-25°C présentant soit une humidité normale (40-70% d'humidité relative ; noté Normal) soit élevée (>80 % d'humidité relative ; noté Humide), ont été transférées dans un environnement très sec (<10% d'humidité relative ; noté sec). (A) Immunodétection de la (pro)Flg sur coupes de peau de souris sacrifiées 0, 1, 3 et jours après le transfert. (B) Dosage de la concentration en acides aminés libres de la couche cornée des souris, prélevée par délaminage au ruban adhésif 0, 1, 3 et 7 jours après le transfert. D'après (Katagiri *et al.*, 2003).

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces données démontre que la synthèse et la protéolyse de la FLG constituent un processus adaptatif du kératinocyte, contrôlé par le taux d'humidité ambiante aussi bien dans l'épiderme humain que murin.

C. Influence du taux d'humidité ambiante sur la désimination dans l'épiderme humain

Dans les ERHs produits en atmosphère sèche, j'ai montré que la quantité de PAD1 est augmentée, aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine, alors que l'expression de la PAD3 ne varie pas. De plus, l'activité des PADs est aussi augmentée. En effet, la quantité de protéines désiminées détectées au niveau de la couche cornée en immunohistologie et dans des extraits totaux de protéines en western blot est largement augmentée en comparaison aux ERHs produits en condition humide. Le taux de désimination de la FLG est aussi très fortement accru. En accord avec cela, Akiyama et Senshu ont démontré chez la souris que la quantité de protéines désiminées augmente fortement, quasi-immédiatement après la naissance, en parallèle à la mise en place de la protéolyse de la Flg (Figure 66A ; Akiyama et Senshu, 1999). De plus, ces auteurs ont mis en évidence par électrophorèse bidimensionnelle que la Flg n'est pas désiminée dans l'épiderme des embryons de souris (au 18ème jour du développement embryonnaire) et qu'elle le devient très peu de temps après la naissance (Figures 65A et 66B). La naissance, c'est-à-dire le passage de l'environnement intra-utérin aqueux à un environnement où le taux d'humidité est modéré, provoque donc une augmentation de la désimination de protéines épidermiques, et en particulier de la Flg.

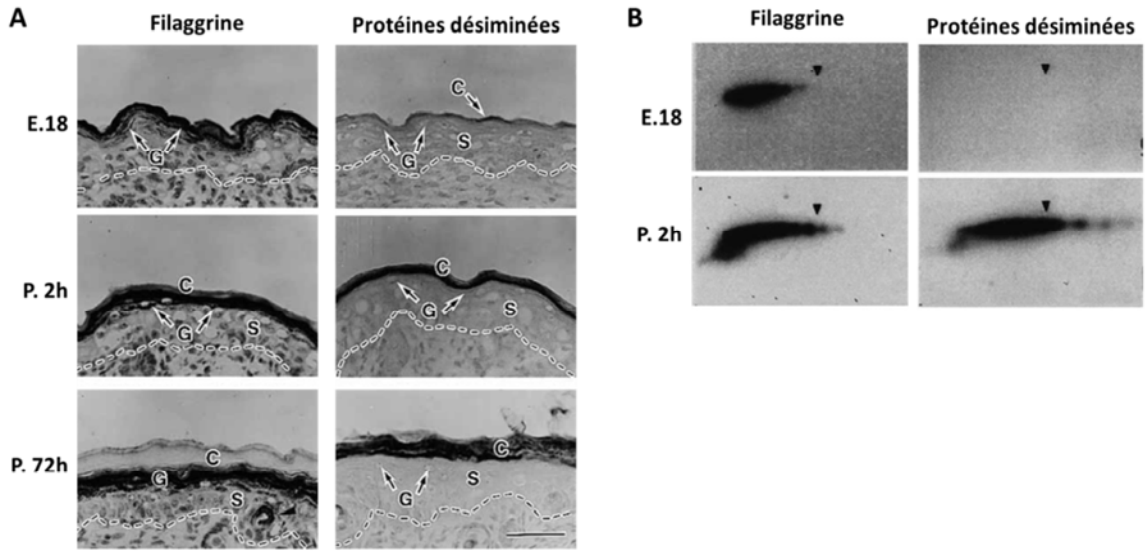


Figure 66 : Détection de la filaggrine, des protéines désiminées et de la filaggrine désiminée dans l'épiderme de souris avant et durant les heures suivant la naissance. (A) Immunodétection de la Flg et des protéines désiminées sur des sections de peau de souris au 18ème jour du développement embryonnaire (E.18) et 2 et 72 h après la naissance (P. 2h et P. 72h). G : couche granuleuse, S : couche épineuse, C : couche cornée. Barre d'échelle = 50 µm. (B) Analyse d'extraits d'épidermes de souris au 18ème jour du développement embryonnaire (E.18) et 2 h après la naissance (P. 2h) en électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une immunodétection de la Flg ou des protéines désiminées. D'après (Akiyama et Senshu, 1999).

Le taux de désimination épidermique semble donc contrôlé, tout du moins en partie, par le taux d'humidité ambiante, aussi bien chez la souris que chez l'homme. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation restent à explorer mais quelques données de la littérature permettent de proposer que le taux de calcium joue probablement un rôle important.

D'une part, le calcium régule à la fois l'expression et l'activité des PADs (voir paragraphe IV.E de l'introduction). Dong *et al.* ont notamment montré que lorsqu'une haute concentration en calcium (1,2 mM) est ajoutée au milieu de culture de kératinocytes humains, le taux d'ARNm puis la quantité protéique de PAD1 sont augmentés, au bout de respectivement 24 et 96 heures (Dong *et al.*, 2007a). Le calcium induit de même une augmentation de la transcription des gènes de la PAD2 et de la PAD3 (Dong *et al.*, 2005, 2006 ; Chavanas *et al.*, 2008 ; Adoue *et al.*, 2008). Cependant, les quantités protéiques des PADs 2 et 3 n'ont jamais été analysées, comme cela a été fait pour la PAD1. Une telle analyse permettrait de savoir si l'augmentation de la concentration en calcium épidermique, provoquée par la sécheresse environnementale dans les ERHs (Figure 67 ; Sun *et al.*, 2015), peut expliquer à elle seule la régulation différentielle des PADs 1 et 3, la première étant induite mais pas la seconde. Par ailleurs, les PADs sont des enzymes-calcium dépendantes strictes. En effet, aucun autre ion n'est capable d'induire leur activation *in vitro*, comme cela a été montré par des mesures d'activité de la Pad2 de muscle de lapin (Takahara *et al.*, 1983). De manière intéressante, les différents isotypes épidermiques de PADs présentent des sensibilités au calcium différentes les unes par rapport aux autres, mais aussi en fonction de la nature de leur substrat (Méchin *et al.*, 2005). En particulier, lorsque la FLG est utilisée comme substrat, la concentration efficace médiane de la PAD1 est inférieure à 1 mM alors que celles des PADs 2 et 3 sont légèrement plus élevées. Les concentrations en calcium cytoplasmiques étant bien plus faibles que celles utilisées dans les essais *in vitro* (de l'ordre de 100-200 nM ; Saris et Carafoli, 2005), on pourrait donc imaginer que l'efficacité de la PAD1 sur la FLG soit plus fortement stimulée que celle de la PAD3, suite à l'augmentation de la concentration calcique dans les ERHs produits en condition sèche. Ceci ne peut malheureusement pas être analysé à l'heure actuelle, puisqu'aucun test spécifique de l'activité de l'un ou l'autre des isotypes n'existe.

D'autre part, il a été montré que la concentration en calcium de l'épiderme est régulée par le taux d'humidité ambiante. En effet, Sun *et al.* ont récemment rapporté que la production d'ERHs à 50% d'humidité relative induit une augmentation de la concentration en calcium dans l'ensemble des couches de l'épiderme ainsi que la mise en place d'un gradient de cette concentration calcique, qui devient alors maximale au niveau de la couche granuleuse. On retrouve ainsi un profil similaire à celui mesuré dans l'épiderme humain normal (Figure 67 ; Sun *et al.*, 2015). En accord avec cela, il a été montré antérieurement, par l'équipe de P. Elias, que lorsque des souris *hairless* sont maintenues pendant 2 semaines dans un environnement très sec (humidité relative < 10%) ou très humide

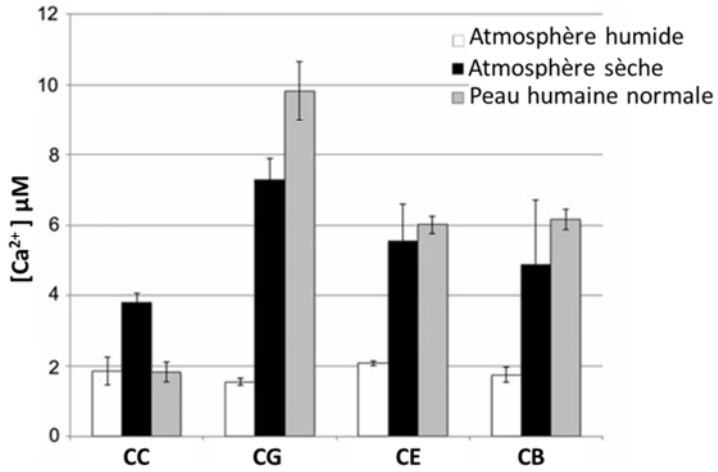


Figure 67 : Gradient de calcium dans des épidermes reconstruits humains produits en atmopshère humide (~100 % d'humidité relative) et sèche (~50% d'humidité relative) et dans un échantillon *ex vivo* de peau humaine. Les ERHs et l'échantillon de peau *ex vivo* ont été incubés pendant une nuit avec une sonde fluorescente liant le calcium (Calcium Green 5N) puis analysés en microscopie confocale par une approche en FLIM (fluorescent-lifetime imaging microscopy) afin d'évaluer la concentration calcique dans chacune des quatres couches de l'épiderme, identifiées grâce à leur morphologie. CC : couche cornée, CG : couche granuleuse, CE : couche épineuse, CB : couche basale. D'après (Sun *et al.*, 2015).

(>80%), cela engendre respectivement une augmentation ou une diminution du niveau de calcium épidermique (Elias *et al.*, 2002a). Cependant, d'autres expériences menées chez la souris *hairless* montrent que l'augmentation de la concentration de calcium observée en condition sèche n'est pas directement contrôlée par le taux d'humidité, mais le serait plutôt par le degré d'efficacité de la barrière épidermique. En effet, lors d'une rupture de la barrière épidermique par délaminage au ruban adhésif, une diminution de la concentration calcique intracellulaire est observée, avec disparition du gradient de calcium. Après quelques heures, la fonction de barrière se rétablit, en parallèle au rétablissement du gradient. Par contre, il a été montré que lorsque les souris sont maintenues à 4°C après le délaminage, cela bloque le rétablissement de la fonction barrière et du gradient de calcium. A l'inverse, si l'épiderme de ces souris est recouvert d'un film occlusif (mimant ainsi une récupération de la barrière), le gradient de calcium se remet en place (Elias *et al.*, 2002b). Au vu de ces derniers résultats de P. Elias, l'augmentation de la concentration calcique de l'épiderme observée par Sun *et al.* en condition sèche semblerait ainsi être due à l'amélioration de la fonction de barrière induite par la sécheresse ambiante. Ceci suggère donc que le calcium n'est pas le signal déclenchant le renforcement de la barrière mais arriverait en second plan pour stimuler le processus d'adaptation.

Quoi qu'il en soit, la concentration en calcium semble étroitement impliquée dans l'adaptation de l'épiderme à la sécheresse environnementale et pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de la PAD1 et de l'activité PAD observée.

D. Rôle de la désimination dans le contrôle du métabolisme de la FLG

Après avoir comparé les variations d'expression et d'activité des PADs entre les ERHs produits en conditions sèche et humide, l'expression et l'activité de l'hydrolase de la bléomycine, la caspase 14 et la calpaïne 1, trois protéases impliquées dans la protéolyse des monomères de FLG en acides aminés libres (voir figure 26 et paragraphe II.C.6 de l'introduction), ont été analysées. Ni l'expression ni l'activité de ces trois protéases ne sont augmentées en condition sèche alors que la protéolyse de la FLG est fortement accrue. En outre, les expressions de l'élastase 2, la matriptase, la KLK5 et la SASPase, quatre autres protéases qui interviendraient en amont des PADs dans le métabolisme de la FLG et seraient impliquées dans la protéolyse de la proFLG en FLG (voir figure 26 et paragraphe II.C.5 de l'introduction), ne sont pas non plus augmentées en condition sèche. Parmi l'ensemble des enzymes connues pour être impliquées dans le métabolisme de la FLG, il semble donc que seule l'expression de la PAD1 et l'activité PAD soient augmentées dans les ERHs produits en condition sèche. Ainsi, une augmentation de la désimination semble suffisante pour induire une augmentation de la dégradation de la FLG en acides aminés libres (Figure 68). Ceci est en accord avec le modèle précédemment proposé dans lequel la désimination de la FLG engendre son détachement des filaments intermédiaires de kératines (Harding et Scott, 1983), ce qui la rend ainsi accessible aux protéases et augmente en outre sa susceptibilité à la protéolyse par la calpaïne 1 (Kamata *et al.*, 2009 ; Hsu *et al.*, 2011). La désimination semble donc jouer un rôle clé dans la régulation de la protéolyse de la FLG induite par la sécheresse environnementale.

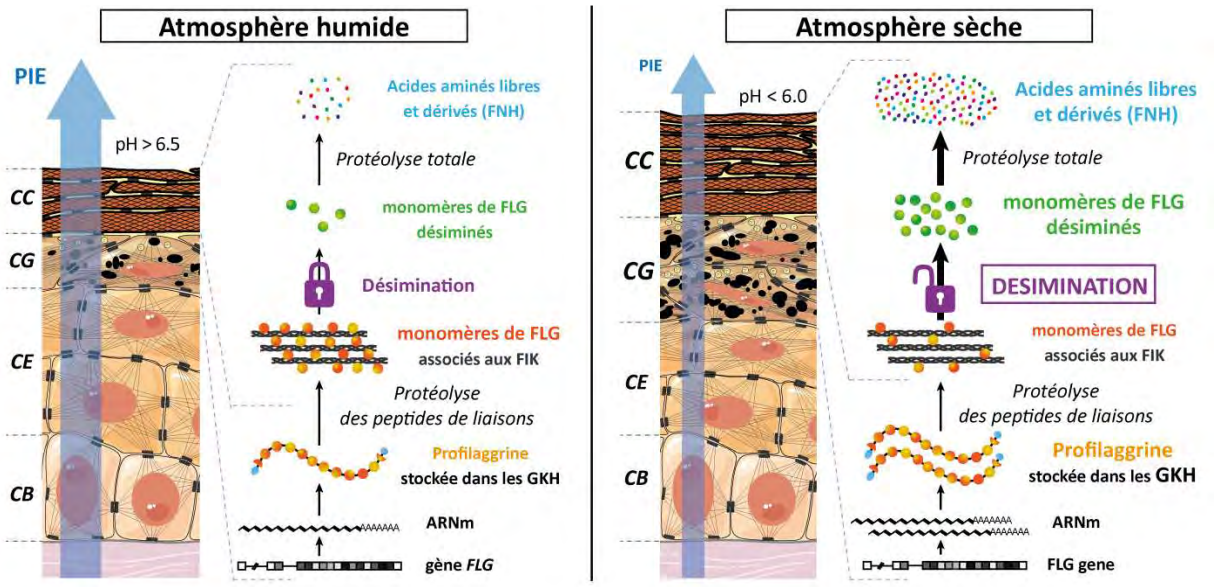


Figure 68 : Représentation schématique de l'effet de l'atmosphère sèche sur les propriétés morphologiques et fonctionnelles des épidermes reconstruits humains et sur le métabolisme de la filaggrine. CC : couche cornée, CG : couche granuleuse, CE : couche épineuse, CB : couche basale, FIK : filaments intermédiaires de kératines, GKH : Granules de kératohyaline, PIE : perte insensible en eau.

Pour tenter de le prouver, j'ai traité pendant 24 heures des ERHs produits en condition sèche avec un inhibiteur des PADs, le Cl-amidine. Le Cl-amidine a tendance à provoquer une accumulation des monomères de FLG, suggérant que ceux-ci sont moins dégradés. Ainsi il semblerait que l'inhibition de la désimination bloque partiellement la dégradation de la FLG. Ceci suggère que la désimination de la FLG est nécessaire pour que sa protéolyse en acides aminés libres se produise.

Au vu des résultats de cette étude, il semble que la PAD1 soit l'isotype principalement impliquée dans l'augmentation de la protéolyse de la FLG induite par un faible taux d'humidité ambiante. Cependant, bien que l'expression de la PAD3 ne soit pas induite, elle pourrait participer, au même titre que la PAD1, à l'augmentation du taux de désimination observée en condition sèche. En effet, mon équipe a précédemment démontré que les PADs 1 et 3 colocalisent avec la FLG dans la couche granuleuse de l'épiderme humain, et il a donc été proposé qu'elles soient toutes deux responsables de la désimination de la FLG (Méchin *et al.*, 2005). Le niveau d'expression de la PAD3 dans les ERHs produits en atmosphère humide semble d'ailleurs supérieur à celui de l'épiderme normal (voir figure 2 de l'article 2).

E. Apport de ces données pour la compréhension de la physiologie épidermique et des maladies cutanées

Chez les grands prématurés, la fonction de barrière de l'épiderme n'est pas totalement établie, ce qui se traduit notamment par une perte en eau trans-épidermique élevée, avec un fort risque de déshydratation. Il a été montré que si ces bébés sont placés dans des couveuses présentant une humidité relative de 50% au lieu des 75% habituels une semaine après la naissance et ce pendant trois semaines, cela accélère la mise en place d'une barrière épidermique complètement efficace (Ågren *et al.*, 2006). Par ailleurs, une autre étude rapporte que des travailleurs exposés à un environnement très sec (humidité relative < 1,5%) présentent une perte en eau trans-épidermique plus faible que la moyenne (Chou *et al.*, 2006). Dans ces deux exemples, un mécanisme d'adaptation similaire à celui décrit dans mon étude est probablement impliqué. Le niveau de protéolyse de la FLG et la quantité des acides aminés et dérivés d'acides aminés composant le FNH n'ont pas été analysés mais on peut suspecter qu'ils soient augmentés.

Chez les individus présentant une peau sèche, et notamment dans les cas de xérose hivernale qui se déclenche de manière chronique en hiver (lorsque le temps est froid et sec), on peut suspecter un défaut de ce mécanisme adaptatif. Chez certains individus, ces défauts pourraient provenir d'une altération de la régulation de la protéolyse de la FLG. Afin d'essayer d'augmenter la protéolyse de la FLG dans l'objectif d'améliorer l'hydratation de la couche cornée des individus ayant la peau sèche, il pourrait être pertinent d'accroître l'activité des PADs dans l'épiderme de ces personnes. Dans cet

objectif, une étude menée en collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, à laquelle j'ai participé, a permis d'identifier un nouvel activateur des PADs : l'acéfylline (Méchin *et al.*, 2016 ; voir annexe 4). Ces travaux ont fait l'objet d'un brevet déposé par les laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique dont certains membres de mon équipe sont inventeurs.

Chez les patients atteints de dermatite atopique (voir paragraphe II.D.3 de l'introduction), plusieurs études ont montré que les variations climatiques ont un impact sur la sévérité de la maladie (pour revue : Engebretsen *et al.*, 2016). Par exemple, une corrélation négative entre le taux d'humidité intérieure et la prévalence de la maladie a été rapportée (Weiland *et al.*, 2004). De même, une corrélation négative entre les humidité et température extérieures et le nombre de visites des patients atteints de dermatite atopique chez le dermatologue a été observée au Japon (Furue *et al.*, 2011). En accord avec cela, l'incidence de la dermatite atopique est plus forte en février et octobre comparativement aux autres mois de l'année (Hellier *et al.*, 1940). En outre, lorsque des enfants présentant une forme sévère de dermatite atopique passent un mois sous un climat subtropical humide et ensoleillé, cela réduit leur symptôme jusqu'à trois mois après la fin de leur séjour (Byremo *et al.*, 2006). Une autre étude a récemment suggéré un lien entre la présence de mutations du gène *FLG* chez les patients et la sensibilité aux changements climatiques. En effet, les enfants atteints de dermatite atopique et présentant des mutations du gène *FLG* développent des lésions qui sont très souvent localisées au niveau des zones anatomiques exposées au vent et au froid, comme les joues et les mains (Carson *et al.*, 2012). De plus, au Japon, la prévalence des mutations de *FLG* est plus faible chez les enfants vivants dans un climat subtropical humide en comparaison à ceux vivants dans des régions plus froides et sèches (Sasaki *et al.*, 2014). Toutes ces observations sont en accord avec les résultats de mon étude montrant que la FLG est moins requise en atmosphère humide. Mes données suggèrent de plus qu'une dérégulation de l'expression ou de l'activité des PADs pourrait être impliquée dans la dermatite atopique, bien qu'aucune variation génétique dans les gènes *PADI* (ou dans le locus) n'ait été associée avec la susceptibilité à la maladie à ce jour.

II. ROLE POTENTIEL DE LA DESIMINATION DANS L'AUTOPHAGIE EPIDERMIQUE

Le Cl-amidine est actuellement l'inhibiteur des PADs le plus couramment utilisé et a déjà servi à explorer le rôle de la désimination dans différents tissus, en contexte physiologique ou pathologique (Witalison *et al.*, 2015). Cet inhibiteur a été mis à la disposition de mon laboratoire par Paul Thompson (département de Biochimie et Pharmacologie Moléculaire de l'université de Worcester, Massachusetts, USA) dans le cadre d'une collaboration académique. Des ERHs ont ainsi été traités

avec du Cl-amidine et analysés afin de déterminer si la désimination joue un rôle plus global au cours de la différenciation des kératinocytes, au-delà du métabolisme de la FLG.

A. Inhibition de l'activité des PADs par le Cl-amidine *in vitro* et dans les épidermes reconstruits humains

Tout d'abord, l'efficacité d'inhibition du Cl-amidine sur la désimination *in vitro* de la FLG recombinante humaine par les PADs 1, 2 et 3 a été évaluée et validée. Il est ressorti de cette analyse que le Cl-amidine inhibe plus efficacement l'activité de la PAD1 que celles des PADs 2 et 3 sur la FLG humaine. Il est cependant capable d'inhiber l'activité des trois isotypes épidermiques. Ces résultats sont en accord avec les travaux de l'équipe de Paul Thompson qui a utilisé un substrat synthétique des PADs (Knuckley *et al.*, 2010 ; Jones *et al.*, 2012).

L'ajout de Cl-amidine dans le milieu de culture des ERHs à différentes concentrations (0 à 800 µM) pendant 48 heures a ensuite permis de mettre en évidence qu'il inhibe la désimination épidermique de manière dose-dépendante. L'inhibition de la désimination la plus forte a été obtenue pour une concentration en inhibiteur de 800 µM. Cette concentration, qui n'engendre pas d'effet cytotoxique sur les ERHs (comme démontré par un test MTT), a donc été retenue pour la suite de mon étude.

B. Rôle potentiel des PADs dans la régulation de la cornification

J'ai alors analysé en détail l'effet du traitement par le Cl-amidine sur la morphologie des ERHs. En microscopie électronique à transmission, une nette augmentation du nombre de cellules transitionnelles a été observée dans les ERHs traités avec le Cl-amidine. Ces cellules, localisées à la transition entre couche granuleuse et couche cornée, sont caractérisées par une enveloppe cornée marquée, des granules de kératohyaline diffuses dans le cytoplasme, de nombreuses vésicules cytoplasmiques et parfois par la persistance du noyau (Nix *et al.*, 1965 ; Leigh *et al.*, 1994). De plus, la couche cornée des ERHs traités avec le Cl-amidine est constituée de moins d'assises de cornéocytes que celles des ERHs contrôles. Ces résultats suggèrent que le Cl-amidine engendre un ralentissement de la transformation des kératinocytes granuleux en cornéocytes, processus complexe que l'on appelle la cornification (voir paragraphe I.E de l'introduction).

Pour compléter cette étude, il serait intéressant d'analyser l'effet du traitement par le Cl-amidine sur l'expression de divers marqueurs de la différenciation terminale épidermique, telles que par exemple la loricrine et l'involucrine, deux composants majeurs de l'enveloppe cornée, et la cornéodesmosine, protéine spécifique des cornéodesmosomes, aux niveaux transcriptionnel et

protéique. Ceci nous permettrait de mieux comprendre comment la différenciation terminale des kératinocytes est perturbée suite à l'inhibition des PADs.

C. Rôle potentiel des PADs dans la régulation de l'autophagie épidermique

Lors de ce travail, j'ai de plus observé, toujours par une approche en microscopie électronique à transmission, une accumulation de mitochondries et de vésicules hétérogènes dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux des ERHs traités avec le Cl-amidine, alors que ces structures sont éparses dans les kératinocytes granuleux des ERHs contrôles. De plus, de grandes vésicules sont parfois observées à proximité des noyaux des cellules granuleuses dans les ERHs traités avec le Cl-amidine.

Ces observations m'ont donc conduit à émettre l'hypothèse que le flux autophagique, récemment décrit comme étant impliqué dans la différenciation épidermique, est perturbé dans les ERHs par le Cl-amidine.

L'autophagie (ou macroautophagie, qui signifie « qui se mange soi-même ») est un processus cellulaire qui permet la capture puis la dégradation de protéines ou d'organelles intracellulaires. Ce processus est initié par la formation de vésicules à double-membrane, appelées autophagosomes. Une fois formée, les autophagosomes fusionnent ensuite avec des lysosomes pour former les autolysosomes, des vésicules à simple membrane dans lesquelles les organelles ou protéines capturées sont dégradées par hydrolyse acide et par digestions enzymatiques. L'autophagie est un processus cellulaire finement régulé, comme l'illustrent les différents acteurs moléculaires décrits dans la figure 69 (Li *et al.*, 2016b).

De plus en plus de données tendent à montrer que l'autophagie joue un rôle important dans la différenciation épidermique (Li *et al.*, 2016b ; Pen et Lavker, 2016). Il a notamment été observé que la différenciation de kératinocytes primaires ou HaCaT en culture est accompagnée d'une induction de l'autophagie (Haruna *et al.*, 2008 ; Aymard *et al.*, 2010). Aussi, l'inhibition de l'autophagie avec de la 3-méthyladénine semble bloquer l'induction de la différenciation. En effet, suite à ce traitement, l'expression de l'intégrine β1 (normalement fortement exprimée dans la couche basale et très faiblement exprimée dans les couches suprabasales) ne diminue pas, et l'expression de l'involucrine (marqueur de la différenciation) n'est pas induite, contrairement à ce qui est observé dans les cellules non traitées et cultivées en conditions différenciantes. Cela suggère donc que l'autophagie est nécessaire à l'initiation de la différenciation kératinocytaire (Aymard *et al.*, 2010). En accord avec cela, plusieurs autres études récentes, dans lesquelles l'autophagie a été inhibée, dans des modèles murins ou d'ERHs, rapportent aussi une perturbation de la différenciation épidermique (Moriyama *et al.*, 2014 ; Rossitier *et al.*, 2013 ; Soma-Nagae *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été proposé que, lors de la

cornification, l'élimination des organelles et en particulier du noyau des kératinocytes pourrait se dérouler via des processus d'autophagie et de nucléophagie (Akinduro *et al.*, 2016).

Afin de déterminer si le flux autophagique est effectivement perturbé dans les ERHs traités avec le Cl-amidine, j'ai évalué la quantité de LC3B-II, un marqueur des vésicules autophagiques (autophagosomes/autolysosomes). Le traitement des ERHs avec le Cl-amidine induit une forte augmentation de la quantité de LC3B-II, indiquant une augmentation du nombre de vésicules autophagiques. Ceci est en accord avec l'accumulation remarquable de vésicules hétérogènes contenant du matériel cellulaire observées en microscopie électronique à transmission.

En fait, l'accumulation de LC3-II peut indiquer soit une induction accrue du flux autophagique, soit un blocage de celui-ci à une étape tardive du processus, comme par exemple une inhibition de la fusion entre autophagosomes et autolysosomes, une inhibition de la dégradation médiée par les enzymes lysosomales du contenu des autolysosomes, ou encore une inhibition du recyclage de ces derniers (Mizushima *et al.*, 2010 ; Klionsky *et al.*, 2016). Dans le cas présent, l'accumulation de

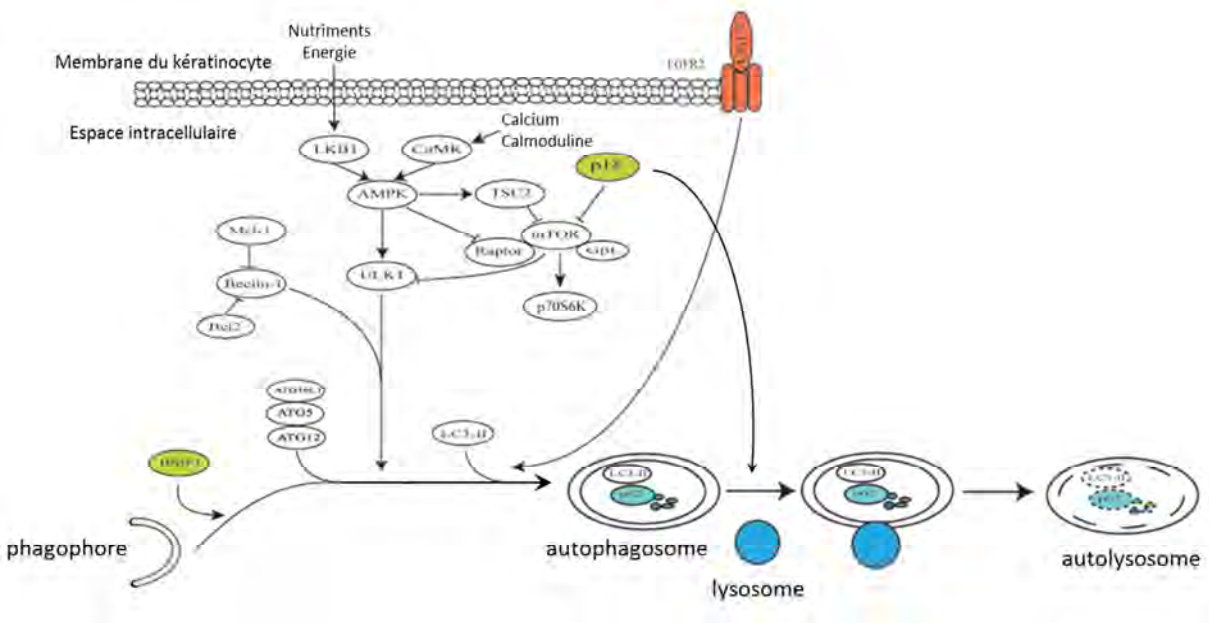


Figure 69 : L'autophagie dans les kératinocytes. En réponse à un changement des apports en énergie ou en nutriments, ou à une variation de la concentration en calcium (ou en calmoduline intracellulaire), la kinase hépatique B1 (LKB1) ou la protéine kinase calmoduline-dépendante (CaMK) peuvent activer la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Cette activation est suivie de la modulation de l'activité de TSC2 (« tuberous sclerosis complex 2 »), raptor et de la sérine/thréonine-protéine kinase ULK1. La protéine mTOR (« mammalian target of rapamycin ») est inhibée par TSC2, ce qui s'accompagne de la phosphorylation activatrice de la kinase p70S6 (p70S6K). Beclin 1 est un activateur du processus autophagique alors qu'il est inhibé lorsqu'il est lié à BCL-2 (« B-cell lymphoma 2 ») ou MCL-1 (« myeloid cell leukemia-1 »). Le complexe formé des trois protéines associées à l'autophagie ATG5, ATG12 et ATG16L1, et LC3-II (ATG8), prennent part au processus d'autophagie après l'initiation de l'élongation du phagophore, ce qui aboutit à la formation de l'autophagosome. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome pour former un autolysosome. Le contenu de ce dernier est finalement dégradé par hydrolyse acide et par digestions enzymatiques. LC3-II est un marqueur des vésicules autophagiques largement admis. BNIP3 (« BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 ») induit l'autophagie mais la voie par laquelle se fait cette régulation est pour l'instant inconnue. La protéine p18, suspectée d'être un inhibiteur de mTOR (un régulateur de l'autophagie), a aussi été impliquée dans la régulation de la fusion entre autophagosome et lysosome. D'après (Li *et al.*, 2016b).

vésicules hétérogènes dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux est accompagnée d'une accumulation de mitochondries ainsi que d'un ralentissement de la cornification. Or, une accumulation de mitochondries « déformées et dysfonctionnelles » a été décrite dans les cellules présentant des défauts d'autophagie (Mizushima *et al.*, 2010). A l'inverse, il a été montré que l'induction de l'autophagie dans des kératinocytes en culture, via la surexpression de BNIP3 (« BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 » ; voir figure 69), s'accompagne d'une diminution du nombre de mitochondries. De plus, dans des kératinocytes différenciés, une colocalisation entre LC3 et les mitochondries a déjà été observée, suggérant que l'autophagie contribue à l'élimination de ces organelles lors de la cornification (Moriyama *et al.*, 2014). Par ailleurs, dans l'épiderme de souris déficientes en protéine p18 (voir figure 69), un défaut de formation des cornéocytes a été rapporté. En effet, la couche granuleuse des souris déficientes en p18 est surmontée de cornéocytes anormaux, dans lesquels le noyau persiste et des autophagosomes s'accumulent. Ces cellules ressemblent donc à des cellules transitionnelles. Dans ce récent travail, il a été montré dans des fibroblastes murins en culture que le déficit en p18 engendre un défaut de fusion entre autophagosome et autolysosome, ce qui induit une inhibition de l'autophagie et une accumulation d'autophagosomes (Soma-Nagae *et al.*, 2013).

Concernant mon travail, le traitement avec le Cl-amidine des ERHs semble avoir un effet assez similaire à celui induit par le déficit en p18, puisqu'une accumulation de cellules transitionnelles et une accumulation de vésicules autophagiques sont observées dans les deux cas. Cependant, la majorité des vésicules que j'ai observées dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux des ERHs traités avec le Cl-amidine semble contenir des débris cellulaires et non des organelles intègres et ne pas présenter de double-membrane. Ceci suggère donc qu'il s'agit majoritairement d'autolysosomes.

L'ensemble de ces observations et leur confrontation aux données de la littérature suggèrent que le Cl-amidine induit une inhibition du flux autophagique, en bloquant ou ralentissant une étape tardive de ce processus. Il semblerait donc que les PADs 1 et/ou 3 soient impliquées dans la régulation de l'autophagie épidermique. De plus, on peut supposer que c'est en partie par le biais de l'inhibition de l'autophagie que le Cl-amidine ralentit la cornification des ERHs.

Afin de déterminer de manière certaine si le Cl-amidine a bien pour effet d'inhiber le flux autophagique, il faudra compléter ce travail en traitant simultanément les ERHs avec le Cl-amidine et avec un inhibiteur des étapes tardives de l'autophagie comme la bafilomycine A_1 ou la chloroquine. Si l'ajout de l'inhibiteur de l'autophagie ne modifie pas le profil d'immunodétection de LC3-II, cela signifiera que le Cl-amidine ralentit ou bloque une étape tardive du processus autophagique ; si la quantité de LC3-II augmente, cela signifiera que le Cl-amidine augmente le flux autophagique (Figure 70 ; Mizushima et Yoshimori, 2007 ; Klionsky *et al.*, 2016).

De plus, afin de préciser à quel niveau du processus autophagique l'effet du Cl-amidine a lieu, on pourra effectuer un double marquage en immunofluorescence de LC3B-II, marqueur spécifique des vésicules autophagiques, et de LAMP-1 ou LAMP-2 (« lysosome-associated membrane glycoprotein »), marqueurs spécifiques des lysosomes. Une colocalisation des deux marqueurs permettra de localiser les autolysosomes. Une augmentation de la colocalisation démontrerait que le traitement avec le Cl-amidine induit une accumulation de ces structures.

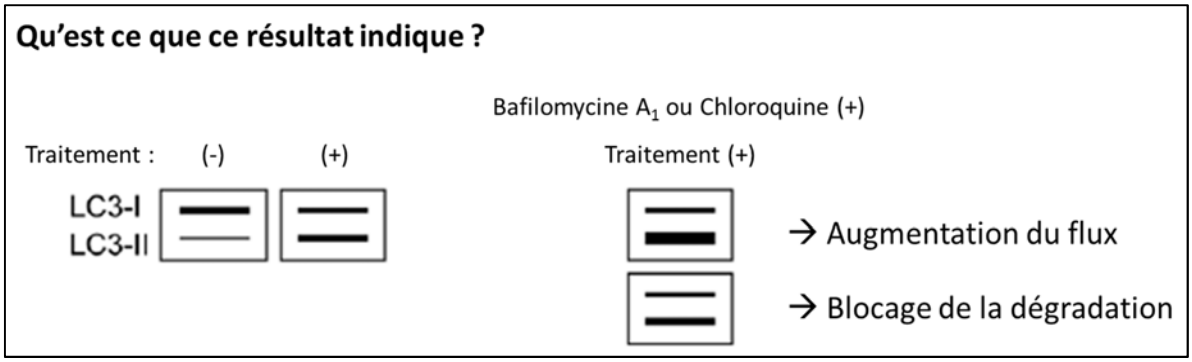


Figure 70 : Comment interpréter l'immunodétection de LC3 en western blot. Lorsqu'un traitement engendre une augmentation de la quantité de LC3-II détecté en western blot dans un extrait cellulaire, cela signifie que le traitement induit soit une augmentation du flux autophagique, soit une inhibition d'une étape tardive de ce processus. Pour déterminer de quel cas de figure il s'agit, il est nécessaire d'utiliser un inhibiteur d'une étape tardive de l'autophagie, comme la bafilomycine A_1 ou la chloroquine. Si l'inhibiteur de l'autophagie induit une augmentation de la quantité de LC3-II dans les cellules traitées, cela signifie que le traitement induit une augmentation du flux autophagique. Si l'inhibiteur de l'autophagie ne modifie pas le profil d'immunodétection de LC3-II dans les cellules traitées, cela signifie que le traitement bloque une étape tardive du processus autophagique et induit donc une accumulation de vésicules autophagiques. D'après (Mizushima et Yoshimori, 2007).

Les PADs ont déjà été impliquées dans la régulation des processus autophagiques dans d'autres types cellulaires. En particulier, il a été montré que l'inhibition des PADs, avec un autre inhibiteur appelé YW3-56, engendre une induction du flux autophagique dans des cellules cancéreuses, aboutissant à une diminution de la viabilité cellulaire (voir paragraphe IV.G.1.d de l'introduction ; Wang *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015). Ces données semblent être en désaccord avec les résultats produits au cours de mon étude. Les raisons de cette contradiction peuvent être multiples. Ces études ont été réalisées avec des types cellulaires différents, exprimant des isotypes différents de PADs. En effet, les PADs 1 et 3 sont exprimées dans les ERHs alors qu'il semble que seule la PAD4 soit exprimée dans les lignées cancéreuses utilisées dans ces deux études. Aussi, la régulation des processus d'autophagie dans ces différents types cellulaires n'implique probablement pas les mêmes acteurs moléculaires et les mêmes voies. Il est donc possible que les PADs 1 et/ou 3 dans les kératinocytes et la PAD4 dans les cellules cancéreuses puissent jouer des rôles différents dans la régulation de l'autophagie.

Par ailleurs, l'induction de l'autophagie dans des fibroblastes avec la rapamycine (un inhibiteur de mTOR ; voir figure 69) active la PAD4 et induit la désimination de la vimentine (Sorice *et al.*, 2016). De plus, quelques études suggèrent un rôle important de l'autophagie dans la génération de peptides désiminées par les cellules présentatrices d'antigènes dans la polyarthrite rhumatoïde (Ireland et Unanue, 2011, 2012 ; Sorice *et al.*, 2016). Ireland *et al.* ont notamment montré que le stress induit par une brève carence en glucose dans une lignée de lymphocytes B provoquait une augmentation du flux autophagique et une augmentation de la présentation de peptides désiminés, cet effet étant bloqué par le traitement des cellules avec de la 3-méthyladénine, un inhibiteur de l'autophagie, ou par l'inhibition de l'expression de l'ATG5. De manière très intéressante, les auteurs ont de plus mis en évidence une activité PAD dans des vésicules autophagiques purifiées (Ireland et Unanue, 2011). Il avait en outre précédemment été montré que le calcium s'accumule dans les vésicules autophagiques, ce qui expliquerait que les PADs y soient actives (Fader *et al.*, 2008). Il a donc été proposé que, dans les lymphocytes B, les PADs soient présentes et actives dans les vésicules autophagiques et que la désimination, induisant une diminution de l'organisation structurelle des protéines, puisse y favoriser leur dégradation enzymatique (Ireland et Unanue, 2012).

Ceci m'amène donc à faire l'hypothèse que les PADs 1 et/ou 3 pourraient être présentes dans les vésicules autophagiques localisées dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux de l'épiderme et que leur activité faciliterait la dégradation des protéines capturées. Pour vérifier cette hypothèse, il serait possible de réaliser un double marquage en immunofluorescence des PADs 1 ou 3 et de LC3-II afin de déterminer si une colocalisation est observée. De même, on pourrait immunodétecter les protéines désiminées sur des coupes de tissu avec l'anticorps AMC.

III. IMPLICATION DE LA PEPTIDYL-ARGININE DESIMINASE 3 DANS LE METABOLISME DE LA TRICHOHYALINE ET DANS LE SYNDROME DES CHEVEUX INCOIFFABLES

Le syndrome des cheveux incoiffables est une maladie génétique rare qui est caractérisée par des altérations de la morphologie de la tige pilaire des cheveux des enfants atteints, altérations qui s'améliorent à l'adolescence. Bien que ce syndrome ait été décrit dès 1973 comme une anomalie génétique probablement transmise selon un mode autosomique dominant, les mutations responsables n'avaient encore jamais été identifiées. Le dernier projet auquel j'ai participé durant ma thèse a décrit pour la première fois les causes génétiques et moléculaires responsables de ce syndrome.

A. Identification de mutations responsables du syndrome des cheveux incoiffables

Dans cette étude, des mutations localisées dans les gènes codant la TCHH, la PAD3 et la TGase 3 ont été identifiées chez 11 enfants atteints du syndrome des cheveux incoiffables. Sur les 11 enfants ayant participé à cette étude, un est porteur d'une mutation homozygote du gène de la TCHH, un présente une mutation homozygote du gène de la TGase 3, et les neuf autres sont porteurs de mutations homozygotes ou hétérozygotes composites du gène de la PAD3, quatre mutations différentes de ce gène ayant été identifiées au total. L'ensemble de ces mutations indique que le mode de transmission de cette maladie est principalement autosomique récessif. Nous avons ensuite démontré comment ces mutations sont responsables de la maladie.

1. Mutation touchant le gène codant la trichohyaline

La mutation du gène de la TCHH identifiée (c.991C>T/p.Gln331X) est une mutation non-sens, localisée dans le domaine 3 (voir paragraphe III.D.1 de l'introduction). Cette mutation aboutit donc à la synthèse, si elle a lieu, d'une forme très courte de la TCHH, qui ne possède ni les domaines 6 et 8, ni le domaine C-terminal, et est donc très probablement incapable d'interagir avec les kératines. Etant données la fonction importante que semble jouer la TCHH dans le renforcement de la gaine épithéliale interne (voir paragraphe III.D.2 de l'introduction ; Tarcsa *et al.*, 1997 ; Steinert *et al.*, 2003), la récente association rapportée entre un polymorphisme de la TCHH et la forme des cheveux (voir paragraphe III.D.3.a de l'introduction ; Medland *et al.*, 2009 ; Pośpiech *et al.*, 2015), et surtout l'absence de cette mutation dans la banque de données ExAC (séquences des exons de plus de 60000 individus sains), on peut en déduire que cette mutation homozygote est la cause de la maladie chez le patient étudié.

2. Mutation touchant le gène codant la transglutaminase 3

La mutation identifiée dans le gène de la TGase 3 (c.1351C>T/p.Gln451X) est elle aussi une mutation non-sens qui engendre la production d'une forme tronquée de l'enzyme. L'expression de formes recombinantes de la TGase 3 humaine sauvage et mutante dans des lignées cellulaires HaCaT et HEK293T a permis de mettre en évidence que cette mutation conduit à une forte diminution de la quantité d'enzymes produites et à une absence quasi-totale d'activité enzymatique. La Tgase 3 est l'enzyme qui a été impliquée dans la formation de liaisons covalentes entre les molécules de TCHH et entre la TCHH et les kératines dans la gaine épithéliale interne et dans la médulla du follicule pileux (voir paragraphe III.D.2 de l'introduction ; Tarcsa *et al.*, 1997). De plus, aucun individu homozygote

pour cette mutation n'a été trouvé dans la banque ExAC. Cette mutation, lorsqu'elle est présente à l'état homozygote comme c'est le cas chez le patient analysé ici, est donc responsable de la maladie.

En accord avec cela, il a récemment été rapporté que le phénotype des souris *wellhaarig*, présentant des vibrisses torsadées et un pelage ondulé, est dû à des mutations non-sens et faux-sens du gène de la Tgase 3 (Brennan *et al.*, 2015). De plus, il a aussi été montré que des souris déficientes en Tgase 3 exhibent elles-aussi des vibrisses irrégulières et torsadées et un pelage ondulé, ces caractéristiques s'estompant environ un mois après la naissance (John *et al.*, 2012). Le phénotype des poils de ces souris est donc très semblable à celui des cheveux des patients atteints du syndrome des cheveux incoiffables. Ces observations ont conduit John *et al.* à suggérer que les altérations de la TGase 3 ou de ses substrats pouvaient être en cause dans les formes récessives de « *pili torti* » ou d'autres phénotypes capillaires similaires, qui s'améliorent avec l'âge. Notre étude valide ainsi cette hypothèse.

3. Mutations touchant le gène codant la peptidyl-arginine désiminase 3

Les mutations du gène de la PAD3 identifiées chez 9 enfants atteints du syndrome des cheveux incoiffables correspondent à trois mutations faux-sens (c.881C>T/p.Ala294Val ; c.335T>A/p.Leu112His ; c.1813C>A/p.Pro605Thr) et une mutation non-sens (c.1723A>T/p.Lys578X).

La mutation non-sens du gène de la PAD3 engendre la synthèse d'une enzyme tronquée, à laquelle il manque les 87 derniers acides aminés du domaine carboxy-terminal et en particulier la cystéine 646 qui est un des acides aminés absolument essentiel à l'activité enzymatique (Méchin *et al.*, 2007).

Les trois mutations faux-sens engendrent la substitution d'un résidu présent soit dans le domaine amino-terminal (p.Leu112His), soit dans la région charnière entre les deux domaines amino- et carboxy-terminaux de l'enzyme (p.Ala294Val), soit dans le domaine carboxy-terminal (p.Pro605Thr). Aucun de ces trois résidus n'est directement impliqué ni dans le site actif ni dans les sites de fixation au calcium de la PAD3. Cependant, lorsque la séquence de la PAD3 a été comparée avec celles des autres isotypes de PADs humaines ou de Pad3 d'autres espèces, il a été observé que les trois résidus touchés par ces mutations sont conservés de façon stricte, aussi bien entre les différents orthologues humains qu'entre les paralogues analysés. Ceci suggère donc un rôle important de ces acides aminés dans la fonction et/ou dans la structure des PADs. L'effet de ces mutations sur la structure de l'enzyme a donc été analysé au laboratoire en utilisant un modèle prédictif de la structure tridimensionnelle de la PAD3, précédemment produit *in silico* à partir des coordonnées atomiques de la structure cristallographique de la PAD4 (Méchin *et al.*, 2010). Les deux mutations p.Ala294Val et p.Pro605Thr engendrent un changement net de la structure de la PAD3 dans ce modèle *in silico*, avec

en particulier une diminution de l'organisation en feuillets β du domaine amino-terminal ainsi que de légers décalages de position de résidus impliqués dans le site actif et dans les différents sites de fixation du calcium. La mutation p.Leu112His provoque quant à elle des modifications structurelles plus subtiles mais qui peuvent être d'importance pour l'activité enzymatique. Il est intéressant de noter que la substitution d'un unique acide aminé, peut avoir des répercussions sur l'ensemble de la structure d'une protéine. Notamment, alors que l'alanine et la valine sont tous deux des petits acides aminés hydrophobes et présentent donc des propriétés physico-chimiques similaires (Betts et Russell, 2003), la mutation p.Ala194Val induit, de manière assez inattendue, des changements importants de la structure de la PAD3. Par ailleurs, on peut aussi remarquer que la mutation p.Pro605Thr engendre majoritairement des altérations des structures secondaires de la partie amino-terminale de l'enzyme, alors qu'elle touche un résidu de la partie carboxy-terminale. A l'inverse, c'est la mutation p.Leu112His qui induit les changements structuraux les plus faibles au niveau du domaine amino-terminal de la PAD3, alors que c'est la seule qui touche un résidu localisé dans ce domaine et que cette mutation correspond de plus à la substitution d'un acide aminé hydrophobe par un acide aminé polaire chargé positivement, donc aux propriétés physico-chimiques bien différentes.

Afin d'analyser l'impact des trois mutations faux-sens sur l'activité de la PAD3, des formes recombinantes sauvage et mutées de l'enzyme ont été exprimées dans la lignée kératinocytaire HaCaT ainsi que dans des bactéries *Escherichia coli.* Dans les cellules HaCaT, alors que la PAD3 sauvage présente une distribution diffuse et homogène dans l'ensemble du cytoplasme comme attendu, les trois formes mutantes forment de larges agrégats, observés dans l'ensemble du cytoplasme. Ceci suggère que ces trois mutations altèrent la solubilité de la PAD3. L'activité des enzymes a été évaluée en réalisant un immunomarquage avec des auto-anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) purifiés, provenant de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (voir paragraphe IV.G.2.a de l'introduction). Alors que ces anticorps marquent fortement l'ensemble du cytoplasme des cellules HaCaT surexprimant la PAD3 sauvage, aucun marquage n'est visible dans les cellules surexprimant l'une ou l'autre des trois PAD3 mutantes. Ces résultats ont de plus été confirmés via l'expression des enzymes sauvage et mutantes dans des bactéries *Escherichia coli* suivie d'un test d'activité *in vitro.* Là encore, alors que la PAD3 sauvage exhibe une forte activité, aucune protéine désiminée n'est observée pour les formes mutées. Ceci indique donc que les trois mutations faux-sens identifiées chez les patients atteints du syndrome des cheveux incoiffables engendrent une très forte diminution, voire une perte totale, de l'activité de la PAD3.

En accord avec ces données, nous avons également montré que les souris dont le gène de la Pad3 a été inactivé présentent des anomalies de la forme des poils. En effet, par microscopie électronique à balayage, les poils du pelage des souris, et dans une moindre mesure la base des vibrisses,

présentent un aspect irrégulier et martelé. L'absence de la Pad3 chez la souris engendre donc, de même que chez les patients atteints du syndrome des cheveux incoiffables, une altération de la morphologie de la tige pilaire.

L'ensemble de ces données démontrent donc que les mutations du gène de la PAD3, lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote ou hétérozygote composite, sont responsables du développement du syndrome des cheveux incoiffables.

C'est la deuxième fois que des mutations touchant les PADs sont identifiées comme étant la cause d'une maladie. En effet, des mutations du gène *PADI6* ont très récemment été identifiées, par deux équipes, comme responsables d'une forme d'infertilité féminine due à un défaut précoce et létal pour l'embryon dans les premiers jours suivant la fécondation (Xu *et al.*, 2016 ; Maddirevula *et al.*, 2016).

Par ailleurs, l'absence d'anomalies du système nerveux des patients atteints du syndrome des cheveux incoiffables tend à montrer que l'activité de la PAD3 n'est pas essentielle au développement et au bon fonctionnement de ce sytème, bien qu'il ait été rapporté que cet isotype est exprimé dans les cellules souches neurales ainsi que dans les cellules de Schwann (voir paragraphe IV.G.1.a de l'introduction ; Keilhoff *et al.*, 2008 ; U *et al.*, 2014). Par ailleurs, la PAD3 étant détectée dans la glande mammaire murine lors de la lactation, il a été suggéré qu'elle puisse jouer un rôle durant ce processus (Li *et al.*, 2016). Il serait donc intéressant de savoir si les femmes ayant été atteintes par ce syndrome lors de leur enfance et les souris femelles déficientes en Pad3 connaissent des problèmes d'allaitement.

B. Rôle essentiel des trois acteurs de la cascade peptidyl-arginine désiminase 3 – trichohyaline – transglutaminase 3 dans la morphologie de la tige pilaire

Cette étude démontre que si la fonction de la TCHH ou d'une des deux enzymes ayant été impliquées dans son métabolisme, à savoir la PAD3 ou la TGase 3, est altérée, cela engendre des défauts de morphogenèse de la tige pilaire qui aboutissent au développement du syndrome des cheveux incoiffables.

Ces données, en plus d'apporter une meilleure compréhension de la physiopathologie de ce syndrome, ont permis de confirmer le modèle du métabolisme de la TCHH précédemment proposé par P. Steinert (Tarcsa *et al.*, 1997 ; Steinert *et al.*, 2003). Elles démontrent en particulier que la PAD3 et la TGase 3 sont bien impliquées, comme cela avait été proposé suite à des essais *in vitro* essentiellement (Figure 71). Notre étude permet de plus de prouver que ces deux enzymes jouent un rôle essentiel dans la morphogenèse de la tige pilaire. Quand l'activité de l'une ou l'autre est altérée, la TCHH est alors incapable d'assurer sa fonction de renforcement de la gaine épithéliale interne.



Figure 71 : Modèle de la cascade d'interactions entre la trichohyaline, la peptidyl-arginine désiminase 3 et la transglutaminase 3 dans la gaine épithéliale interne du follicule pileux. Après sa désimination par la PAD3 à la périphérie des granules (structure grise), la TCHH change de conformation et devient moins structurée. Ceci engendre sa solubilisation progressive. La TCHH désiminée interagit alors avec les filaments intermédiaires de kératines (lignes noires), ce qui induit leur organisation en macrofibrilles parallèles. De plus, lorsqu'elle est désiminée, la TCHH devient un substrat de la TGase 3. Les liaisons covalentes catalysées par cette dernière entre les molécules de TCHH (liaisons intra- et interchaînes) et entre la TCHH et les kératines stabilisent et renforcent la structure TCHH-kératines, qui confère à la gaine épithéliale interne ses propriétés biomécaniques.

Ainsi, en nous appuyant sur ce modèle et sur les résultats de notre étude, on peut dire que, chez certains enfants atteints du syndrome des cheveux incoiffables, la TCHH n'est pas produite ou est produite sous une forme tronquée incapable d'interagir avec les kératines. Chez d'autres, la TCHH reste insoluble à cause d'une perte d'activité de la PAD3, ce qui empêche son interaction avec les filaments de kératines. Dans un troisième groupe, l'interaction entre la TCHH et les filaments de kératines n'est pas stabilisée du fait d'une absence d'activité de la TGase 3. On peut supposer que, dans ces trois cas de figures, des défauts de cornification de la gaine épithéliale interne, et en particulier une diminution de sa rigidité, sont induits, aboutissant à des défauts de la morphogenèse de la tige pilaire. Il serait donc intéressant d'analyser en microscopie électronique à transmission les cheveux des patients et les poils des souris déficientes en Tgase3 et Pad3, pour déterminer si des altérations de la morphologie de cette gaine sont observables.

Cependant, il est surprenant que le syndrome des cheveux incoiffables s'améliore avec l'âge, alors qu'il est causé par des altérations non réversibles affectant un composant structural du follicule pileux ou des enzymes directement impliquées dans sa fonction. De manière intéressante, il a été rapporté que d'autres désordres de la tige pilaire, comme le « *pili torti* » et le « *pili annulati* » s'améliorent aussi avec l'âge. L'amélioration du syndrome des cheveux incoiffables pourrait être due à une expression compensatoire d'un autre isotype de PAD, de TGase ou d'une autre protéine structurale du follicule pileux. Par ailleurs, le follicule pileux et la tige pilaire subissent un certain nombre de modifications au cours de la croissance des enfants. Ces changements morphologiques pourraient avoir une influence mécanistique importante dans le follicule pileux, la rigidité de la gaine épithéliale interne devenant alors moins essentielle pour la morphogenèse de la tige pilaire à l'âge adulte. Il serait d'ailleurs intéressant de déterminer si le polymorphisme de la TCHH, qui a été associé à une plus forte prévalence de cheveux raides, engendre une modification des propriétés biomécaniques de la gaine épithéliale interne.

IV. PERSPECTIVES

Dans l'article 1 de ma thèse, j'ai démontré que le taux d'humidité ambiante contrôle l'expression et l'activité des PADs, la protéolyse de la FLG et plus généralement la différenciation épidermique. Un projet intéressant à développer dans l'avenir consisterait à identifier au niveau moléculaire le(s) « senseur(s) » de l'humidité ambiante ou de l'osmolarité et les mécanismes impliqués dans ces contrôles. On peut penser par exemple à une modulation de l'expression ou de la capacité à interagir avec les PADs de PTPN22, un inhibiteur naturel de la PAD4 récemment décrit dans certaines cellules hématopoïétiques (voir paragraphe IV.E.2 de l'introduction). Sa capacité à interagir avec les PADs 1 et 3 et son expression dans les kératinocytes pourront d'abord être testées. Si cette protéine y est exprimée, il faudra alors comparer son expression dans les ERHs produits en conditions humide versus sèche. Dans ma discussion, je suggère que le calcium puisse jouer un rôle important dans la régulation de l'activité des PADs (voir paragraphe I.C) et plus généralement de l'adaptation des kératinocytes à un environnement sec. Sun *et al.* ont en effet récemment montré que la concentration en calcium est augmentée dans des ERHs maintenus en condition sèche en comparaison aux ERHs contrôles produits en condition humide (Sun *et al.*, 2015). Il serait donc important de vérifier que c'est aussi le cas dans notre modèle d'épiderme en utilisant une sonde fluorescente liant le calcium, et d'aller plus loin en analysant l'expression ou l'activité des canaux calciques (TRPV4 semble notamment être un bon candidat ; Denda *et al.*, 2007) entre ERHs produits en conditions sèche versus humide. L'utilisation d'inhibiteurs des canaux calciques pourra permettre de tester le rôle de ces canaux dans la réponse à l'atmosphère sèche. L'expression et/ou l'activité d'autres canaux ioniques et des aquaporines (et en particulier l'aquaporine 5) seraient aussi intéressantes à analyser (Blaydon *et al.*, 2014). Afin d'identifier de nouvelles voies moléculaires modulées entre conditions sèche et humide, une analyse transcriptomique globale pourrait être réalisée. Il s'agit d'une approche assez coûteuse mais générant potentiellement un grand nombre de données, pouvant permettre de faire émerger de nouvelles pistes de recherche. De même, une analyse du miRNome (quantification des niveaux d'expression de l'ensemble des miRNA) pourrait être envisagée pour rechercher un/des miRNA(s) impliqué(s) dans la régulation de la différenciation épidermique par l'humidité ambiante et, de manière plus ciblée, dans le contrôle de l'expression de la PAD1.

Toujours dans les perspectives de l'article 1 et afin de tester l'implication de la FLG dans l'adaptation des kératinocytes humains à la sécheresse atmosphérique, il pourrait être intéressant de comparer la réponse à un environnement plus sec d'ERHs contrôles et d'ERHs déficients en FLG. Des ERHs shFLG ayant récemment été produits et analysés au laboratoire (Pendaries *et al.*, 2014), ces expérimentations ne demanderaient pas de mise au point et seraient donc assez rapides à réaliser.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, trois PADs sont exprimées dans les épidermes humain et murin: les PADs 1, 2 et 3 (voir paragraphes IV.F.1.b et IV.F.2.b de l'introduction). Le rôle de la PAD2 dans l'épiderme a fait l'objet d'une thèse ayant précédé la mienne. Des souris dont le gène de la Pad2 a été invalidé ont notamment été générées. Ces souris ne présentent aucun phénotype épidermique particulier alors qu'aucune surexpression compensatoire des autres isotypes de Pads n'a été observée. Ces résultats ont donc démontré que la Pad2 n'est pas nécessaire à l'homéostasie épidermique en condition physiologique normale chez la souris (Coudane, 2009). De plus, dans les ERHs utilisés dans mon équipe, j'ai montré que la PAD2 n'est pas exprimée (ou est exprimée en dessous du seuil de détection dans mes conditions d'analyse). Ainsi, la PAD2 ne semble pas nécessaire aux ERHs pour que la fonction de barrière épidermique soit assurée. Ceci tend à montrer que chez l'homme non plus, la PAD2 ne semble pas jouer de rôle essentiel dans l'épiderme en condition physiologique.

Par ailleurs, comme nous l'avons déjà vu, il a été proposé que les PADs 1 et 3 sont toutes deux responsables de la désimination de la FLG dans l'épiderme (Méchin *et al.*, 2005). Cependant, au vu des résultats obtenus au cours de ma thèse (dans les articles 1 et 3), il est légitime de s'interroger sur la fonction de la PAD3 dans l'épiderme. D'une part, il semble que la PAD1 soit le principal isotype régulant la protéolyse de la FLG induite par un faible taux d'humidité ambiante (néanmoins, bien que l'expression de la PAD3 ne soit pas induite, il est toutefois possible qu'elle participe aussi à l'augmentation du taux de désimination observée en condition sèche via une augmentation de son activité). D'autre part, aucune anomalie macroscopique ou clinique de l'épiderme interfolliculaire n'a été rapportée chez les patients atteints du syndrome des cheveux incoiffables qui ont participé à notre étude, alors que la majorité d'entre eux sont porteurs de mutations entraînant une perte d'activité de la PAD3. L'activité de la PAD3 n'apparaît donc pas essentielle à l'homéostasie épidermique.

On peut donc supposer que les PADs ont des fonctions redondantes dans l'épiderme, et que l'absence ou l'altération de la fonction d'une d'entre elles n'ont pas de conséquence majeure.

Afin d'éclaircir ces interrogations et de déterminer si la Pad3 joue un rôle spécifique dans l'épiderme, il est prévu pour la suite de ce projet que le phénotype épidermique des souris déficientes en Pad3 soit analysé en détail, en commençant notamment par des analyses ultrastructurales en microscopie électronique à transmission. Ces souris ont tout récemment été générées et seul le phénotype des poils du dos et des vibrisses a pour l'instant été analysé uniquement en microscopie électronique à balayage (voir article 3). Si aucun phénotype épidermique n'est trouvé chez ces souris, il pourrait être envisagé, à plus long terme, de générer des souris doubles (ou triples) déficientes en Pads afin de déterminer si elles assurent une fonction redondante mais non moins essentielle dans l'épiderme.

Une perspective à plus court terme de mon projet est de produire des ERHs dans lesquels l'expression de la PAD1 et/ou de la PAD3 sera spécifiquement inhibée par interférence à l'ARN. Cela permettra de déterminer si les PADs 1 et 3 assurent des rôles redondants ou spécifiques dans l'épiderme, de mieux comprendre l'implication de chacun de ces isotypes dans la désimination des kératines 1 et 10, de la FLG et de l'hornerine, et de préciser la fonction de la désimination de chacun de ces substrats. De plus, ces expériences permettront de confirmer que les PADs sont impliquées dans le processus d'autophagie ayant lieu dans l'épiderme, et de décrypter la fonction précise de chacune d'elles dans ce processus.

Les substrats des PADs actuellement identifiés dans l'épiderme et le follicule pileux correspondent majoritairement à des protéines structurales présentes en quantité abondante dans les cellules, et pour certaines, possèdant un grand nombre d'arginines (notamment la FLG et la TCHH ; voir annexe 1). Il est cependant probable que d'autres protéines ou peptides soient les cibles de ces enzymes. Dans l'objectif d'identifier les autres substrats des PADs dans l'épiderme et le follicule pileux, on peut envisager, à long terme, de développer une analyse du « citrullinome » (ensemble des protéines citrullinées ou désiminées) de l'épiderme et du follicule pileux humains par spectrométrie de masse. La difficulté de cette analyse réside dans le fait que la modification d'une arginine en citrulline n'engendre qu'une augmentation de masse d'environ 1 Da (0,9802 Da). Il est actuellement possible de détecter cette faible variation de masse avec les spectromètres à haute résolution les plus modernes, mais il reste cependant impossible de distinguer la désimination de la déamidation, qui engendre une augmentation de masse similaire (1,0036 Da), en se basant sur la différence de masse uniquement. La comparaison des spectrogrammes obtenus avec les bases de données semble donc être encore très délicate. Quelques équipes ont tout de même mis en évidence par cette technique des protéines désiminées dans des extraits protéiques complexes, comme par exemple le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (van Beers *et al.*, 2013). D'autres méthodes d'étude du citrullinome dans des échantillons complexes par spéctrométrie de masse ont été développées, dans lesquelles les résidus citrulline sont chimiquement modifiés préalablement à l'analyse pour augmenter leur masse, et donc la sensibilité de détection, et parfois aussi pour enrichir les échantillons en peptides désiminés (Hensen et Pruijn, 2014 ; De Ceuleneer *et al.*, 2011). Il serait donc très intéressant d'établir une collaboration avec une des rares équipes dans le monde capables de réaliser ce genre d'analyse dans le but d'identifier de nouveaux substrats des PADs. Il s'agit ici d'un projet d'envergure mais qui pourrait être extrêmement novateur et informatif.

Une autre approche pourrait être d'analyser les extraits protéiques des ERHs traités ou non avec le Cl-amidine, inhibiteurs des PADs (voir article 2), des ERHs contrôles et shPAD1/shPAD3, ou encore de la peau et des poils de souris déficientes en PAD3 et de souris contrôles, en électrophorèse

différentielle sur gels bidimensionnels (2D-DIGE), et d'analyser les protéines différemment exprimées par spectrométrie de masse. Ceci devrait aussi permettre d'identifier de nouveaux substrats des PADs dans l'épiderme et le follicule pileux, de mieux comprendre via quels cibles les PADs sont impliquées dans la régulation de l'autophagie, ou même de décrypter des voies métaboliques impliquant les PADs encore inconnues.

Les PADs jouant un rôle essentiel dans le métabolisme de la FLG, on peut suspecter une implication potentielle de ces enzymes dans certaines pathologies cutanées telle que la dermatite atopique. A long terme, un des projets de l'équipe est d'analyser la présence de mutations touchant les gènes *PADI1* ou *PADI3* au sein de cohortes de patients atteints de dermatique atopique (non porteurs de mutations « perte de fonction » de la FLG). D'après les résultats obtenus pendant ma thèse, on s'attend plus fortement à détecter des mutations touchant le gène *PADI1* que le gène *PADI3* chez certains patients, puisque la déficience en PAD3 chez les patients atteints du syndrome des cheveux incoiffables ne semble pas avoir d'impact sur l'homéostasie de leur épiderme (voir article 3). L'expression et l'activité des PADs pourront de plus être analysées dans l'épiderme des patients atteints de dermatite atopique en peau lésionnelle ou non-lésionnelle, et en comparaison à des individus sains. Quelques données préliminaires, publiées dans un brevet dont certains membres de mon équipe sont co-inventeurs (et dont l'objet est l'identification de l'acéfylline comme activateurs des PADs ; brevet n°WO2012140095), montrent que l'activité des PADs semble réduite dans l'épiderme des patients atteints de dermatite atopique. Ces analyses n'ont cependant été effectuées que sur les biopsies de sept patients et restent donc à étendre sur un nombre d'échantillons plus important.

L'ensemble des perspectives de ce travail de thèse, à court, moyen et long termes, sont synthétisées dans le tableau qui suit (Tableau 7).

Tableau 7 : Résumé des perspectives de mon travail de thèse en 6 objectifs et détails des stratégies envisagées à court (en vert), moyen (en bleu) et long terme (en violet).

	Perspectives
Objectif 1	**Mieux comprendre le lien entre PADs et autophagie**
Stratégies	• Déterminer si le flux autophagique est ralenti ou activé dans les ERHs traités avec le Cl-amidine en utilisant un inhibiteur des étapes tardives de l'autophagie telle que la chloroquine (inhibition de la fusion autophagosome/lysosome). • Tester si les PADs sont détectées au sein des autophagosomes. • Analyser l'expression des diverses acteurs impliqués dans la régulation de l'autophagie dans l'épiderme (Beclin1, mTOR, p18, BNIP3, …) en western blot et en immunohistologie dans les ERHs traités ou non avec le Cl-amidine. • Tester si l'autophagie est perturbée dans l'épiderme des souris déficientes en PAD3 (et dans les ERHs shPAD1 et shPAD3).
Objectif 2	**Tester la nécessité stricte de la FLG dans l'adaptabilité des kératinocytes humains à la sécheresse atmosphérique**
Stratégies	• Produire des ERHs déficients en FLG en conditions sèche et humide et comparer leur phénotype à ceux des ERHs contrôles produits dans ces mêmes conditions.
Objectif 3	**Identifier les régulateurs de l'activité des PADs, de la protéolyse de la FLG et de la différenciation épidermique en fonction du taux d'humidité ambiante**
Stratégies	• Analyser l'expression/l'activité de PTPN22 (inhibiteur de la PAD4) et tester son implication dans le contrôle des PADs 1 et 3 dans les kératinocytes et dans les ERHs produits en conditions sèche versus humide. • Analyser l'expression/l'activité de canaux calciques (et éventuellement d'autres canaux ioniques), ainsi que des aquaporines entre ERHs produits en conditions sèche versus humide. • Tester l'effet de l'inhibition des canaux calciques (en utilisant la néfidipine par exemple) dans les ERHs produits en condition sèche. • Comparer le transcriptome et le miRNome des ERHs produits en conditions sèche et humide.
Objectif 4	**Décrypter les rôles spécifiques des PADs 1 et 3 dans l'épiderme et dans le follicule pileux**
Stratégies	• Etudier en détail le phénotype cutané des souris déficientes en PAD3 • Produire des ERHs déficients en PAD1 et/ou PAD3 et étudier leur phénotype.
Objectif 5	**Identifier de nouveaux substrats des PADs dans l'épiderme et dans le follicule pileux**
Stratégies	• Réaliser une analyse protéomique différentielle en 2D-DIGE couplée à de la spectrométrie de masse (en utilisant des extraits protéiques d'ERHs traités ou non avec les inhibiteurs, ou d'ERHs shPAD1 et shPAD3 et contrôles, ou de la peau et des poils des souris déficientes en PAD3 et sauvages). • Analyser le « citrullinome » en spectrométrie de masse (en utilisant des extraits d'épiderme ou de follicules pileux humains).
Objectif 6	**Tester l'implication des PADs dans la dermatite atopique**
Stratégies	• Comparer l'expression et l'activité des PADs dans des biopsies de peau d'individus sains et de patients. • Rechercher une association entre des mutations des gènes *PADI1* (et *PADI3*) et la maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adoue, V. (2008). Le contrôle de l'expression des peptidyl-aginine désiminases dans les kératinocytes associe des éléments proximaux et une région intergénique distante, et implique les facteurs AP-1 c-Jun, c-Fos et JunD: un modèle d'étude de la différenciation terminale épidermique. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.

Adoue, V., Chavanas, S., Coudane, F., Méchin, M.-C., Caubet, C., Ying, S., Dong, S., Duplan, H., Charveron, M., Takahara, H., et al. (2008). Long-Range Enhancer Differentially Regulated by c-Jun and JunD Controls Peptidylarginine Deiminase-3 Gene in Keratinocytes. J. Mol. Biol. 384, 1048–1057.

Ågren, J., Sjörs, G., and Sedin, G. (2006). Ambient humidity influences the rate of skin barrier maturation in extremely preterm infants. J. Pediatr. 148, 613–617.

Aho, S., Harding, C.R., Lee, J.-M., Meldrum, H., and Bosko, C.A. (2012). Regulatory Role for the Profilaggrin N-Terminal Domain in Epidermal Homeostasis. J. Invest. Dermatol. 132, 2376–2385.

Akinduro, O., Sully, K., Patel, A., Robinson, D.J., Chikh, A., McPhail, G., Braun, K.M., Philpott, M.P., Harwood, C.A., Byrne, C., et al. (2016). Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation. J. Invest. Dermatol. 136, 1460–1470.

Akiyama, K., and Senshu, T. (1999). Dynamic aspects of protein deimination in developing mouse epidermis. Exp. Dermatol. 8, 177–186.

Alef, T., Torres, S., Hausser, I., Metze, D., Türsen, Ü., Lestringant, G.G., and Hennies, H.C. (2009). Ichthyosis, Follicular Atrophoderma, and Hypotrichosis Caused by Mutations in ST14 Is Associated with Impaired Profilaggrin Processing. J. Invest. Dermatol. 129, 862–869.

Al-Shobaili, H.A., Ahmed, A.A., Alnomair, N., Alobead, Z.A., and Rasheed, Z. (2016). Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update. Int. J. Health Sci. 10.

Andrade, F., Darrah, E., Gucek, M., Cole, R.N., Rosen, A., and Zhu, X. (2010). Autocitrullination of human peptidyl arginine deiminase type 4 regulates protein citrullination during cell activation. Arthritis Rheum. 62, 1630–1640.

Andreoli, J.M., Jang, S.-I., Chung, E., Coticchia, C.M., Steinert, P.M., and Markova, N.G. (1997). The expression of a novel, epithelium-specific ets transcription factor is restricted to the most differentiated layers in the epidermis. Nucleic Acids Res. 25, 4287–4295.

Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., and Sato, M. (2004). Structural basis for Ca2+-induced activation of human PAD4. Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 777–783.

Arita, K., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Yamada, M., and Sato, M. (2006). Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 5291–5296.

Asaga, H., Yamada, M., and Senshu, T. (1998). Selective Deimination of Vimentin in Calcium Ionophore-Induced Apoptosis of Mouse Peritoneal Macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243, 641–646.

Assohou-Luty, C., Raijmakers, R., Benckhuijsen, W.E., Stammen-Vogelzangs, J., de Ru, A., van Veelen, P.A., Franken, K.L.M.C., Drijfhout, J.W., and Pruijn, G.J.M. (2014). The human peptidylarginine deiminases type 2 and type 4 have distinct substrate specificities. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics 1844, 829–836.

Aymard, E., Barruche, V., Naves, T., Bordes, S., Closs, B., Verdier, M., and Ratinaud, M.-H. (2010). Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? Exp. Dermatol. 20, 263–268.

Badillo Soto, M.A., Rodríguez Rodríguez, M., Pérez Pérez, M.E., Daza Benitez, L., Bollain y Goytia, J.J., Carrillo Jiménez, M.A., Avalos Díaz, E., and Herrera Esparza, R. (2016). Potential protein targets of the peptidylarginine deiminase 2 and peptidylarginine deiminase 4 enzymes in rheumatoid synovial tissue and its possible meaning. Eur. J. Rheumatol.

Baka, Z., György, B., Géher, P., Buzás, E.I., Falus, A., and Nagy, G. (2012). Citrullination under physiological and pathological conditions. Joint Bone Spine 79, 431–436.

Baker, B.S. (2006). The role of microorganisms in atopic dermatitis. Clin. Exp. Immunol. 144, 1–9.

Balandraud, N., Gouret, P., Danchin, E.G.J., Blanc, M., Zinn, D., Roudier, J., and Pontarotti, P. (2005). A rigorous method for multigenic families' functional annotation: the peptidyl arginine deiminase (PADs) proteins family example. BMC Genomics 6, 153.

Barnes, K.C. (2010). An update on the genetics of atopic dermatitis: Scratching the surface in 2009. J. Allergy Clin. Immunol. 125, 16–29.e11.

Barresi, C., Stremnitzer, C., Mlitz, V., Kezic, S., Kammeyer, A., Ghannadan, M., Posa-Markaryan, K., Selden, C., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2011). Increased Sensitivity of Histidinemic Mice to UVB Radiation Suggests a Crucial Role of Endogenous Urocanic Acid in Photoprotection. J. Invest. Dermatol. 131, 188–194.

Barthélemy, N. (2011). Protéomique qualitative et quantitative, une passerelle pour relier l'expression génomique à la construction des édifices biologiques : Application à la compréhension de la structure moléculaire du cheveu humain (Strasbourg).

Barton, A., Bowes, J., Eyre, S., Spreckley, K., Hinks, A., John, S., and Worthington, J. (2004). A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. Arthritis Rheum. 50, 1117–1121.

van Beers, J.J.B.C., Schwarte, C.M., Stammen-Vogelzangs, J., Oosterink, E., Božič, B., and Pruijn, G.J.M. (2013). The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β-actin. Arthritis Rheum. 65, 69–80.

Behne, M.J., Meyer, J.W., Hanson, K.M., Barry, N.P., Murata, S., Crumrine, D., Clegg, R.W., Gratton, E., Holleran, W.M., Elias, P.M., et al. (2002). NHE1 Regulates the Stratum Corneum Permeability Barrier Homeostasis MICROENVIRONMENT ACIDIFICATION ASSESSED WITH FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING. J. Biol. Chem. 277, 47399–47406.

Behrendt, F., Hartmann, J., Babian, S., Karsch, D., Schulz, C., Latendorf, T., Hansmann, B., Wu, Z., and Schroeder, J.-M. (2010). Profilaggrin constitutively provides a basal antimicrobial reservoir for the skin. In ResearchGate, pp. S32–S32.

Benavides, F., Starost, M.F., Flores, M., Gimenez-Conti, I.B., Guénet, J.-L., and Conti, C.J. (2002). Impaired Hair Follicle Morphogenesis and Cycling with Abnormal Epidermal Differentiation in nackt Mice, a Cathepsin L-Deficient Mutation. Am. J. Pathol. 161, 693–703.

Beniac, D.R., Wood, D.D., Palaniyar, N., Ottensmeyer, F.P., Moscarello, M.A., and Harauz, G. (2000). Cryoelectron Microscopy of Protein–Lipid Complexes of Human Myelin Basic Protein Charge Isomers Differing in Degree of Citrullination. J. Struct. Biol. 129, 80–95.

Bernard, D., Méhul, B., Thomas-Collignon, A., Delattre, C., Donovan, M., and Schmidt, R. (2005). Identification and Characterization of a Novel Retroviral-Like Aspartic Protease Specifically Expressed in Human Epidermis. J. Invest. Dermatol. 125, 278–287.

Bibel, D.J., Aly, R., and Shinefield, H.R. (1992). Antimicrobial Activity of Sphingosines. J. Invest. Dermatol. 98, 269–273.

Bieber, T. (2008). Atopic Dermatitis. N. Engl. J. Med. 358, 1483–1494.

Bikle, D.D. (2011). Vitamin D metabolism and function in the skin. Mol. Cell. Endocrinol. 347, 80–89.

Bikle, D.D., Oda, Y., and Xie, Z. (2004). Calcium and 1,25(OH)2D: interacting drivers of epidermal differentiation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 89–90, 355–360.

Biron, B.M., Chung, C.-S., O'Brien, X.M., Chen, Y., Reichner, J.S., and Ayala, A. (2016). Cl-Amidine Prevents Histone 3 Citrullination and Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Improves Survival in a Murine Sepsis Model. J. Innate Immun.

Blaydon, D.C., and Kelsell, D.P. (2014). Defective channels lead to an impaired skin barrier. J Cell Sci 127, 4343–4350.

Bonnart, C., Deraison, C., Lacroix, M., Uchida, Y., Besson, C., Robin, A., Briot, A., Gonthier, M., Lamant, L., Dubus, P., et al. (2010). Elastase 2 is expressed in human and mouse epidermis and impairs skin barrier function in Netherton syndrome through filaggrin and lipid misprocessing. J. Clin. Invest. 120, 871–882.

Borgoño, C.A., Michael, I.P., Komatsu, N., Jayakumar, A., Kapadia, R., Clayman, G.L., Sotiropoulou, G., and Diamandis, E.P. (2007). A Potential Role for Multiple Tissue Kallikrein Serine Proteases in Epidermal Desquamation. J. Biol. Chem. 282, 3640–3652.

Bose, A., Teh, M.-T., Mackenzie, I.C., and Waseem, A. (2013). Keratin K15 as a Biomarker of Epidermal Stem Cells. Int. J. Mol. Sci. 14, 19385–19398.

Boulais, N., and Misery, L. (2007). Merkel cells. J. Am. Acad. Dermatol. 57, 147–165.

Braff, M.H., Bardan, A., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2005). Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides. J. Invest. Dermatol. 125, 9–13.

Brandner, J.M. (2009). Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. Eur. J. Pharm. Biopharm. 72, 289–294.

Brennan, B.M., Huynh, M.T., Rabah, M.A., Shaw, H.E., Bisaillon, J.J., Radden II, L.A., Nguyen, T.V., and King, T.R. (2015). The mouse wellhaarig (we) mutations result from defects in epidermal-type transglutaminase 3 (Tgm3). Mol. Genet. Metab. 116, 187–191.

Brenner, M., and Hearing, V.J. (2008). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. Photochem. Photobiol. 84, 539–549.

Bunick, C.G., Presland, R.B., Lawrence, O.T., Pearton, D.J., Milstone, L.M., and Steitz, T.A. (2015). Crystal Structure of Human Profilaggrin S100 Domain and Identification of Target Proteins Annexin II, Stratifin, and HSP27. J. Invest. Dermatol. 135, 1801–1809.

Byremo, G., Rød, G., and Carlsen, K.H. (2006). Effect of climatic change in children with atopic eczema. Allergy 61, 1403–1410.

Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 328–340.

Caponi, L., Petit-Teixeira, E., Sebbag, M., Bongiorni, F., Moscato, S., Pratesi, F., Pierlot, C., Osorio, J., Chapuy-Regaud, S., Guerrin, M., et al. (2005). A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. Ann. Rheum. Dis. 64, 587–593.

Carson, C.G., Rasmussen, M.A., Thyssen, J.P., Menné, T., and Bisgaard, H. (2012). Clinical Presentation of Atopic Dermatitis by Filaggrin Gene Mutation Status during the First 7 Years of Life in a Prospective Cohort Study. PLOS ONE 7, e48678.

Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M., and Serre, G. (2004). Degradation of Corneodesmosome Proteins by Two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. J. Invest. Dermatol. 122, 1235–1244.

Celli, A., Crumrine, D., Meyer, J.M., and Mauro, T.M. (2016). Endoplasmic Reticulum Calcium Regulates Epidermal Barrier Response and Desmosomal Structure. J. Invest. Dermatol. 136, 1840–1847.

Chang, X., and Han, J. (2006). Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. Mol. Carcinog. 45, 183–196.

Chang, H.-H., Dwivedi, N., Nicholas, A.P., and Ho, I.-C. (2015). The W620 Polymorphism in PTPN22 Disrupts Its Interaction With Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Enhances Citrullination and NETosis. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ 67, 2323–2334.

Chang, X., Han, J., Pang, L., Zhao, Y., Yang, Y., and Shen, Z. (2009). Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. BMC Cancer 9.

Chapuy-Regaud, S., Sebbag, M., Baeten, D., Clavel, C., Foulquier, C., Keyser, F.D., and Serre, G. (2005). Fibrin Deimination in Synovial Tissue Is Not Specific for Rheumatoid Arthritis but Commonly Occurs during Synovitides. J. Immunol. 174, 5057–5064.

Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A.D., Bonafé, J.-L., Wilkinson, J., Taïeb, A., Barrandon, Y., et al. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. Nat. Genet. 25, 141–142.

Chavanas, S., Méchin, M.-C., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R., Serre, G., and Simon, M. (2004). Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. Gene 330, 19–27.

Chavanas, S., Méchin, M.-C., Nachat, R., Adoue, V., Coudane, F., Serre, G., and Simon, M. (2006). Peptidylarginine deiminases and deimination in biology and pathology: Relevance to skin homeostasis. J. Dermatol. Sci. 44, 63–72.

Chavanas, S., Adoue, V., Méchin, M.-C., Ying, S., Dong, S., Duplan, H., Charveron, M., Takahara, H., Serre, G., and Simon, M. (2008). Long-Range Enhancer Associated with Chromatin Looping Allows AP-1 Regulation of the Peptidylarginine Deiminase 3 Gene in Differentiated Keratinocyte. PLoS ONE 3, e3408.

Chen, R., Wei, Y., Cai, Q., Duan, S., Ren, D., Shen, J., He, D., Fang, M., Lv, K., Cheng, N., et al. (2011). The PADI4 gene does not contribute to genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Chinese Han population. Rheumatol. Int. 31, 1631–1634.

Cherrington, B.D., Zhang, X., McElwee, J.L., Morency, E., Anguish, L.J., and Coonrod, S.A. (2012). Potential Role for PAD2 in Gene Regulation in Breast Cancer Cells. PLOS ONE 7, e41242.

Chou, T.-C., Lin, K.-H., Sheu, H.-M., Su, S.-B., Lee, C.-W., Guo, H.-R., Wu, T.-N., and Chang, H.-Y. (2006). Alterations in health examination items and skin symptoms from exposure to ultra-low humidity. Int. Arch. Occup. Environ. Health 80, 290–297.

Christophorou, M.A., Castelo-Branco, G., Halley-Stott, R.P., Oliveira, C.S., Loos, R., Radzisheuskaya, A., Mowen, K.A., Bertone, P., Silva, J.C.R., Zernicka-Goetz, M., et al. (2014). Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. Nature 507, 104–108.

Clayton, E., Doupé, D.P., Klein, A.M., Winton, D.J., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. Nature 446, 185–189.

Collin, C., Moll, R., Kubicka, S., Ouhayoun, J.-P., and Franke, W.W. (1992). Characterization of human cytokeratin 2, an Epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. Exp. Cell Res. 202, 132–141.

Coudane, F. (2009). Fonction et régulation des peptidyl-arginine désiminases dans l'épiderme et au cours de la cicatrisation cutanée. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.

Coulombe, P.A. (1993). The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 17–29.

Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S., and Cynober, L. (2005). Almost all about citrulline in mammals. Amino Acids 29, 177.

Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., et al. (2004). Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation. Cell 118, 545–553.

Darrah, E., Rosen, A., Giles, J.T., and Andrade, F. (2012). Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 71, 92–98.

Darrah, E., Giles, J.T., Ols, M.L., Bull, H.G., Andrade, F., and Rosen, A. (2013). Erosive Rheumatoid Arthritis Is Associated with Antibodies That Activate PAD4 by Increasing Calcium Sensitivity. Sci. Transl. Med. 5, 186ra65-186ra65.

Daunes-Marion, S., DUPLAN, H., Mechin, M.-C., POIGNY, S., Serre, G., and Simon, M. (2012). Composes activateurs des peptidyl-arginine desiminases 1 et/ou 3 dans l'epiderme et leurs utilisations.

De Ceuleneer, M., De Wit, V., Van Steendam, K., Van Nieuwerburgh, F., Tilleman, K., and Deforce, D. (2011). Modification of citrulline residues with 2,3-butanedione facilitates their detection by liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM 25, 1536–1542.

De Jager, M.W., Gooris, G.S., Ponec, M., and Bouwstra, J.A. (2005). Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. J. Lipid Res. 46, 2649–2656.

Denault, J.-B., and Leduc, R. (1996). Furin/PACE/SPC1: A convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. FEBS Lett. 379, 113–116.

Denda, M., Sato, J., Masuda, Y., Tsuchiya, T., Koyama, J., Kuramoto, M., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (1998). Exposure to a Dry Environment Enhances Epidermal Permeability Barrier Function. J. Invest. Dermatol. 111, 858–863.

Denda, M., Sokabe, T., Fukumi-Tominaga, T., and Tominaga, M. (2007). Effects of Skin Surface Temperature on Epidermal Permeability Barrier Homeostasis. J. Invest. Dermatol. 127, 654–659.

Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepied, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den Broecke, C., Van Damme, P., D'Herde, K., Hachem, J.-P., et al. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. Nat. Cell Biol. 9, 666–674.

Denis, H., Deplus, R., Putmans, P., Yamada, M., Métivier, R., and Fuks, F. (2009). Functional Connection between Deimination and Deacetylation of Histones. Mol. Cell. Biol. 29, 4982–4993.

Deraison, C., Bonnart, C., Lopez, F., Besson, C., Robinson, R., Jayakumar, A., Wagberg, F., Brattsand, M., Hachem, J.P., Leonardsson, G., et al. (2007). LEKTI Fragments Specifically Inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction. Mol. Biol. Cell 18, 3607–3619.

Descargues, P., Deraison, C., Bonnart, C., Kreft, M., Kishibe, M., Ishida-Yamamoto, A., Elias, P., Barrandon, Y., Zambruno, G., Sonnenberg, A., et al. (2005). Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. Nat. Genet. 37, 56–65.

Dong, S., Kojima, T., Shiraiwa, M., Méchin, M.-C., Chavanas, S., Serre, G., Simon, M., Kawada, A., and Takahara, H. (2005). Regulation of the Expression of Peptidylarginine Deiminase Type II Gene (PADI2) in Human Keratinocytes Involves Sp1 and Sp3 Transcription Factors. J. Invest. Dermatol. 124, 1026–1033.

Dong, S., Kanno, T., Yamaki, A., Kojima, T., Shiraiwa, M., Kawada, A., Méchin, M.-C., Chavanas, S., Serre, G., Simon, M., et al. (2006). NF-Y and Sp1/Sp3 are involved in the transcriptional regulation of the peptidylarginine deiminase type III gene (PADI3) in human keratinocytes. Biochem. J. 397, 449–459.

Dong, S., Ying, S., Kojima, T., Shiraiwa, M., Kawada, A., Méchin, M.-C., Adoue, V., Chavanas, S., Serre, G., Simon, M., et al. (2007a). Crucial Roles of MZF1 and Sp1 in the Transcriptional Regulation of the Peptidylarginine Deiminase Type I Gene (PADI1) in Human Keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 128, 549–557.

Dong, S., Zhang, Z., and Takahara, H. (2007b). Estrogen-Enhanced Peptidylarginine Deiminase Type IV Gene (PADI4) Expression in MCF-7 Cells Is Mediated by Estrogen Receptor-α-Promoted Transfactors Activator Protein-1, Nuclear Factor-Y, and Sp1. Mol. Endocrinol. 21, 1617–1629.

Doupé, D.P., Klein, A.M., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2010). The Ordered Architecture of Murine Ear Epidermis Is Maintained by Progenitor Cells with Random Fate. Dev. Cell 18, 317–323.

Eckert, R.L., Sturniolo, M.T., Broome, A.-M., Ruse, M., and Rorke, E.A. (2005). Transglutaminase Function in Epidermis. J. Invest. Dermatol. 124, 481–492.

Egberts, F., Heinrich, M., Jensen, J.-M., Winoto-Morbach, S., Pfeiffer, S., Wickel, M., Schunck, M., Steude, J., Saftig, P., Proksch, E., et al. (2004). Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. J. Cell Sci. 117, 2295–2307.

Elias, P.M., and Wakefield, J.S. (2014). Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 134, 781–791.e1.

Elias, P.M., Mauro, T., Rassner, U., Kömüves, L., Brown, B.E., Menon, G.K., and Cullander, C. (1998). The Secretory Granular Cell: The Outermost Granular Cell as a Specialized Secretory Cell. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3, 87–100.

Elias, P.M., Ahn, S.K., Denda, M., Brown, B.E., Crumrine, D., Kimutai, L.K., Kömüves, L., Lee, S.H., and Feingold, K.R. (2002a). Modulations in Epidermal Calcium Regulate the Expression of Differentiation-Specific Markers. J. Invest. Dermatol. 119, 1128–1136.

Elias, P.M., Brown, B.E., Crumrine, D., Feingold, K.R., and Ahn, S.K. (2002b). Origin of the Epidermal Calcium Gradient: Regulation by Barrier Status and Role of Active vs Passive Mechanisms. J. Invest. Dermatol. 119, 1269–1274.

Engebretsen, K.A., Johansen, J.D., Kezic, S., Linneberg, A., and Thyssen, J.P. (2016). The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 30, 223–249.

Esposito, G., Vitale, A.M., Leijten, F.P.J., Strik, A.M., Koonen-Reemst, A.M.C.B., Yurttas, P., Robben, T.J.A.A., Coonrod, S., and Gossen, J.A. (2007). Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility. Mol. Cell. Endocrinol. 273, 25–31.

Fan, T., Zhang, C., Zong, M., Zhao, Q., Yang, X., Hao, C., Zhang, H., Yu, S., Guo, J., Gong, R., et al. (2014). Peptidylarginine deiminase IV promotes the development of chemoresistance through inducing autophagy in hepatocellular carcinoma. Cell Biosci. 4, 49.

Fearon, W.R. (1939). The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. Biochem. J. 33, 902.

Feingold, K.R. (2007). Thematic review series: Skin Lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. J. Lipid Res. 48, 2531–2546.

Fluhr, J.W., Kao, J., Ahn, S.K., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Jain, M. (2001). Generation of Free Fatty Acids from Phospholipids Regulates Stratum Corneum Acidification and Integrity. J. Invest. Dermatol. 117, 44–51.

Fluhr, J.W., Elias, P.M., Man, M.-Q., Hupe, M., Selden, C., Sundberg, J.P., Tschachler, E., Eckhart, L., Mauro, T.M., and Feingold, K.R. (2010). Is the Filaggrin–Histidine–Urocanic Acid Pathway Essential for Stratum Corneum Acidification? J. Invest. Dermatol. 130, 2141–2144.

Foulquier, C. (2007). Genèse des cibles des autoanticorps anti-protéines citrullinées dans le tissu synovial rhumatoïde: peptidyl-arginine désiminases et fibrine citrullinée. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.

Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M.-C., Vincent, C., Nachat, R., Yamada, M., Takahara, H., et al. (2007). Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. Arthritis Rheum. 56, 3541–3553.

Fragkos, K.C., and Forbes, A. (2011). Was citrulline first a laxative substance? The truth about modern citrulline and its isolation. Nihon Ishigaku Zasshi J. Jpn. Hist. Med. 57, 275–292.

Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. Nature 445, 834–842.

Fujisaki, M., and Sugawara, K. (1981). Properties of Peptidylarginine Deiminase from the Epidermis of Newborn Rats. J. Biochem. (Tokyo) 89, 257–263.

Furio, L., Veer, S. de, Jaillet, M., Briot, A., Robin, A., Deraison, C., and Hovnanian, A. (2014). Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome. J. Exp. Med. 211, 499–513.

Furue, M., Yamazaki, S., Jimbow, K., Tsuchida, T., Amagai, M., Tanaka, T., Matsunaga, K., Muto, M., Morita, E., Akiyama, M., et al. (2011). Prevalence of dermatological disorders in Japan: A nationwide, cross-sectional, seasonal, multicenter, hospital-based study. J. Dermatol. 38, 310–320.

Gan, S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Markova, N., and Steinert, P.M. (1990). Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. Biochemistry (Mosc.) 29, 9432–9440.

Gandjbakhch, F., Fajardy, I., Ferré, B., Dubucquoi, S., Flipo, R.-M., Roger, N., and Solau-Gervais, E. (2009). A functional haplotype of PADI4 gene in rheumatoid arthritis: positive correlation in a French population. J. Rheumatol. 36, 881–886.

Gittler, J.K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K.J., Wang, C.Q.F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G., et al. (2012). Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 130, 1344–1354.

Green, K.J., and Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: New Perspectives on a Classic. J. Invest. Dermatol. 127, 2499–2515.

Gruber, R., Elias, P.M., Crumrine, D., Lin, T.-K., Brandner, J.M., Hachem, J.-P., Presland, R.B., Fleckman, P., Janecke, A.R., Sandilands, A., et al. (2011). Filaggrin Genotype in Ichthyosis Vulgaris Predicts Abnormalities in Epidermal Structure and Function. Am. J. Pathol. 178, 2252–2263.

Guerrin, M., Ishigami, A., Méchin, M.-C., Nachat, R., Valmary, S., Sebbag, M., Simon, M., Senshu, T., and Serre, G. (2003). cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. Biochem. J. 370, 167–174.

Gutowska-Owsiak, D., and Ogg, G.S. (2013). Cytokine regulation of the epidermal barrier. Clin. Exp. Allergy 43, 586–598.

Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Chiricozzi, A., Nograles, K.E., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Lin, P., Bergman, R., Bowcock, A.M., et al. (2009). Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. J. Allergy Clin. Immunol. 124, 1235–1244.e58.

de Guzman Strong, C., Conlan, S., Deming, C.B., Cheng, J., Sears, K.E., and Segre, J.A. (2010). A milieu of regulatory elements in the epidermal differentiation complex syntenic block: implications for atopic dermatitis and psoriasis. Hum. Mol. Genet. 19, 1453–1460.

Hachem, J.-P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B.E., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (2003). pH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. J. Invest. Dermatol. 121, 345–353.

Haftek, M., Callejon, S., Sandjeu, Y., Padois, K., Falson, F., Pirot, F., Portes, P., Demarne, F., and Jannin, V. (2011). Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. Exp. Dermatol. 20, 617–621.

Halvorsen, E.H., Pollmann, S., Gilboe, I.-M., Heijde, D. van der, Landewé, R., Ødegård, S., Kvien, T.K., and Molberg, Ø. (2008). Serum IgG antibodies to peptidylarginine deiminase 4 in rheumatoid arthritis and associations with disease severity. Ann. Rheum. Dis. 67, 414–417.

Hamilton, E.H., Payne, R.E., and O'keefe, E.J. (1991). Trichohyalin: Presence in the Granular Layer and Stratum Corneum of Normal Human Epidermis. J. Invest. Dermatol. 96, 666–672.

Hansmann, B., Schröder, J.-M., and Gerstel, U. (2015). Skin-Derived C-Terminal Filaggrin-2 Fragments Are Pseudomonas aeruginosa -Directed Antimicrobials Targeting Bacterial Replication. PLOS Pathog 11, e1005159.

Harding, C.R., and Scott, I.R. (1983). Histidine-rich proteins (filaggrins): Structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. J. Mol. Biol. 170, 651–673.

Harris, M.L., Darrah, E., Lam, G.K., Bartlett, S.J., Giles, J.T., Grant, A.V., Gao, P., Scott, W.W., El-Gabalawy, H., Casciola-Rosen, L., et al. (2008). Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 58, 1958–1967.

Haruna, K., Suga, Y., Muramatsu, S., Taneda, K., Mizuno, Y., Ikeda, S., Ueno, T., Kominami, E., Tanida, I., Tanida, I., et al. (2008). Differentiation-specific expression and localization of an autophagosomal marker protein (LC3) in human epidermal keratinocytes. J. Dermatol. Sci. 52, 213–215.

Haugen-Scofield, J., Resing, K.A., and Dale, B.A. (1988). Characterization of an Epidermal Phosphatase Specific for Filaggrin Phosphorylated by Casein Kinase II. J. Invest. Dermatol. 91, 553–559.

Hellier, F.F. (1940). Environment and Skin Disease.*. Br. J. Dermatol. 52, 107–123.

Henry, J. (2011). Analyse de l'expression et caractérisation fonctionnelle dabs l'épiderme humain normal de deux protéines apparentées à la filaggrine : l'hornerine et l'ifapsoriasine. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.

Henry, J., Toulza, E., Hsu, C.-Y., Pellerin, L., Balica, S., Mazereeuw-Hautier, J., Paul, C., Serre, G., Jonca, N., and Simon, M. (2012). Update on the epidermal differentiation complex. Front. Biosci. Landmark Ed. 17, 1517–1532.

Hensen, S.M.M., and Pruijn, G.J.M. (2014). Methods for the Detection of Peptidylarginine Deiminase (PAD) Activity and Protein Citrullination. Mol. Cell. Proteomics 13, 388–396.

Henzler Wildman, K.A., Lee, D.-K., and Ramamoorthy, A. (2003). Mechanism of Lipid Bilayer Disruption by the Human Antimicrobial Peptide, LL-37. Biochemistry (Mosc.) 42, 6545–6558.

Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M.L., Roop, D.R., and Steinert, P.M. (1991). Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. J. Biol. Chem. 266, 6626–6636.

Homberg, M., and Magin, T.M. (2014). Chapter Six - Beyond Expectations: Novel Insights into Epidermal Keratin Function and Regulation. In International Review of Cell and Molecular Biology, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 265–306.

Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., Gilbert, B., Lippens, S., De Groote, P., Roelandt, R., et al. (2011). Caspase-14 Is Required for Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin. J. Invest. Dermatol. 131, 2233–2241.

Howell, M.D., Kim, B.E., Gao, P., Grant, A.V., Boguniewicz, M., DeBenedetto, A., Schneider, L., Beck, L.A., Barnes, K.C., and Leung, D.Y.M. (2007). Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. J. Allergy Clin. Immunol. 120, 150–155.

Hsu, C.-Y., Henry, J., Raymond, A.-A., Méchin, M.-C., Pendaries, V., Nassar, D., Hansmann, B., Balica, S., Burlet-Schiltz, O., Schmitt, A.-M., et al. (2011). Deimination of Human Filaggrin-2 Promotes Its Proteolysis by Calpain 1. J. Biol. Chem. 286, 23222–23233.

Hsu, C.-Y., Gasc, G., Raymond, A.-A., Burlet-Schiltz, O., Takahara, H., Serre, G., Méchin, M.-C., and Simon, M. (2016). Deimination of Human Hornerin Enhances its Processing by Calpain-1 and its Cross-Linking by Transglutaminases. J. Invest. Dermatol.

Hsu, Y.-C., Li, L., and Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. Nat. Med. 20, 847–856.

Hvid, M., Vestergaard, C., Kemp, K., Christensen, G.B., Deleuran, B., and Deleuran, M. (2011). IL-25 in Atopic Dermatitis: A Possible Link between Inflammation and Skin Barrier Dysfunction? J. Invest. Dermatol. 131, 150–157.

Igawa, S., Kishibe, M., Murakami, M., Honma, M., Takahashi, H., Iizuka, H., and Ishida-Yamamoto, A. (2011). Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. Exp. Dermatol. 20, 53–57.

Ikari, K., Kuwahara, M., Nakamura, T., Momohara, S., Hara, M., Yamanaka, H., Tomatsu, T., and Kamatani, N. (2005). Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: A replication study. Arthritis Rheum. 52, 3054–3057.

Inagaki, M., Takahara, H., Nishi, Y., Sugawara, K., and Sato, C. (1989). Ca2+-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. J. Biol. Chem. 264, 18119–18127.

Ireland, J.M., and Unanue, E.R. (2011). Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. J. Exp. Med. 208, 2625–2632.

Ireland, J.M., and Unanue, E.R. (2012). Processing of proteins in autophagy vesicles of antigen-presenting cells generates citrullinated peptides recognized by the immune system. Autophagy 8, 429–430.

Irvine, A.D., McLean, W.H.I., and Leung, D.Y.M. (2011). Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. N. Engl. J. Med. 365, 1315–1327.

Ishida-Yamamoto, A., and Kishibe, M. (2011). Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. Med. Mol. Morphol. 44, 1–6.

Ishida-Yamamoto, A., McGrath, J.A., Judge, M.R., Leigh, I.M., Lane, E.B., and Eady, R.A.J. (1992). Selective Involvement of Keratins K1 and K10 in the Cytoskeletal Abnormality of Epidermolytic Hyperkeratosis (Bullous Congenital Ichthyosiform Erythroderma). J. Invest. Dermatol. 99, 19–26.

Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., Presland, R.B., Dale, B.A., and Iizuka, H. (1998). Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. 78, 1245–1253.

Ishida-Yamamoto, A., Senshu, T., Takahashi, H., Akiyama, K., Nomura, K., and Iizuka, H. (2000). Decreased Deiminated Keratin K1 in Psoriatic Hyperproliferative Epidermis. J. Invest. Dermatol. 114, 701–705.

Ishida-Yamamoto, A., Senshu, T., Eady, R.A.J., Takahashi, H., Shimizu, H., Akiyama, M., and Iizuka, H. (2002). Sequential Reorganization of Cornified Cell Keratin Filaments Involving Filaggrin-Mediated Compaction and Keratin 1 Deimination. J. Invest. Dermatol. 118, 282–287.

Ishida-Yamamoto, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T.J., Serre, G., and Iizuka, H. (2004). Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. J. Invest. Dermatol. 122, 1137–1144.

Ishigami, A., and Maruyama, N. (2010). Importance of research on peptidylarginine deiminase and citrullinated proteins in age-related disease. Geriatr. Gerontol. Int. 10, S53–S58.

Ishigami, A., Kuramoto, M., Yamada, M., Watanabe, K., and Senshu, T. (1998). Molecular cloning of two novel types of peptidylarginine deiminase cDNAs from retinoic acid-treated culture of a newborn rat keratinocyte cell line. FEBS Lett. 433, 113–118.

Ishigami, A., Ohsawa, T., Asaga, H., Akiyama, K., Kuramoto, M., and Maruyama, N. (2002). Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. Arch. Biochem. Biophys. 407, 25–31.

Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N., et al. (2005). Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. J. Neurosci. Res. 80, 120–128.

James, E.A., Moustakas, A.K., Bui, J., Papadopoulos, G.K., Bondinas, G., Buckner, J.H., and Kwok, W.W. (2010). HLA–DR1001 presents "altered-self" peptides derived from joint-associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets. Arthritis Rheum. 62, 2909–2918.

Jang, B., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.-S., and Choi, E.-K. (2013). Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases. Prion 7, 42–46.

Jang, S.I., Steinert, P.M., and Markova, N.G. (1996). Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. J. Biol. Chem. 271, 24105–24114.

Jang, S.-I., Karaman-Jurukovska, N., Morasso, M.I., Steinert, P.M., and Markova, N.G. (2000). Complex Interactions between Epidermal POU Domain and Activator Protein 1 Transcription Factors Regulate the Expression of the Profilaggrin Gene in Normal Human Epidermal Keratinocytes. J. Biol. Chem. 275, 15295–15304.

John, S., Thiebach, L., Frie, C., Mokkapati, S., Bechtel, M., Nischt, R., Rosser-Davies, S., Paulsson, M., and Smyth, N. (2012). Epidermal Transglutaminase (TGase 3) Is Required for Proper Hair Development, but Not the Formation of the Epidermal Barrier. PLOS ONE 7, e34252.

Jokura, Y., Ishikawa, S., Tokuda, H., and Imokawa, G. (1995). Molecular Analysis of Elastic Properties of the Stratum Corneum by Solid-State 13C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. J. Invest. Dermatol. 104, 806–812.

Jonca, N., Guerrin, M., Simon, M., and Serre, G. (2002). Corneodesmosin, a Component of Epidermal Corneocyte Desmosomes, Displays Homophilic Adhesive Properties. J. Biol. Chem. 277, 5024–5029.

Jonca, N., Leclerc, E.A., Caubet, C., Simon, M., Guerrin, M., and Serre, G. (2011). Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. Eur. J. Dermatol. EJD 21 Suppl 2, 35–42.

Jones, L.N. (2001). Hair structure anatomy and comparative anatomy1. Clin. Dermatol. 19, 95–103.

Jones, J.E., Slack, J.L., Fang, P., Zhang, X., Subramanian, V., Causey, C.P., Coonrod, S.A., Guo, M., and Thompson, P.R. (2012). Synthesis and Screening of a Haloacetamidine Containing Library To Identify PAD4 Selective Inhibitors. ACS Chem. Biol. 7, 160–165.

Jungersted, J.M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J.K., Hellgren, L.I., Jemec, G.B.E., Agner, T., and Weidinger, S. (2010). Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. Allergy 65, 911–918.

Kalinin, A.E., Kajava, A.V., and Steinert, P.M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. BioEssays 24, 789–800.

Kam, E., Resing, K.A., Lim, S.K., and Dale, B.A. (1993). Identification of rat epidermal profilaggrin phosphatase as a member of the protein phosphatase 2A family. J. Cell Sci. 106, 219–226.

Kamata, Y., Taniguchi, A., Yamamoto, M., Nomura, J., Ishihara, K., Takahara, H., Hibino, T., and Takeda, A. (2009). Neutral Cysteine Protease Bleomycin Hydrolase Is Essential for the Breakdown of Deiminated Filaggrin into Amino Acids. J. Biol. Chem. 284, 12829–12836.

Kan, R., Yurttas, P., Kim, B., Jin, M., Wo, L., Lee, B., Gosden, R., and Coonrod, S.A. (2011). Regulation of mouse oocyte microtubule and organelle dynamics by PADI6 and the cytoplasmic lattices. Dev. Biol. 350, 311–322.

Kanda, S., Sasaki, T., Shiohama, A., Nishifuji, K., Amagai, M., Iwasaki, T., and Kudoh, J. (2013). Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. Vet. Dermatol. 24, 25-e7.

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature 502, 333–339.

Kang, C.P., Lee, H.-S., Ju, H., Cho, H., Kang, C., and Bae, S.-C. (2006). A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. Arthritis Rheum. 54, 90–96.

Kanno, T., Shiraiwa, M., Takahara, H., Kawada, A., Tezuka, T., Yamanouchi, J., Yosida-Noro, C., Yoshiki, A., Kusakabe, M., and Manabe, M. (2000). Human Peptidylarginine Deiminase Type III: Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the cDNA, Properties of the Recombinant Enzyme, and Immunohistochemical Localization in Human Skin. J. Invest. Dermatol. 115, 813–823.

Kashima, M., Fukuyama, K., Kikuchi, M., and Epstein, W.L. (1988). Limited Proteolysis of High Molecular Weight Histidine-Rich Protein of Rat Epidermis by Epidermal Proteinases. J. Invest. Dermatol. 90, 829–833.

Katagiri, C., Sato, J., Nomura, J., and Denda, M. (2003). Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. J. Dermatol. Sci. 31, 29–35.

Kawada, A., Hara, K., Morimoto, K., Hiruma, M., and Ishibashi, A. (1995b). Rat epidermal cathepsin B: Purification and characterization of proteolytic properties toward filaggrin and synthetic substrates. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27, 175–183.

Kawada, A., Hara, K., Hiruma, M., Noguchi, H., and Ishibashi, A. (1995a). Rat Epidermal Cathepsin L-Like Proteinase: Purification and Some Hydrolytic Properties toward Filaggrin and Synthetic Substrates. J. Biochem. (Tokyo) 118, 332–337.

Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata, T., Shimizu, A., Mizuno, H., Yamada, T., and Amagai, M. (2012). Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. J. Allergy Clin. Immunol. 129, 1538–1546.e6.

Keilhoff, G., Prell, T., Langnaese, K., Mawrin, C., Simon, M., Fansa, H., and Nicholas, A.P. (2008). Expression pattern of peptidylarginine deiminase in rat and human Schwann cells. Dev. Neurobiol. 68, 101–114.

Keymeulen, A.V., Mascre, G., Youseff, K.K., Harel, I., Michaux, C., Geest, N.D., Szpalski, C., Achouri, Y., Bloch, W., Hassan, B.A., et al. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. J. Cell Biol. 187, 91–100.

Kezic, S., O'Regan, G.M., Yau, N., Sandilands, A., Chen, H., Campbell, L.E., Kroboth, K., Watson, R., Rowland, M., Irwin McLean, W.H., et al. (2011). Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity. Allergy 66, 934–940.

Kirschner, N., and Brandner, J.M. (2012). Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1257, 158–166.

Kishibe, M., Bando, Y., Terayama, R., Namikawa, K., Takahashi, H., Hashimoto, Y., Ishida-Yamamoto, A., Jiang, Y.-P., Mitrovic, B., Perez, D., et al. (2007). Kallikrein 8 Is Involved in Skin Desquamation in Cooperation with Other Kallikreins. J. Biol. Chem. 282, 5834–5841.

Kizawa, K., Tsuchimoto, S., Hashimoto, K., and Uchiwa, H. (1998). Gene Expression of Mouse S100A3, a Cysteine-Rich Calcium-Binding Protein, in Developing Hair Follicle. J. Invest. Dermatol. 111, 879–886.

Kizawa, K., Takahara, H., Troxler, H., Kleinert, P., Mochida, U., and Heizmann, C.W. (2008). Specific Citrullination Causes Assembly of a Globular S100A3 Homotetramer A putative Ca2+ modulator matures human hair cuticle. J. Biol. Chem. 283, 5004–5013.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12, 1–222.

Knight, J.S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O'Dell, A.A., Yalavarthi, S., Hodgin, J.B., Eitzman, D.T., Thompson, P.R., and Kaplan, M.J. (2013). Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. J. Clin. Invest. 123, 2981–2993.

Knuckley, B., Bhatia, M., and Thompson, P.R. (2007). Protein Arginine Deiminase 4: Evidence for a Reverse Protonation Mechanism. Biochemistry (Mosc.) 46, 6578–6587.

Knuckley, B., Causey, C.P., Jones, J.E., Bhatia, M., Dreyton, C.J., Osborne, T.C., Takahara, H., and Thompson, P.R. (2010). Substrate Specificity and Kinetic Studies of PADs 1, 3, and 4 Identify Potent and Selective Inhibitors of Protein Arginine Deiminase 3. Biochemistry (Mosc.) 49, 4852–4863.

Kochi, Y., Thabet, M.M., Suzuki, A., Okada, Y., Daha, N.A., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Myouzen, K., Kubo, M., Yamada, R., et al. (2011). PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 70, 512–515.

Kouklis, P.D., Hutton, E., and Fuchs, E. (1994). Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. J. Cell Biol. 127, 1049–1060.

Küchler, S., Henkes, D., Eckl, K.-M., Ackermann, K., Plendl, J., Korting, H.-C., Hennies, H.-C., and Schäfer-Korting, M. (2011). Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. Altern. Lab. Anim. ATLA 39, 471–480.

Kypriotou, M., Huber, M., and Hohl, D. (2012). The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the “fused genes” family. Exp. Dermatol. 21, 643–649.

Lacoste, N., and Côté, J. (2003). Le code épigénétique des histones. Médecine/Sciences 19, 955–959.

Langbein, L., Yoshida, H., Praetzel-Wunder, S., Parry, D.A., and Schweizer, J. (2010). The Keratins of the Human Beard Hair Medulla: The Riddle in the Middle. J. Invest. Dermatol. 130, 55–73.

Langbein, L., Eckhart, L., Fischer, H., Rogers, M.A., Praetzel-Wunder, S., Parry, D.A.D., Kittstein, W., and Schweizer, J. (2015). Localisation of keratin K78 in the basal layer and first suprabasal layers of stratified epithelia completes expression catalogue of type II keratins and provides new insights into sequential keratin expression. Cell Tissue Res. 363, 735–750.

Le Lamer, M., Pellerin, L., Reynier, M., Cau, L., Pendaries, V., Leprince, C., Méchin, M.-C., Serre, G., Paul, C., and Simon, M. (2015). Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis. Biol. Chem. 396, 1163–1179.

Lee, S.C., Kim, I.G., Marekov, L.N., O’Keefe, E.J., Parry, D.A., and Steinert, P.M. (1993). The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. J. Biol. Chem. 268, 12164–12176.

Leigh, I.M., Lane, E.B., and Watt, F.M. (1994). The Keratinocyte Handbook (Cambridge University Press).

Leung, M.C., Sutton, C.W., Fenton, D.A., and Tobin, D.J. (2010). Trichohyalin is a Potential Major Autoantigen in Human Alopecia Areata. J. Proteome Res. 9, 5153–5163.

Li, G., Hayward, I.N., Jenkins, B.R., Rothfuss, H.M., Young, C.H., Nevalainen, M.T., Muth, A., Thompson, P.R., Navratil, A.M., and Cherrington, B.D. (2016a). Peptidylarginine Deiminase 3 (PAD3) Is Upregulated by Prolactin Stimulation of CID-9 Cells and Expressed in the Lactating Mouse Mammary Gland. PLOS ONE 11, e0147503.

Li, L., Chen, X., Gu, H., Li, L., Chen, X., and Gu, H. (2016b). The signaling involving in autophagy machinery in keratinocytes and therapeutic approaches for skin diseases. Oncotarget 5.

Li, P., Yao, H., Zhang, Z., Li, M., Luo, Y., Thompson, P.R., Gilmour, D.S., and Wang, Y. (2008). Regulation of p53 Target Gene Expression by Peptidylarginine Deiminase 4. Mol. Cell. Biol. 28, 4745–4758.

Li, P., Wang, D., Yao, H., Doret, P., Hao, G., Shen, Q., Qiu, H., Zhang, X., Wang, Y., Chen, G., et al. (2010a). Coordination of PAD4 and HDAC2 in the regulation of p53-target gene expression. Oncogene 29, 3153–3162.

Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010b). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J. Exp. Med. 207, 1853–1862.

Lim, X., Tan, S.H., Koh, W.L.C., Chau, R.M.W., Yan, K.S., Kuo, C.J., Amerongen, R. van, Klein, A.M., and Nusse, R. (2013). Interfollicular Epidermal Stem Cells Self-Renew via Autocrine Wnt Signaling. Science 342, 1226–1230.

Lin, T.-K., Crumrine, D., Ackerman, L.D., Santiago, J.-L., Roelandt, T., Uchida, Y., Hupe, M., Fabriàs, G., Abad, J.L., Rice, R.H., et al. (2012). Cellular Changes that Accompany Shedding of Human Corneocytes. J. Invest. Dermatol. 132, 2430–2439.

List, K., Szabo, R., Wertz, P.W., Segre, J., Haudenschild, C.C., Kim, S.-Y., and Bugge, T.H. (2003). Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. J. Cell Biol. 163, 901–910.

Liu, Y. (2009). Chapter 1 TSLP in Epithelial Cell and Dendritic Cell Cross Talk. B.-A. in Immunology, ed. (Academic Press), pp. 1–25.

Liu, G.-Y., Liao, Y.-F., Chang, W.-H., Liu, C.-C., Hsieh, M.-C., Hsu, P.-C., Tsay, G.J., and Hung, H.-C. (2006). Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. Apoptosis 11, 183–196.

Liu, Y.-L., Chiang, Y.-H., Liu, G.-Y., and Hung, H.-C. (2011). Functional Role of Dimerization of Human Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4). PLOS ONE 6, e21314.

Liu, Y.-L., Tsai, I.-C., Chang, C.-W., Liao, Y.-F., Liu, G.-Y., and Hung, H.-C. (2013). Functional Roles of the Non-Catalytic Calcium-Binding Sites in the N-Terminal Domain of Human Peptidylarginine Deiminase 4. PLOS ONE 8, e51660.

Lonsdale-Eccles, J.D., Teller, D.C., and Dale, B.A. (1982). Characterization of a phosphorylated form of the intermediate filament-aggregating protein filaggrin. Biochemistry (Mosc.) 21, 5940–5948.

Loos, T., Mortier, A., Gouwy, M., Ronsse, I., Put, W., Lenaerts, J.-P., Van Damme, J., and Proost, P. (2008). Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation. Blood 112, 2648–2656.

Loos, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Proost, P. (2009). Citrullination of CXCL8 increases this chemokine’s ability to mobilize neutrophils into the blood circulation. Haematologica 94, 1346–1353.

Lorand, L., and Graham, R.M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 140–156.

Lu, J., Goldstein, K.M., Chen, P., Huang, S., Gelbert, L.M., and Nagpal, S. (2005). Transcriptional Profiling of Keratinocytes Reveals a Vitamin D-Regulated Epidermal Differentiation Network. J. Invest. Dermatol. 124, 778–785.

Luo, Y., Arita, K., Bhatia, M., Knuckley, B., Lee, Y.-H., Stallcup, M.R., Sato, M., and Thompson, P.R. (2006). Inhibitors and Inactivators of Protein Arginine Deiminase 4: Functional and Structural Characterization. Biochemistry (Mosc.) 45, 11727–11736.

Lynley, A.M., and Dale, B.A. (1983). The characterization of human epidermal filaggrin. Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. 744, 28–35.

Mack, J.W., Steven, A.C., and Steinert, P.M. (1993). The Mechanism of Interaction of Filaggrin with Intermediate Filaments. J. Mol. Biol. 232, 50–66.

Maddirevula, S., Coskun, S., Awartani, K., Alsaif, H., Abdulwahab, F. m., and Alkuraya, F. s. (2016). The human knockout phenotype of PADI6 is female sterility caused by cleavage failure of their fertilized eggs. Clin. Genet. n/a-n/a.

Madison, K.C. (2003). Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis. J. Invest. Dermatol. 121, 231–241.

Manabe, M., and O'Guin, W.M. (1994). Existence of trichohyalin-keratohyalin hybrid granules: Co-localization of two major intermediate filament-associated proteins in non-follicular epithelia. Differentiation 58, 65–75.

Manabe, M., Sanchez, M., Sun, T.-T., and Dale, B.A. (1991). Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in Ichthyosis vulgaris. Differentiation 48, 43–50.

Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A.Ö., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Wiedenbauer, E.-M., Krautgartner, W.D., Stoiber, W., Belohradsky, B.H., et al. (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. Nat. Med. 16, 1018–1023.

Mardaryev, A.N., Gdula, M.R., Yarker, J.L., Emelianov, V.N., Poterlowicz, K., Sharov, A.A., Sharova, T.Y., Scarpa, J.A., Chambon, P., Botchkarev, V.A., et al. (2014). p63 and Brg1 control developmentally regulated higher-order chromatin remodelling at the epidermal differentiation complex locus in epidermal progenitor cells. Development 141, 101–111.

Margolis, D.J., Gupta, J., Apter, A.J., Hoffstad, O., Papadopoulos, M., Rebbeck, T.R., Wubbenhorst, B., and Mitra, N. (2014). Exome Sequencing of Filaggrin and Related Genes in African-American Children with Atopic Dermatitis. J. Invest. Dermatol. 134, 2272–2274.

Martinez, A., Valdivia, A., Pascual-Salcedo, D., Lamas, J.R., Fernández-Arquero, M., Balsa, A., Fernández-Gutiérrez, B., Concha, E.G. de la, and Urcelay, E. (2005). PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. Rheumatology 44, 1263–1266.

Mascré, G., Dekoninck, S., Drogat, B., Youssef, K.K., Brohée, S., Sotiropoulou, P.A., Simons, B.D., and Blanpain, C. (2012). Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. Nature 489, 257–262.

Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U., and Ishizu, A. (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. Clin. Chim. Acta 459, 89–93.

Matsui, T., Miyamoto, K., Kubo, A., Kawasaki, H., Ebihara, T., Hata, K., Tanahashi, S., Ichinose, S., Imoto, I., Inazawa, J., et al. (2011). SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. EMBO Mol. Med. 3, 320–333.

Mattiuzzo, N. (2009). Etude du transcriptome kératinocytaire au cours du programme de différenciation de l'épiderme. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.

Mattiuzzo, N.R., Toulza, E., Jonca, N., Serre, G., and Guerrin, M. (2011). A large-scale multi-technique approach identifies forty-nine new players of keratinocyte terminal differentiation in human epidermis. Exp. Dermatol. 20, 113–118.

McMillan, J.R., Akiyama, M., Shimizu, H., Haftek, M., South, A.P., Perrot, H., McGrath, J.A., and Eady, R.A.J. (2003). Alterations in Desmosome Size and Number Coincide with the Loss of Keratinocyte Cohesion in Skin with Homozygous and Heterozygous Defects in the Desmosomal Protein Plakophilin 1. J. Invest. Dermatol. 121, 96–103.

Méchin, M.-C., Enji, M., Nachat, R., Chavanas, S., Charveron, M., Ishida-Yamamoto, A., Serre, G., Takahara, H., and Simon, M. (2005). The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations. Cell. Mol. Life Sci. 62, 1984–1995.

Méchin, M.-C., Sebbag, M., Arnaud, J., Nachat, R., Foulquier, C., Adoue, V., Coudane, F., Duplan, H., Schmitt, A.-M., Chavanas, S., et al. (2007). Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. Int. J. Cosmet. Sci. 29, 147–168.

Méchin, M.-C., Coudane, F., Adoue, V., Arnaud, J., Duplan, H., Charveron, M., Schmitt, A.-M., Takahara, H., Serre, G., and Simon, M. (2010). Deimination is regulated at multiple levels including auto-deimination of peptidylarginine deiminases. Cell. Mol. Life Sci. 67, 1491–1503.

Méchin, M.-C., Nachat, R., Coudane, F., Adoue, V., Arnaud, J., Serre, G., and Simon, M. (2011). [Deimination or citrullination, a post-translational modification with many physiological and pathophysiological facets]. Médecine Sci. MS 27, 49–54.

Méchin, M.-C., Cau, L., Galliano, M.-F., Daunes-Marion, S., Poigny, S., Vidaluc, J.-L., Bessou-Touya, S., Takahara, H., Serre, G., Duplan, H., et al. (2016). Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis. J. Dermatol. Sci. 81, 101–106.

Medland, S.E., Nyholt, D.R., Painter, J.N., McEvoy, B.P., McRae, A.F., Zhu, G., Gordon, S.D., Ferreira, M.A.R., Wright, M.J., Henders, A.K., et al. (2009). Common Variants in the Trichohyalin Gene Are Associated with Straight Hair in Europeans. Am. J. Hum. Genet. 85, 750–755.

Mehic, D., Bakiri, L., Ghannadan, M., Wagner, E.F., and Tschachler, E. (2005). Fos and Jun Proteins Are Specifically Expressed During Differentiation of Human Keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 124, 212–220.

Menon, G.K., Grayson, S., and Elias, P.M. (1985). Ionic Calcium Reservoirs in Mammalian Epidermis: Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. J. Invest. Dermatol. 84, 508–512.

Menon, G.K., Price, L.F., Bommannan, B., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (1994). Selective Obliteration of the Epidermal Calcium Gradient Leads to Enhanced Lamellar Body Secretion. J. Invest. Dermatol. 102, 789–795.

Miajlovic, H., Fallon, P.G., Irvine, A.D., and Foster, T.J. (2010). Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by Staphylococcus aureus. J. Allergy Clin. Immunol. 126, 1184–1190.e3.

Mildner, M., Jin, J., Eckhart, L., Kezic, S., Gruber, F., Barresi, C., Stremnitzer, C., Buchberger, M., Mlitz, V., Ballaun, C., et al. (2010). Knockdown of Filaggrin Impairs Diffusion Barrier Function and Increases UV Sensitivity in a Human Skin Model. J. Invest. Dermatol. 130, 2286–2294.

Miyachi, Y., Yoshimura, N., Suzuki, S., Hamakubo, T., Kannagi, R., Imamura, S., and Murachi, T. (1986). Biochemical Demonstration and Immunohistochemical Localization of Calpain in Human Skin. J. Invest. Dermatol. 86, 346–349.

Mizoguchi, M., Manabe, M., Kawamura, Y., Kondo, Y., Ishidoh, K., Kominami, E., Watanabe, K., Asaga, H., Senshu, T., and Ogawa, H. (1998). Deimination of 70-kD nuclear protein during epidermal apoptotic events in vitro. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 46, 1303–1309.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to Interpret LC3 Immunoblotting. Autophagy 3, 542–545.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell 140, 313–326.

Mlitz, V., Strasser, B., Jaeger, K., Hermann, M., Ghannadan, M., Buchberger, M., Alibardi, L., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2014). Trichohyalin-Like Proteins Have Evolutionarily Conserved Roles in the Morphogenesis of Skin Appendages. J. Invest. Dermatol. 134, 2685–2692.

Moelants, E.A.V., Mortier, A., Van Damme, J., Proost, P., and Loos, T. (2012). Peptidylarginine deiminases: physiological function, interaction with chemokines and role in pathology. Drug Discov. Today Technol. 9, e261–e280.

Moll, R., Divo, M., and Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. Histochem. Cell Biol. 129, 705.

Morasso, M.I., Markova, N.G., and Sargent, T.D. (1996). Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. J. Cell Biol. 135, 1879–1887.

Morioka, K. (2009). A guide to hair follicle analysis by transmission electron microscopy: technique and practice. Exp. Dermatol. 18, 577–582.

Moriyama, M., Moriyama, H., Uda, J., Matsuyama, A., Osawa, M., and Hayakawa, T. (2014). BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 134, 1627–1635.

Moscarello, M.A. (2014). Protein Hypercitrullination in CNS Demyelinating Disease Reversed by PAD Inhibition. In Protein Deimination in Human Health and Disease, A.P. Nicholas, and S.K. Bhattacharya, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 187–217.

Moscarello, M.A., Wood, D.D., Ackerley, C., and Boulias, C. (1994). Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. J. Clin. Invest. 94, 146–154.

Moscarello, M.A., Lei, H., Mastronardi, F.G., Winer, S., Tsui, H., Li, Z., Ackerley, C., Zhang, L., Raijmakers, R., and Wood, D.D. (2013). Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. Dis. Model. Mech. 6, 467–478.

Musse, A.A., Li, Z., Ackerley, C.A., Bienzle, D., Lei, H., Poma, R., Harauz, G., Moscarello, M.A., and Mastronardi, F.G. (2008). Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) overexpression in transgenic mice leads to myelin loss in the central nervous system. Dis. Model. Mech. 1, 229–240.

Nachat, R., Méchin, M.-C., Takahara, H., Chavanas, S., Charveron, M., Serre, G., and Simon, M. (2005a). Peptidylarginine Deiminase Isoforms 1–3 Are Expressed in the Epidermis and Involved in the Deimination of K1 and Filaggrin. J. Invest. Dermatol. 124, 384–393.

Nachat, R., Méchin, M.-C., Charveron, M., Serre, G., Constans, J., and Simon, M. (2005b). Peptidylarginine Deiminase Isoforms Are Differentially Expressed in the Anagen Hair Follicles and Other Human Skin Appendages. J. Invest. Dermatol. 125, 34–41.

Nakashima, K., Hagiwara, T., Ishigami, A., Nagata, S., Asaga, H., Kuramoto, M., Senshu, T., and Yamada, M. (1999). Molecular Characterization of Peptidylarginine Deiminase in HL-60 Cells Induced by Retinoic Acid and 1α,25-Dihydroxyvitamin D3. J. Biol. Chem. 274, 27786–27792.

Nakashima, K., Hagiwara, T., and Yamada, M. (2002). Nuclear Localization of Peptidylarginine Deiminase V and Histone Deimination in Granulocytes. J. Biol. Chem. 277, 49562–49568.

Nemoto-Hasebe, I., Akiyama, M., Nomura, T., Sandilands, A., McLean, W. h. i., and Shimizu, H. (2009). FLG mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with atopic eczema. Br. J. Dermatol. 161, 1387–1390.

Netzel-Arnett, S., Currie, B.M., Szabo, R., Lin, C.-Y., Chen, L.-M., Chai, K.X., Antalis, T.M., Bugge, T.H., and List, K. (2006). Evidence for a Matriptase-Prostasin Proteolytic Cascade Regulating Terminal Epidermal Differentiation. J. Biol. Chem. 281, 32941–32945.

Nicholas, A.P., and Whitaker, J.N. (2002). Preparation of a monoclonal antibody to citrullinated epitopes: its characterization and some applications to immunohistochemistry in human brain. Glia 37, 328–336.

Nishijyo, T., Kawada, A., Kanno, T., Shiraiwa, M., and Takahara, H. (1997). Isolation and Molecular Cloning of Epidermal- and Hair Follicle-Specific Peptidylarginine Deiminase (Type III) from Rat. J. Biochem. (Tokyo) 121, 868–875.

Nix, T.E., Nordquist, R.E., and Everett, M.A. (1965). Ultrastructural changes induced by ultraviolet light in human epidermis: Granular and transitional cell layers. J. Ultrastruct. Res. 12, 547–573.

O'Guin, W.M., Sun, T.-T., and Manabe, M. (1992). Interaction of Trichohyalin with Intermediate Filaments: Three Immunologically Defined Stages of Trichohyalin Maturation. J. Invest. Dermatol. 98, 24–32.

Oh, I.Y., Albea, D.M., Goodwin, Z.A., Quiggle, A.M., Baker, B.P., Guggisberg, A.M., Geahlen, J.H., Kroner, G.M., and de Guzman Strong, C. (2014). Regulation of the Dynamic Chromatin Architecture of the Epidermal Differentiation Complex Is Mediated by a c-Jun/AP-1-Modulated Enhancer. J. Invest. Dermatol. 134, 2371–2380.

Ordóñez, A., Martínez-Martínez, I., Corrales, F.J., Miqueo, C., Miñano, A., Vicente, V., and Corral, J. (2009). Effect of citrullination on the function and conformation of antithrombin. FEBS J. 276, 6763–6772.

Ordóñez, A., Yélamos, J., Pedersen, S., Miñano, A., Conesa-Zamora, P., Kristensen, S.R., Stender, M.T., Thorlacius-Ussing, O., Martínez-Martínez, I., Vicente, V., et al. (2010). Increased levels of citrullinated antithrombin in plasma of patients with rheumatoid arthritis and colorectal adenocarcinoma determined by a newly developed ELISA using a specific monoclonal antibody: Thromb. Haemost. 104, 1143–1149.

Orgován, G., and Noszál, B. (2011). The complete microspeciation of arginine and citrulline. J. Pharm. Biomed. Anal. 54, 965–971.

Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. Trends Biochem. Sci. 34, 453–463.

Paladini, R.D., Takahashi, K., Bravo, N.S., and Coulombe, P.A. (1996). Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. J. Cell Biol. 132, 381–397.

Palmer, C.N.A., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J.D., et al. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. Nat. Genet. 38, 441–446.

Parakkal, P.F. (1990). Catagen and Telogen Phases of the Growth Cycle. In Hair and Hair Diseases, P.D.P. h c C.E. Orfanos, and P.D.R. Happle, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 99–116.

Pearton, D.J., Dale, B.A., and Presland, R.B. (2002). Functional Analysis of the Profilaggrin N-Terminal Peptide: Identification of Domains that Regulate Nuclear and Cytoplasmic Distribution. J. Invest. Dermatol. 119, 661–669.

Pellerin, L. (2013). Implication physiopathologique de la filaggrine, l'hornerine et la filaggrine-2 dans la dermatite atopique. phd. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.

Pellerin, L., Henry, J., Hsu, C.-Y., Balica, S., Jean-Decoster, C., Méchin, M.-C., Hansmann, B., Rodriguez, E., Weindinger, S., Schmitt, A.-M., et al. (2013). Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. J. Allergy Clin. Immunol. 131, 1094–1102.

Pellerin, L., Paul, C., Schmitt, A.-M., Serre, G., and Simon, M. (2014). Bleomycin hydrolase downregulation in lesional skin of adult atopic dermatitis patients is independent of FLG gene mutations. J. Allergy Clin. Immunol. 134, 1459–1461.e7.

Pendaries, V., Malaisse, J., Pellerin, L., Le Lamer, M., Nachat, R., Kezic, S., Schmitt, A.-M., Paul, C., Poumay, Y., Serre, G., et al. (2014). Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation. J. Invest. Dermatol. 134, 2938–2946.

Peng, H., and Lavker, R.M. (2016). Nucleophagy: A New Look at Past Observations. J. Invest. Dermatol. 136, 1316–1318.

Pillai, S., Bikle, D.D., Mancianti, M.-L., Cline, P., and Hincenbergs, M. (1990). Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: Modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. J. Cell. Physiol. 143, 294–302.

Plenge, R.M., Padyukov, L., Remmers, E.F., Purcell, S., Lee, A.T., Karlson, E.W., Wolfe, F., Kastner, D.L., Alfredsson, L., Altshuler, D., et al. (2005). Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in >4,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. Am. J. Hum. Genet. 77, 1044–1060.

Pośpiech, E., Karłowska-Pik, J., Marcińska, M., Abidi, S., Andersen, J.D., Berge, M. van den, Carracedo, Á., Eduardoff, M., Freire-Aradas, A., Morling, N., et al. (2015). Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans. Forensic Sci. Int. Genet. 19, 280–288.

Potten, C.S. (1974). The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. Cell Tissue Kinet. 7, 77–88.

Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., and Diamandis, E.P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 183–202.

Presland, R.B., Bassuk, J.A., Kimball, J.K., and Dale, B.A. (1995). Characterization of Two Distinct Calcium-Binding Sites in the Amino-Terminus of Human Profilaggrin. J. Invest. Dermatol. 104, 218–223.

Presland, R.B., Kimball, J.R., Kautsky, M.B., Patrick Lewis, S., Lo, C.Y., and Dale, B.A. (1997). Evidence for Specific Proteolytic Cleavage of the N-Terminal Domain of Human Profilaggrin During Epidermal Differentiation. J. Invest. Dermatol. 108, 170–178.

Presland, R.B., Tomic-Canic, M., Lewis, S.P., and Dale, B.A. (2001). Regulation of human profilaggrin promoter activity in cultured epithelial cells by retinoic acid and glucocorticoids. J. Dermatol. Sci. 27, 192–205.

Pritzker, L.B., Joshi, S., Gowan, J.J., Harauz, G., and Moscarello, M.A. (2000). Deimination of Myelin Basic Protein. 1. Effect of Deimination of Arginyl Residues of Myelin Basic Protein on Its Structure and Susceptibility to Digestion by Cathepsin D. Biochemistry (Mosc.) 39, 5374–5381.

Proost, P., Loos, T., Mortier, A., Schutyser, E., Gouwy, M., Noppen, S., Dillen, C., Ronsse, I., Conings, R., Struyf, S., et al. (2008). Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. J. Exp. Med. 205, 2085–2097.

Raijmakers, R., Zendman, A.J.W., Egberts, W.V., Vossenaar, E.R., Raats, J., Soede-Huijbregts, C., Rutjes, F.P.J.T., van Veelen, P.A., Drijfhout, J.W., and Pruijn, G.J.M. (2007). Methylation of Arginine Residues Interferes with Citrullination by Peptidylarginine Deiminases in vitro. J. Mol. Biol. 367, 1118–1129.

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

Rawlings, A.V., and Matts, P.J. (2005). Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An Update in Relation to the Dry Skin Cycle. J. Invest. Dermatol. 124, 1099–1110.

Resing, K.A., Walsh, K.A., Haugen-Scofield, J., and Dale, B.A. (1989). Identification of proteolytic cleavage sites in the conversion of profilaggrin to filaggrin in mammalian epidermis. J. Biol. Chem. 264, 1837–1845.

Resing, K.A., Johnson, R.S., and Walsh, K.A. (1993). Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. Biochemistry (Mosc.) 32, 10036–10045.

Resing, K.A., Thulin, C., Whiting, K., Al-Alawi, N., and Mostad, S. (1995). Characterization of Profilaggrin Endoproteinase 1 A REGULATED CYTOPLASMIC ENDOPROTEINASE OF EPIDERMIS. J. Biol. Chem. 270, 28193–28198.

Rogers, G.E. (2004). Hair follicle differentiation and regulation. Int. J. Dev. Biol. 48, 163–170.

Rogers, G.E., and Simmonds, D.H. (1958). Content of citrulline and other amino-acids in a protein of hair follicles. Nature 182, 186–187.

Rogers, G.E., and Taylor, L.D. (1977). The enzymic derivation of citrulline residues from arginine residues in situ during the biosynthesis of hair proteins that are cross-linked by isopeptide bonds. Adv. Exp. Med. Biol. 86A, 283–294.

Rogers, G.E., Harding, H.W., and Llewellyn-Smith, I.J. (1977). The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. Biochim. Biophys. Acta 495, 159–175.

Rogers, M.A., Langbein, L., Praetzel-Wunder, S., Winter, H., and Schweizer, J. (2006). Human Hair Keratin-Associated Proteins (KAPs). B.-I.R. of Cytology, ed. (Academic Press), pp. 209–263.

Rossiter, H., König, U., Barresi, C., Buchberger, M., Ghannadan, M., Zhang, C.-F., Mlitz, V., Gmeiner, R., Sukseree, S., Födinger, D., et al. (2013). Epidermal keratinocytes form a functional skin barrier in the absence of Atg7 dependent autophagy. J. Dermatol. Sci. 71, 67–75.

Rothnagel, J.A., and Steinert, P.M. (1990). The structure of the gene for mouse filaggrin and a comparison of the repeating units. J. Biol. Chem. 265, 1862–1865.

Rus'd, A.A., Ikejiri, Y., Ono, H., Yonekawa, T., Shiraiwa, M., Kawada, A., and Takahara, H. (1999). Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse. Eur. J. Biochem. 259, 660–669.

Saijo, S., Nagai, A., Kinjo, S., Mashimo, R., Akimoto, M., Kizawa, K., Yabe-Wada, T., Shimizu, N., Takahara, H., and Unno, M. (2016). Monomeric Form of Peptidylarginine Deiminase Type I Revealed by X-ray Crystallography and Small-Angle X-ray Scattering. J. Mol. Biol. 428, 3058–3073.

Sakabe, J., Yamamoto, M., Hirakawa, S., Motoyama, A., Ohta, I., Tatsuno, K., Ito, T., Kabashima, K., Hibino, T., and Tokura, Y. (2013). Kallikrein-related Peptidase 5 Functions in Proteolytic Processing of Profilaggrin in Cultured Human Keratinocytes. J. Biol. Chem. 288, 17179–17189.

Sales, K.U., Masedunskas, A., Bey, A.L., Rasmussen, A.L., Weigert, R., List, K., Szabo, R., Overbeek, P.A., and Bugge, T.H. (2010). Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. Nat. Genet. 42, 676–683.

Sandilands, A., Terron-Kwiatkowski, A., Hull, P.R., O'Regan, G.M., Clayton, T.H., Watson, R.M., Carrick, T., Evans, A.T., Liao, H., Zhao, Y., et al. (2007). Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. Nat. Genet. 39, 650–654.

Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., and McLean, W.H.I. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. J. Cell Sci. 122, 1285–1294.

Saris, N.-E.L., and Carafoli, E. (2005). A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. Biochem. Biokhimiia 70, 187–194.

Sasaki, T., Furusyo, N., Shiohama, A., Takeuchi, S., Nakahara, T., Uchi, H., Hirota, T., Tamari, M., Shimizu, N., Ebihara, T., et al. (2014). Filaggrin loss-of-function mutations are not a predisposing factor for atopic dermatitis in an Ishigaki Island under subtropical climate. J. Dermatol. Sci. 76, 10–15.

Sato, J., Katagiri, C., Nomura, J., and Denda, M. (2001). Drastic decrease in environmental humidity decreases water-holding capacity and free amino acid content of the stratum corneum. Arch. Dermatol. Res. 293, 477–480.

Schäfer, M., and Werner, S. (2011). The Cornified Envelope: A First Line of Defense against Reactive Oxygen Species. J. Invest. Dermatol. 131, 1409–1411.

Schwartz, D.R., Homanics, G.E., Hoyt, D.G., Klein, E., Abernethy, J., and Lazo, J.S. (1999). The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 4680–4685.

Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A.D., Rogers, M.A., et al. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. J. Cell Biol. 174, 169–174.

Scott, I.R., and Harding, C.R. (1986). Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. Dev. Biol. 115, 84–92.

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

Senshu, T., Akiyama, K., Kan, S., Asaga, H., Ishigami, A., and Manabe, M. (1995). Detection of Deiminated Proteins in Rat Skin: Probing with a Monospecific Antibody After Modification of Citrulline Residues. J. Invest. Dermatol. 105, 163–169.

Senshu, T., Kan, S., Ogawa, H., Manabe, M., and Asaga, H. (1996). Preferential Deimination of Keratin K1 and Filaggrin during the Terminal Differentiation of Human Epidermis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 225, 712–719.

Senshu, T., Akiyama, K., and Nomura, K. (1999). Identification of citrulline residues in the V subdomains of keratin K1 derived from the cornified layer of newborn mouse epidermis. Exp. Dermatol. 8, 392–401.

Shimomura, Y., and Christiano, A.M. (2010). Biology and Genetics of Hair. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 11, 109–132.

Simon, M., Haftek, M., Sebbag, M., Montézin, M., Girbal-Neuhauser, E., Schmitt, D., and Serre, G. (1996). Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. Biochem. J. 317, 173–177.

Slack, J.L., Jones, L.E., Bhatia, M.M., and Thompson, P.R. (2011a). Autodeimination of Protein Arginine Deiminase 4 Alters Protein–Protein Interactions but Not Activity. Biochemistry (Mosc.) 50, 3997–4010.

Slack, J.L., Causey, C.P., and Thompson, P.R. (2011b). Protein arginine deiminase 4: a target for an epigenetic cancer therapy. Cell. Mol. Life Sci. 68, 709–720.

Slade, D.J., Subramanian, V., Fuhrmann, J., and Thompson, P.R. (2014). Chemical and biological methods to detect posttranslational modifications of arginine. Biopolymers 101, 133–143.

Slade, D.J., Fang, P., Dreyton, C.J., Zhang, Y., Fuhrmann, J., Rempel, D., Bax, B.D., Coonrod, S.A., Lewis, H.D., Guo, M., et al. (2015). Protein Arginine Deiminase 2 Binds Calcium in an Ordered Fashion: Implications for Inhibitor Design. ACS Chem. Biol. 10, 1043–1053.

van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S., and Bouwstra, J.A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1841, 295–313.

Smith, F.J.D., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L.E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A.T., Goudie, D.R., Lewis-Jones, S., et al. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. Nat. Genet. 38, 337–342.

Soma-Nagae, T., Nada, S., Kitagawa, M., Takahashi, Y., Mori, S., Oneyama, C., and Okada, M. (2013). The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. J Cell Sci 126, 3575–3584.

Sorice, M., Iannuccelli, C., Manganelli, V., Capozzi, A., Alessandri, C., Lococo, E., Garofalo, T., Di Franco, M., Bombardieri, M., Nerviani, A., et al. (2016). Autophagy generates citrullinated peptides in human synoviocytes: a possible trigger for anti-citrullinated peptide antibodies. Rheumatol. Oxf. Engl. 55, 1374–1385.

Spengler, J., Lugonja, B., Jimmy Ytterberg, A., Zubarev, R.A., Creese, A.J., Pearson, M.J., Grant, M.M., Milward, M., Lundberg, K., Buckley, C.D., et al. (2015). Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. Arthritis Rheumatol. 67, 3135–3145.

Spergel, J.M. (2010). From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. Ann. Allergy. Asthma. Immunol. 105, 99–106.

Steinert, P.M., and Marekov, L.N. (1995). The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Intermediate Filaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodipeptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope. J. Biol. Chem. 270, 17702–17711.

Steinert, P.M., Parry, D.A.D., and Marekov, L.N. (2003). Trichohyalin Mechanically Strengthens the Hair Follicle MULTIPLE CROSS-BRIDGING ROLES IN THE INNER ROOT SHEATH. J. Biol. Chem. 278, 41409–41419.

Steven, A.C., Bisher, M.E., Roop, D.R., and Steinert, P.M. (1990). Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin—two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. J. Struct. Biol. 104, 150–162.

Struyf, S., Noppen, S., Loos, T., Mortier, A., Gouwy, M., Verbeke, H., Huskens, D., Luangsay, S., Parmentier, M., Geboes, K., et al. (2009). Citrullination of CXCL12 Differentially Reduces CXCR4 and CXCR7 Binding with Loss of Inflammatory and Anti-HIV-1 Activity via CXCR4. J. Immunol. 182, 666–674.

Subramanian, V., Slade, D.J., and Thompson, P.R. (2014). Picking the PAD Lock: Chemical and Biological Approaches to Identify PAD Substrates and Inhibitors. In Protein Deimination in Human Health and Disease, A.P. Nicholas, and S.K. Bhattacharya, eds. (Springer New York), pp. 377–427.

Subramanian, V., Knight, J.S., Parelkar, S., Anguish, L., Coonrod, S.A., Kaplan, M.J., and Thompson, P.R. (2015). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Tetrazole Analogs of Cl-Amidine as Protein Arginine Deiminase Inhibitors. J. Med. Chem. 58, 1337–1344.

Sun, R., Celli, A., Crumrine, D., Hupe, M., Adame, L.C., Pennypacker, S.D., Park, K., Uchida, Y., Feingold, K.R., Elias, P.M., et al. (2015). Lowered Humidity Produces Human Epidermal Equivalents with Enhanced Barrier Properties. Tissue Eng. Part C Methods 21, 15–22.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhiro, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., et al. (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat. Genet. 34, 395–402.

Sybert, V.P., Dale, B.A., and Holbrook, K.A. (1985). Ichthyosis Vulgaris: Identification of a Defect in Synthesis of Filaggrin Correlated with an Absence of Keratohyaline Granules. J. Invest. Dermatol. 84, 191–194.

Takahara, H., Oikawa, Y., and Sugawara, K. (1983). Purification and Characterization of Peptidylarginine Deiminase from Rabbit Skeletal Muscle. J. Biochem. (Tokyo) 94, 1945–1953.

Takahara, H., Kusubata, M., Tsuchida, M., Kohsaka, T., Tagami, S., and Sugawara, K. (1992). Expression of peptidylarginine deiminase in the uterine epithelial cells of mouse is dependent on estrogen. J. Biol. Chem. 267, 520–525.

Takahashi, T., Mamada, A., Kizawa, K., and Suzuki, R. (2016). Age-dependent damage of hair cuticle: contribution of S100A3 protein and its citrullination. J. Cosmet. Dermatol. 15, 211–218.

Takase, T., and Hirai, Y. (2012). Identification of the C-terminal tail domain of AHF/trichohyalin as the critical site for modulation of the keratin filamentous meshwork in the keratinocyte. J. Dermatol. Sci. 65, 141–148.

Tanikawa, C., Ueda, K., Nakagawa, H., Yoshida, N., Nakamura, Y., and Matsuda, K. (2009). Regulation of Protein Citrullination through p53/PADI4 Network in DNA Damage Response. Cancer Res. 69, 8761–8769.

Tarcsa, E., Marekov, L.N., Mei, G., Melino, G., Lee, S.-C., and Steinert, P.M. (1996). Protein Unfolding by Peptidylarginine Deiminase SUBSTRATE SPECIFICITY AND STRUCTURAL RELATIONSHIPS OF THE NATURAL SUBSTRATES TRICHOHYALIN AND FILAGGRIN. J. Biol. Chem. 271, 30709–30716.

Tarcsa, E., Marekov, L.N., Andreoli, J., Idler, W.W., Candi, E., Chung, S.-I., and Steinert, P.M. (1997). The Fate of Trichohyalin SEQUENTIAL POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS BY PEPTIDYL-ARGININE DEIMINASE AND TRANSGLUTAMINASES. J. Biol. Chem. 272, 27893–27901.

Tauber, M., Balica, S., Hsu, C.-Y., Jean-Decoster, C., Lauze, C., Redoules, D., Viodé, C., Schmitt, A.-M., Serre, G., Simon, M., et al. (2016). Staphylococcus aureus density on lesional and nonlesional skin is strongly associated with disease severity in atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 137, 1272–1274.e3.

Thawer-Esmail, F., Jakasa, I., Todd, G., Wen, Y., Brown, S.J., Kroboth, K., Campbell, L.E., O'Regan, G.M., McLean, W.H.I., Irvine, A.D., et al. (2014). South African amaXhosa patients with atopic dermatitis have decreased levels of filaggrin breakdown products but no loss-of-function mutations in filaggrin. J. Allergy Clin. Immunol. 133, 280–282.e2.

Thyssen, J.P., and Kezic, S. (2014). Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 134, 792–799.

Thyssen, J. p., Godoy-Gijon, E., and Elias, P. m. (2013). Ichthyosis vulgaris: the filaggrin mutation disease. Br. J. Dermatol. 168, 1155–1166.

Tsuchida, M., Minami, N., Tsujimoto, H., Fukazawa, C., Takahara, H., and Sugawara, K. (1991). Molecular Cloning of Mouse Peptidylarginine Deiminase, and Its Possible Isozyme cDNAs. Agric. Biol. Chem. 55, 295–297.

Tsuchida, M., Takahara, H., Minami, N., Arai, T., Kobayashi, Y., Tsujimoto, H., Fukazawa, C., and Sugawara, K. (1993). cDNA nucleotide sequence and primary structure of mouse uterine peptidylarginine deiminase. Eur. J. Biochem. 215, 677–685.

U, K.P., Subramanian, V., Nicholas, A.P., Thompson, P.R., and Ferretti, P. (2014). Modulation of calcium-induced cell death in human neural stem cells by the novel peptidylarginine deiminase–AIF pathway. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1843, 1162–1171.

Vávrová, K., Henkes, D., Strüver, K., Sochorová, M., Školová, B., Witting, M.Y., Friess, W., Schreml, S., Meier, R.J., Schäfer-Korting, M., et al. (2014). Filaggrin Deficiency Leads to Impaired Lipid Profile and Altered Acidification Pathways in a 3D Skin Construct. J. Invest. Dermatol. 134, 746–753.

Vermeij, W.P., and Backendorf, C. (2014). Reactive oxygen species (ROS) protection via cysteine oxidation in the epidermal cornified cell envelope. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1195, 157–169.

Vossenaar, E.R., Zendman, A.J.W., van Venrooij, W.J., and Pruijn, G.J.M. (2003). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. BioEssays 25, 1106–1118.

Vossenaar, E.R., Radstake, T.R.D., Heijden, A. van der, Mansum, M.A.M. van, Dieteren, C., Rooij, D.-J. de, Barrera, P., Zendman, A.J.W., and Venrooij, W.J. van (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. Ann. Rheum. Dis. 63, 373–381.

Wang, S., Chen, X.A., Hu, J., Jiang, J., Li, Y., Chan-Salis, K.Y., Gu, Y., Chen, G., Thomas, C., Pugh, B.F., et al. (2015). ATF4 Gene Network Mediates Cellular Response to the Anticancer PAD Inhibitor YW3-56 in Triple-Negative Breast Cancer Cells. Mol. Cancer Ther. 14, 877–888.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.-H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., et al. (2004). Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylimination. Science 306, 279–283.

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol 184, 205–213.

Wang, Y., Li, P., Wang, S., Hu, J., Chen, X.A., Wu, J., Fisher, M., Oshaben, K., Zhao, N., Gu, Y., et al. (2012). Anticancer Peptidylarginine Deiminase (PAD) Inhibitors Regulate the Autophagy Flux and the Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Activity. J. Biol. Chem. 287, 25941–25953.

Watanabe, K., and Senshu, T. (1989). Isolation and characterization of cDNA clones encoding rat skeletal muscle peptidylarginine deiminase. J. Biol. Chem. 264, 15255–15260.

Weerheim, A., and Ponec, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. Arch. Dermatol. Res. 293, 191–199.

Weiland, S., Husing, A., Strachan, D., Rzehak, P., and Pearce, N. (2004). Climate and the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema in children. Occup. Environ. Med. 61, 609–615.

Willis, V.C., Gizinski, A.M., Banda, N.K., Causey, C.P., Knuckley, B., Cordova, K.N., Luo, Y., Levitt, B., Glogowska, M., Chandra, P., et al. (2011). N-α-Benzoyl-N5-(2-Chloro-1-Iminoethyl)-l-Ornithine Amide, a Protein Arginine Deiminase Inhibitor, Reduces the Severity of Murine Collagen-Induced Arthritis. J. Immunol. 186, 4396–4404.

Witalison, E.E., Thompson, P.R., and Hofseth, L.J. (2015). Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation. Curr. Drug Targets 16, 700–710.

Wolfram, L.J. (2003). Human hair: A unique physicochemical composite. J. Am. Acad. Dermatol. 48, S106–S114.

Wong, W.J., Richardson, T., Seykora, J.T., Cotsarelis, G., and Simon, M.C. (2015a). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Filaggrin Expression and Epidermal Barrier Function. J. Invest. Dermatol. 135, 454–461.

Wong, Y., Lee, S.S.J., and Goh, C.L. (2015b). Hypopigmentation Induced by Frequent Low-Fluence, Large-Spot-Size QS Nd:YAG Laser Treatments. Ann. Dermatol. 27, 751–755.

Woo, S.-H., Stumpfova, M., Jensen, U.B., Lumpkin, E.A., and Owens, D.M. (2010). Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage. Dev. Camb. Engl. 137, 3965–3971.

Wood, D.D., Ackerley, C.A., Brand, B. van den, Zhang, L., Raijmakers, R., Mastronardi, F.G., and Moscarello, M.A. (2008). Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities. Lab. Invest. 88, 354–364.

Wright, P.W., Bolling, L.C., Calvert, M.E., Sarmento, O.F., Berkeley, E.V., Shea, M.C., Hao, Z., Jayes, F.C., Bush, L.A., Shetty, J., et al. (2003). ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. Dev. Biol. 256, 74–89.

Wu, N., and Gidrol, X. (2014). The wind rose of human keratinocyte cell fate. Cell. Mol. Life Sci. 71, 4697–4702.

Wu, X., and Hammer, J.A. (2014). Melanosome transfer: it is best to give and receive. Curr. Opin. Cell Biol. 29, 1–7.

Wu, Z., Hansmann, B., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R., and Schröder, J.-M. (2009). Molecular Identification and Expression Analysis of Filaggrin-2, a Member of the S100 Fused-Type Protein Family. PLOS ONE 4, e5227.

Xia, X., Yan, C., Wu, W., Zhou, Y., Hou, L., Zuo, B., Xu, D., Ren, Z., and Xiong, Y. (2016). Characterization of the porcine peptidylarginine deiminase type VI gene (PADI6) promoter: Sp1 regulates basal transcription of the porcine PADI6. Gene 575, 551–558.

Xu, Y., Shi, Y., Fu, J., Yu, M., Feng, R., Sang, Q., Liang, B., Chen, B., Qu, R., Li, B., et al. (2016). Mutations in PADI6 Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. Am. J. Hum. Genet. 99, 744–752.

Yamakoshi, A., Ono, H., Nishijyo, T., Shiraiwa, M., and Takahara, H. (1998). Cloning of cDNA encoding a novel isoform (type IV) of peptidylarginine deiminase from rat epidermis. Biochim. Biophys. Acta 1386, 227–232.

Yamamoto, M., Kamata, Y., Iida, T., Fukushima, H., Nomura, J., Saito, M., Tajima, M., Okubo, Y., Momoi, T., Tsuboi, R., et al. (2011). Quantification of activated and total caspase-14 with newly developed ELISA systems in normal and atopic skin. J. Dermatol. Sci. 61, 110–117.

Yamamoto, M., Miyai, M., Matsumoto, Y., Tsuboi, R., and Hibino, T. (2012). Kallikrein-related Peptidase-7 Regulates Caspase-14 Maturation during Keratinocyte Terminal Differentiation by Generating an Intermediate Form. J. Biol. Chem. 287, 32825–32834.

Yamazaki, M., Ishidoh, K., Suga, Y., Saido, T.C., Kawashima, S., Suzuki, K., Kominami, E., and Ogawa, H. (1997). Cytoplasmic Processing of Human Profilaggrin by Active μ-Calpain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 235, 652–656.

Yang, F., Waters, K.M., Webb-Robertson, B.-J., Sowa, M.B., von Neubeck, C., Aldrich, J.T., Meng Markillie, L., Wirgau, R.M., Gritsenko, M.A., Zhao, R., et al. (2012). Quantitative phosphoproteomics identifies filaggrin and other targets of ionizing radiation in a human skin model. Exp. Dermatol. 21, 352–357.

Yang, L., Tan, D., and Piao, H. (2016). Myelin Basic Protein Citrullination in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Target for the Pathology. Neurochem. Res. 1–12.

Yao, H., Li, P., Venters, B.J., Zheng, S., Thompson, P.R., Pugh, B.F., and Wang, Y. (2008). Histone Arg Modifications and p53 Regulate the Expression of OKL38, a Mediator of Apoptosis. J. Biol. Chem. 283, 20060–20068.

Ying, S., Kojima, T., Kawada, A., Nachat, R., Serre, G., Simon, M., and Takahara, H. (2010). An Intronic Enhancer Driven by NF-κB Contributes to Transcriptional Regulation of Peptidylarginine Deiminase Type I Gene in Human Keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 130, 2543–2552.

Yokouchi, M., Kubo, A., Kawasaki, H., Yoshida, K., Ishii, K., Furuse, M., and Amagai, M. (2015). Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. J. Dermatol. Sci. 77, 28–36.

Yoneda, K., Nakagawa, T., Lawrence, O.T., Huard, J., Demitsu, T., Kubota, Y., and Presland, R.B. (2012). Interaction of the Profilaggrin N-Terminal Domain with Loricrin in Human Cultured Keratinocytes and Epidermis. J. Invest. Dermatol. 132, 1206–1214.

Zanelli, E., Breedveld, F.C., and de Vries, R.R.P. (2000). Hla class II association with rheumatoid arthritis: Facts and interpretations. Hum. Immunol. 61, 1254–1261.

Zeeuwen, P.L.J.M., Cheng, T., and Schalkwijk, J. (2009). The Biology of Cystatin M/E and its Cognate Target Proteases. J. Invest. Dermatol. 129, 1327–1338.

Zhang, X., Bolt, M., Guertin, M.J., Chen, W., Zhang, S., Cherrington, B.D., Slade, D.J., Dreyton, C.J., Subramanian, V., Bicker, K.L., et al. (2012). Peptidylarginine deiminase 2-catalyzed histone H3 arginine 26 citrullination facilitates estrogen receptor α target gene activation. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 13331–13336.

ANNEXES

ANNEXE 1

Nombre d'arginine dans les séquences de référence de la TCHH et de la FLG

TCHH

NP_009044.2

```
   1 MSPLLRSICD ITEIFNQYVS HDCDGAALTK KDLKNLLERE FGAVLRRPHD PKTVDLILEL
  61 LDLDSNGRVD FNEFLLFIFK VAQACYYALG QATGLDEEKR ARCDGKESLL QDRRQEEDQR
 121 RFEPRDRQLE EEPGQRRRQK RQEQERELAE GEEQSEKQER LEQRDRQRRD EELWRQRQEW
 181 QEREERRAEE EQLQSCKGHE TEEFPDEEQL RRRELLELRR KGREEKQQQR RERQDRVFQE
 241 EEEKEWRKRE TVLRKEEEKL QEEEPQRQRE LQEEEEQLRK LERQELRRER QEEEQQQQRL
 301 RREQQLRRKQ EEERREQQEE RREQQERREQ QEERREQQLR REQEERREQQ LRREQEEERR
 361 EQQLRREQEE ERREQQLRRE QQLRREQQLR REQQLRREQQ LRREQQLRRE QQLRREQQLR
 421 REQQLRREQE EERHEQKHEQ ERREQRLKRE QEERRDWLKR EEETERHEQE RRKQQLKRDQ
 481 EEERRERWLK LEEEERREQQ ERREQQLRRE QEERREQRLK RQEEEERLQQ RLRSEQQLRR
 541 EQEERREQLL KREEEKRLEQ ERREQRLKRE QEERRDQLLK REEERRQQRL KREQEERLEQ
 601 RLKREEVERL EQEERREQRL KREEPEEERR QQLLKSEEQE ERRQQQLRRE QQERREQRLK
 661 REEEEERLEQ RLKREHEEER REQELAEEEQ EQARERIKSR IPKWQWQLES EADARQSKVY
 721 SRPRKQEGQR RRQEQEEKRR RRESELQWQE EERAHRQQQE EEQRRDFTWQ WQAEEKSERG
 781 RQRLSARPPL REQRERQLRA EERQQREQRF LPEEEEKEQR RRQRRERERE LQFLEEEEQL
 841 QRRERAQQLQ EEEDGLQEDQ ERRRSQEQRR DQKWRWQLEE ERKRRRHTLY AKPALQEQLR
 901 KEQQLLQEEE EELQREERER RRRQEQERQY REEEQLQQEE EQLLREEREK RRRQERERQY
 961 RKDKKLQQKE EQLLGEEPEK RRRQERERKY REEEELQQEE EQLLREEREK RRRQEWERQY
1021 RKKDELQQEE EQLLREERER RRLQERERQY REEEELQQEE EQLLGEERET RRRQELERQY
1081 RKEEELQQEE EQLLREEPEK RRRQERERQC REEEELQQEE EQLLREEREK RRRQELERQY
1141 REEEEVQQEE EQLLREEPEK RRRQELERQY REEEELQQEE EQLLREEQEK RRQERERQYR
1201 EEEELQRQKR KQRYRDEDQR SDLKWQWEPE KENAVRDNKV YCKGRENEQF RQLEDSQLRD
1261 RQSQQDLQHL LGEQQERDRE QERRRWQQRD RHFPEEEQLE REEQKEAKRR DRKSQEEKQL
1321 LREEREEKRR RQETDRKFRE EEQLLQEREE QPLRRQERDR KFREEELRHQ EQGRKFLEEE
1381 QRLRRQERER KFLKEEQQLR CQEREQQLRQ DRDRKFREEE QQLSRQERDR KFREEEQQVR
1441 RQERERKFLE EEQQLRQERH RKFREEEQLL QEREEQQLHR QERDRKFLEE EQQLRRQERD
1501 RKFREQELRS QEPERKFLEE EQQLHRQQRQ RKFLQEEQQL RRQERGQQRR QDRDRKFREE
1561 EQLRQEREEQ QLSRQERDRK FRLEEQKVRR QEQERKFMED EQQLRRQEGQ QQLRQERDRK
1621 FREDEQLLQE REEQQLHRQE RDRKFLEEEP QLRRQEREQQ LRHDRDRKFR EEEQLLQEGE
1681 EQQLRRQERD RKFREEEQQL RRQERERKFL QEEQQLRRQE LERKFREEEQ LRQETEQEQL
1741 RRQERYRKIL EEEQLRPERE EQQLRRQERD RKFREEEQLR QEREEQQLRS QESDRKFREE
1801 EQLRQEREEQ QLRPQQRDGK YRWEEEQLQL EEQEQRLRQE RDRQYRAEEQ FATQEKSRRE
1861 EQELWQEEEQ KRRQERERKL REEHIRRQQK EEQRHRQVGE IKSQEGKGHG RLLEPGTHQF
1921 ASVPVRSSPL YEYIQEQRSQ YRP
```

Domaine central répétitif (en bleu) :

377 arginines (R) / 1580 acides aminés totaux

soit **23,9% d'arginine**

FLG

NP_002007.1

```
   1 MSTLLENIFA IINLFKQYSK KDKNTDTLSK KELKELLEKE FRQILKNPDD PDMVDVFMDH
  61 LDIDHNKKID FTEFLLMVFK LAQAYYESTR KENLPISGHK HRKHSHHDKH EDNKQEENKE
 121 NRKRPSSLER RNNRKGNKGR SKSPRETGGK RHESSSEKKE RKGYSPTHRE EEYGKNHHNS
 181 SKKEKNKTEN TRLGDNRKRL SERLEEKEDN EEGVYDYENT GRMTQKWIQS GHIATYYTIQ
 241 DEAYDTTDSL LEENKIYERS RSSDGKSSSQ VNRSRHENTS QVPLQESRTR KRRGSRVSQD
 301 RDSEGHSEDS ERHSGSASRN HHGSAWEQSR DGSRHPRSHD EDRASHGHSA DSSRQSGTRH
 361 AETSSRGQTA SSHEQARSSP GERHGSGHQQ SADSSRHSAT GRGQASSAVS DRGHRGSSGS
 421 QASDSEGHSE NSDTQSVSGH GKAGLRQQSH QESTRGRSGE RSGRSGSSLY QVSTHEQPDS
 481 AHGRTGTSTG GRQGSHHEQA RDSSRHSASQ EGQDTIRGHP GSSRGGRQGS HHEQSVNRSG
 541 HSGSHHSHTT SQGRSDASHG QSGSRSASRQ TRNEEQSGDG TRHSGSRHHE ASSQADSSRH
 601 SQVGQGQSSG PRTSRNQGSS VSQDSDSQGH SEDSERWSGS ASRNHHGSAQ EQSRDGSRHP
 661 RSHHEDRAGH GHSADSSRKS GTRHTQNSSS GQAASSHEQA RSSAGERHGS RHQLQSADSS
 721 RHSGTGHGQA SSAVRDSGHR GSSGSQATDS EGHSEDSDTQ SVSGHGQAGH HQQSHQESAR
 781 DRSGERSRRS GSFLYQVSTH KQSESSHGWT GPSTGVRQGS HHEQARDNSR HSASQDGQDT
 841 IRGHPGSSRR GRQGSHHEQS VDRSGHSGSH HSHTTSQGRS DASRGQSGSR SASRTTRNEE
 901 QSRDGSRHSG SRHHEASSHA DISRHSQAGQ GQSEGSRTSR RQGSSVSQDS DSEGHSEDSE
 961 RWSGSASRNH RGSAQEQSRH GSRHPRSHHE DRAGHGHSAD SSRQSGTPHA ETSSGGQAAS
1021 SHEQARSSPG ERHGSRHQQS ADSSRHSGIP RRQASSAVRD SGHWGSSGSQ ASDSEGHSEE
1081 SDTQSVSGHG QDGPHQQSHQ ESARDWSGGR SGRSGSCIYQ VSTHEQSESA HGRTRTSTGR
1141 RQGSHHEQAR DSSRHSASQE GQDTIRAHPG SRRGGRQGSH HEQSVDRSGH SGSHHSHTTS
1201 QGGRSDASHGQ SGSRSASRQT RKDKQSGDGS RHSGSRHHEA ASWADSSRHS QVGQEQSSGS
1261 RTSRHQGSSV SQDSDSERHS DDSERLSGSA SRNHHGSSRE QSRDGSRHPG FHQEDRASHG
1321 HSADSSRQSG THHTESSSHG QAVSSHEQAR SSPGERHGSR HQQSADSSRH SGIGHRQASS
1381 AVRDSGHRGS SGSQVTNSEG HSEDSDTQSV SAHGQAGPHQ QSHKESARGQ SGESSGRSRS
1441 FLYQVSSHEQ SESTHGQTAP STGGRQGSRH EQARNSSRHS ASQDGQDTIR GHPGSSRGGR
1501 QGSYHEQSVD RSGHSGYHHS HTTPQGRSDA SHGQSGPRSA SRQTRNEEQS GDGSRHSGSR
1561 HHEPSTRAGS SRHSQVGQGE SAGSKTSRRQ GSSVSQDRDS EGHSEDSERR SESASRNHYG
1621 SAREQSRHGS RNPRSHQEDR ASHGHSAESS RQSGTRHAET SSGGQAASSQ EQARSSPGER
1681 HGSRHQQSAD SSTDSGTGRR QDSSVVGDSG NRGSSGSQAS DSEGHSEESD TQSVSAHGQA
1741 GPHQQSHQES TRGQSGERSG RSGSFLYQVS THEQSESAHG RTGPSTGGRQ RSRHEQARDS
1801 SRHSASQEGQ DTIRGHPGSS RGGRQGSHYE QSVDSSGHSG SHHSHTTSQE RSDVSRGQSG
1861 SRSVSRQTRN EKQSGDGSRH SGSRHHEASS RADSSRHSQV GQGQSSGPRT SRNQGSSVSQ
1921 DSDSQGHSED SERWSGSASR NHLGSAWEQS RDGSRHPGSH HEDRAGHGHS ADSSRQSGTR
1981 HTESSSRGQA ASSHEQARSS AGERHGSHHQ LQSADSSRHS GIGHGQASSA VRDSGHRGYS
2041 GSQASDSEGH SEDSDTQSVS AQGKAGPHQQ SHKESARGQS GESSGRSGSF LYQVSTHEQS
2101 ESTHGQSAPS TGGRQGSHYD QAQDSSRHSA SQEGQDTIRG HPGPSRGGRQ GSHQEQSVDR
2161 SGHSGSHHSH TTSQGRSDAS RGQSGSRSAS RKTYDKEQSG DGSRHSGSHH HEASSWADSS
2221 RHSLVGQGQS SGPRTSRPRG SSVSQDSDSE GHSEDSERRS GSASRNHHGS AQEQSRDGSR
2281 HPRSHHEDRA GHGHSAESSR QSGTHHAENS SGGQAASSHE QARSSAGERH GSHHQQSADS
2341 SRHSGIGHGQ ASSAVRDSGH RGSSGSQASD SEGHSEDSDT QSVSAHGQAG PHQQSHQEST
2401 RGRSAGRSGR SGSFLYQVST HEQSESAHGR TGTSTGGRQG SHHKQARDSS RHSTSQEGQD
2461 TIHGHPGSSS GGRQGSHYEQ LVDRSGHSGS HHSHTTSQGR SDASHGHSGS RSASRQTRND
2521 EQSGDGSRHS GSRHHEASSR ADSSGHSQVG QGQSEGPRTS RNWGSSFSQD SDSQGHSEDS
2581 ERWSGSASRN HHGSAQEQLR DGSRHPRSHQ EDRAGHGHSA DSSRQSGTRH TQTSSGGQAA
2641 SSHEQARSSA GERHGSHHQQ SADSSRHSGI GHGQASSAVR DSGHRGYSGS QASDNEGHSE
2701 DSDTQSVSAH GQAGSHQQSH QESARGRSGE TSGHSGSFLY QVSTHEQSES SHGWTGPSTR
2761 GRQGSRHEQA QDSSRHSASQ DGQDTIRGHP GSSRGGRQGY HHEHSVDSSG HSGSHHSHTT
2821 SQGRSDASRG QSGSRSASRT TRNEEQSGDG SRHSGSRHHE ASTHADISRH SQAVQGQSEG
2881 SRRSRRQGSS VSQDSDSEGH SEDSERWSGS ASRNHHGSAQ EQLRDGSRHP RSHQEDRAGH
2941 GHSADSSRQS GTRHTQTSSG GQAASSHEQA RSSAGERHGS HHQQSADSSR HSGIGHGQAS
3001 SAVRDSGHRG YSGSQASDNE GHSEDSDTQS VSAHGQAGSH QQSHQESARG RSGETSGHSG
3061 SFLYQVSTHE QSESSHGWTG PSTRGRQGSR HEQAQDSSRH SASQYGQDTI RGHPGSSRGG
```

```
3121 RQGYHHEHSV DSSGHSGSHH SHTTSQGRSD ASRGQSGSRS ASRTTRNEEQ SGDSSRHSVS
3181 RHHEASTHAD ISRHSQAVQG QSEGSRRSRR QGSSVSQDSD SEGHSEDSER WSGSASRNHR
3241 GSVQEQSRHG SRHPRSHHED RAGHGHSADR SRQSGTRHAE TSSGGQAASS HEQARSSPGE
3301 RHGSRHQQSA DSSRHSGIPR GQASSAVRDS RHWGSSGSQA SDSEGHSEES DTQSVSGHGQ
3361 AGPHQQSHQE SARDRSGGRS GRSGSFLYQV STHEQSESAH GRTRTSTGRR QGSHHEQARD
3421 SSRHSASQEG QDTIRGHPGS SRRGRQGSHY EQSVDRSGHS GSHHSHTTSQ GRSDASRGQS
3481 GSRSASRQTR NDEQSGDGSR HSWSHHHEAS TQADSSRHSQ SGQGQSAGPR TSRNQGSSVS
3541 QDSDSQGHSE DSERWSGSAS RNHRGSAQEQ SRDGSRHPTS HHEDRAGHGH SAESSRQSGT
3601 HHAENSSGGQ AASSHEQARS SAGERHGSHH QQSADSSRHS GIGHGQASSA VRDSGHRGSS
3661 GSQASDSEGH SEDSDTQSVS AHGQAGPHQQ SHQESTRGRS AGRSGRSGSF LYQVSTHEQS
3721 ESAHGRAGPS TGGRQGSRHE QARDSSRHSA SQEGQDTIRG HPGSRRGGRQ GSYHEQSVDR
3781 SGHSGSHHSH TTSQGRSDAS HGQSGSRSAS RETRNEEQSG DGSRHSGSRH HEASTQADSS
3841 RHSQSGQGES AGSRRSRRQG SSVSQDSDSE AYPEDSERRS ESASRNHHGS SREQSRDGSR
3901 HPGSSHRDTA SHVQSSPVQS DSSTAKEHGH FSSLSQDSAY HSGIQSRGSP HSSSSYHYQS
3961 EGTERQKGQS GLVWRHGSYG SADYDYGESG FRHSQHGSVS YNSNPVVFKE RSDICKASAF
4021 GKDHPRYYAT YINKDPGLCG HSSDISKQLG FSQSQRYYYY E
```

Domaine central répétitif (en bleu) :

364 arginines (R) / 3234 acides aminés totaux

soit **11,2% d'arginine**

Répétitions :

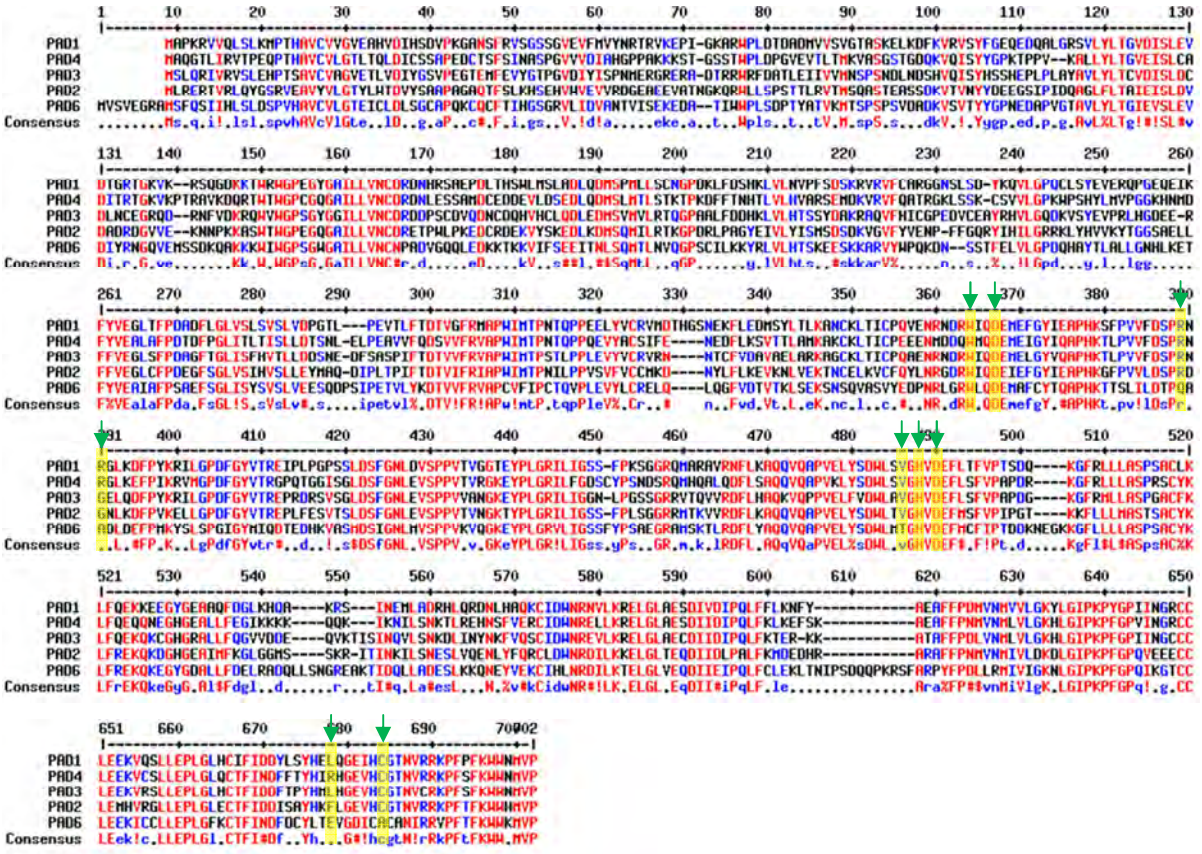
Répétition de FLG	Nombre d'arginines	Nombre total de résidus	% d'arginine
1	36	324	11,1
2	38	324	11,7
3	38	323	11,7
4	38	323	11,7
5	35	324	10,8
6	36	324	11,1
7	32	323	9,9
8	34	323	10,5
9	40	323	12,3
10	37	323	11,5

Les peptides de liaisons sont indiqués en rouge (séquence de référence) et rose (séquence homologue).

On peut noter que le domaine S100 (acides aminés 1-81) contient seulement 1 arginine et le domaine correspondant au « spacer" et à une sous-unité de FLG incomplère (acides aminés 82-468) contient 47 arginines soit 9,9%.

ANNEXE 2

Alignement multiple des séquences peptidiques des PADs humaines



Les acides aminés conservés à plus de 90% sont indiqués en rouge et ceux conservés à plus de 50% sont indiqués en bleu, les autres sont notés en noir. Les gaps insérés lors de l'alignement multiple sont représentés par des tirets. Les acides aminés ayant été impliqués dans le site catalytique de la PAD4 et l'interaction avec le substrat, suite à l'étude cristallographique du complexe PAD4-BAA (Arita *et al.*, 2004), sont indiqués par une flèche verte et surlignés en jaune.

Alignement réalisé en utilisant le logiciel Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin) et les numéros d'accession suivants : NP_037490.2, NP_031391.2, NP_057317.2, NP_036519.2, AAR38850.1 pour les PAD1, 2, 3, 4 et 6 respectivement.

ANNEXE 3

Liste des publications

Pendaries V., Le Lamer M., Cau L., Hansmann B., Malaisse J., Kezic S., Serre G., Simon M. (2015). In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification. ***Cell Death Dis.*** 6, e1656.

Le Lamer M., Pellerin L., Reynier M., Cau, L., Pendaries V., Leprince C., Méchin M.-C., Serre G., Paul C., Simon M. (2015). Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis. ***Biol. Chem.*** 396, 1163–1179.

Méchin M.-C., Cau L., Galliano M.-F., Daunes-Marion S., Poigny S., Vidaluc J.-L., Bessou-Touya S., Takahara H., Serre G., Duplan H., Simon M. (2016). Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis**. *J. Dermatol. Sci.*** 81, 101–106.

Basmanav F. B. Ü., Cau L., Tafazzoli A., Méchin M.-C., Wolf S., Romano M. T., Valentin F., Wiegmann H., Huchenq A., Kandil R., Garcia Bartels N., Kilic A., George S., Ralser D. J., Bergner S., Ferguson D. J. P., Oprisoreanu A.-M., Wehner M., Thiele H., Altmüller J., Nürnberg P., Swan D., Houniet D., Büchner A., Weibel L., Wagner N., Grimalt R., Bygum A., Serre G., Blume-Peytavi U., Sprecher E., Schoch S., Oji V., Hamm H., Farrant P., Simon M., Betz R. C. (2016) Mutations in three genes encoding proteins involved in hair shaft formation cause uncombable hair syndrome. ***Am. J. Hum. Genet.*** 99(6):1292-1304

Actes de congrès

Cau L., Méchin M.-C., Simon M. « Dans un modèle d'épiderme reconstruit humain, la protéolyse de la filaggrine est contrôlée par le taux d'humidité ambiante », **Colloque Protéolyse Cellulaire**, mai 2015, Sète, France. Communication orale sélectionnée. ***Prix des doctorants*** *de la part de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM).*

Cau L., Méchin M.-C., Simon M. « Deimination as a driver of filaggrin breakdown in human epidermis exposed to low humidity », **Society for Cutaneous Ultrastructure Research Meeting (SCUR)**, août 2016, Lyon, France. Communication orale sélectionnée. ***Prix de la meilleure communication orale.***

Cau L., Takahara H., Thompson P., Méchin M.-C., Simon M. « Through deimination, low environmental humidity drives human filaggrin breakdown », **European Epidermal Barrier Research Network (E2BRN)**, septembre 2016, Munich, Allemagne. Communication orale sélectionnée.

Cau L., Takahara H., Thompson P., Méchin M.-C., Simon M. « Through deimination, low environmental humidity drives human filaggrin breakdown », **European Society for Dermatological Research (ESDR)**, septembre 2016, Munich, Allemagne. Présentation par affiche sélectionnée pour le "poster walk".

Cau L., Serre G., Méchin M.-C., Simon M. « In reconstructed human epidermis exposed to dry atmosphere, filaggrin breakdown is driven by deimination: A new step in understanding the role of epidermal barrier defects in Atopic Dermatitis », **European Workshop on Immune Mediated Inflammatory Diseases (EWIMID)**, octobre 2016, Toulouse, France. Présentation orale en tables rondes : "Speed data".

Cau L., Pendaries V., Serre G., Méchin M.-C., Simon M. « Role of peptidylarginine deiminases in the regulation of filaggrin proteolysis », **Skin Physiology International Meeting (SPIM)**, novembre 2016, Vichy, France. Communication orale sélectionnée. ***1er prix Jeune Chercheur.***

Cau L., Pendaries V., Serre G., Méchin M.-C., Simon M. « Dans un modèle d'épiderme humain reconstruit, la protéolyse de la filaggrine est controlée, via sa désimination, par le taux d'humidité ambiante », **Congrès Annuel de la Recherche Dermatologique (CARD)**, décembre 2016, Paris, France. Communication orale sélectionnée.

Autres prix

Aide à la recherche 2014-2015 de la Fondation d'Entreprise SILAB – Jean PAUFIQUE, « Importance de la désimination dans l'homéostasie épidermique ».

ANNEXE 4

L'acéfylline active la désimination de la filaggrine par les peptidyl-arginine désiminases dans la partie supérieure de la couche cornée

Marie-Claire Méchin, Laura Cau, Marie-Florence Galliano, Sylvie Daunes-Marion, Stéphane Poigny, Jean-Louis Vidaluc, Sandrine Bessou-Touya, Hidenari Takahara, Guy Serre, Hélène Duplan et Michel Simon

Article paru dans Journal of Dermatological Science

Résumé :

Les peptidyl-arginine désiminases (PADs) catalysent une modification post-traductionnelle calcium-dépendante, appelée désimination (ou citrullination), qui est impliquée dans divers processus physiologiques et dans des maladies humaines, telles que la polyarthrite rhumatoïde et le cancer. La désimination de la filaggrine (FLG) par les PADs 1 et 3 durant les étapes tardives de la différenciation kératinocytaire est un événement crucial pour la fonction et l'homéostasie de l'épiderme. Elle permet la dégradation complète de la FLG, conduisant à la production d'acides aminés libres et leurs dérivés, qui sont essentiels pour la photoprotection et l'hydratation de la couche cornée.

L'objectif de cette étude a été d'identifier des activateurs des PADs afin d'augmenter la protéolyse de la FLG.

Pour cela, une large chimiothèque a d'abord été analysée *in silico*, puis en utilisant un test automatisé consistant en une mesure colorimétrique indirecte de l'activité d'une PAD recombinante humaine. Des activateurs potentiels ont ensuite été validés en utilisant la FLG humaine recombinante en tant que substrat, puis en les appliquant sur la surface d'épidermes reconstruits humains tridimensionnels.

Les données obtenues après criblage ont mis en évidence certains dérivés de xanthine comme activateurs potentiels des PADs. Parmi 7 dérivés de xanthine testés entre 50 et 300 µM, la caféine, la théobromine et l'acéfylline ont démontré une meilleure efficacité activatrice sur la désimination *in vitro* de la FLG par la PAD1 et la PAD3. Après application topique d'une formulation contenant 3% d'acéfylline sur la surface d'épidermes reconstruits, des analyses en western blot et en immunofluorescence indirecte ont respectivement montré une augmentation de la quantité totale de protéines désiminées et une augmentation de la désimination au niveau de la couche cornée. Ceci démontre l'activation des PADs dans les cellules vivantes par l'acéfylline.

En tant qu'activateur des PADs, l'acéfylline sera utile pour étudier le rôle de la désimination et pourrait servir, dans une formulation dermo-cosmétique, à stimuler ou corriger l'hydratation de la couche cornée de l'épiderme.

Journal of Dermatological Science xxx (2015) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: www.jdsjournal.com

Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis

Marie-Claire Méchin[a,b,c], Laura Cau[a,b,c], Marie-Florence Galliano[d], Sylvie Daunes-Marion[d], Stéphane Poigny[d], Jean-Louis Vidaluc[d], Sandrine Bessou-Touya[d], Hidenari Takahara[e], Guy Serre[a,b,c], Hélène Duplan[d], Michel Simon[a,b,c,*]

[a] Paul Sabatier University (UPS), Toulouse, France
[b] Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR5165, Toulouse, France
[c] Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), U1056, Toulouse, France
[d] Centre de Recherche & Développement Pierre Fabre Dermo-Cosmétique et Médicament, Toulouse, France
[e] Ibaraki University, Ibaraki, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 July 2015
Received in revised form 5 October 2015
Accepted 13 November 2015

Keywords:
Xanthine
Skin
Filaggrin
Post-translational modification
Epidermal barrier

ABSTRACT

Background: Peptidylarginine deiminases (PADs) catalyze deimination (or citrullination), a calcium-dependent post-translational modification involved in several physiological processes and human diseases, such as rheumatoid arthritis and cancer. Deimination of filaggrin (FLG) by PAD1 and PAD3 during the last steps of keratinocyte differentiation is a crucial event for the epidermis function and homeostasis. This allows the complete degradation of FLG, leading to the production of free amino acids and their derivatives that are essential for epidermal photoprotection and moisturizing of the *stratum corneum*.
Objective: To increase the flux of this catabolic pathway, we searched for activators of PADs.
Methods: A large chemical library was screened first *in silico* and then by using an automated assay based on an indirect colorimetric measurement of recombinant human PAD activity. Potential activators were then confirmed using a recombinant human FLG as a substrate, and secondly after topical application at the surface of three-dimensional reconstructed human epidermis.
Results: The data obtained after the library screening pointed to xanthine derivatives as potential PAD activators. Among seven xanthine derivatives tested at 50–300 μM, caffeine, theobromine and acefylline proved to be the most potent enhancers of *in vitro* deimination of FLG by PAD1 and PAD3. After topical application of a gel formulation containing 3% acefylline at the surface of reconstructed epidermis, immunoblotting analysis showed an increase in the total amount of deiminated proteins, and confocal microscopy showed an enhanced deimination in the *stratum corneum*. This demonstrated the activation of PADs in living cells.
Conclusion: As a PAD activator, acefylline will be useful to study the role of deimination and could be proposed to increase or correct the hydration of the cornified layers of the epidermis.
© 2015 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Deimination (or citrullination) is a calcium-dependent post-translational modification of proteins involved in physiological processes, such as epidermal differentiation, inflammation, regulation of gene expression and also in severe human diseases such as rheumatoid arthritis, neurodegenerative diseases and cancer [1–4]. It corresponds to the transformation by a peptidylarginine deiminase (PAD) of a positively charged arginyl residue into a neutral citrullyl residue. This resulting loss of charge induces conformational changes of the substrates and therefore potentially modifies their interactions, structure and function. Several substrates, especially structural proteins, have already been identified (e.g. the α and β chains of fibrin, myelin basic protein, vimentin, histones H2A, H3 and H4). Five PAD isotypes (PAD1–4 and 6), encoded by five distinct genes clustered at 1p35–36 in the

Abbreviations: FLG, filaggrin; LUT, lookup table; PAD, peptidylarginine deiminase.

* Corresponding author at. UDEAR CNRS-UPS UMR5165, Place du Dr Baylac, CHU Purpan TSA40031, 31059 Toulouse Cedex, France. Fax: +33 56149 9036.
E-mail address: michel.simon@udear.cnrs.fr (M. Simon).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.006
0923-1811/© 2015 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: M.-C. Méchin, et al., Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis, J Dermatol Sci (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.006

human genome [5], have been characterized. Each displays a specific pattern of tissue expression [5].

In the epidermis, three isoforms of PAD are expressed, namely PAD1–3. Filaggin (FLG) is one of the substrates of PAD1 and PAD3 [6–8]. FLG is a protein essential to epidermal homeostasis. Nonsense mutations of its gene cause *Ichthyosis vulgaris* and are the main genetic risk factor for Atopic dermatitis (atopic eczema). These two frequent human diseases are associated with cutaneous dryness [9–11]. Silencing its expression in reconstructed human epidermis profoundly affects keratinocyte differentiation and the barrier function of the *stratum corneum* [12,13]. Absence of filaggrin in $Flg^{-/-}$ newborn mice induces dry scaly skin, and fragility and increased permeability of the*stratum corneum* [14]. At the molecular level, FLG interacts with and facilitates the aggregation of keratin intermediate filaments. It is partly cross-linked to a resistant pericellular structure called the cornified cell envelope. Finally, its complete proteolysis in the outer *stratum corneum* leads to the production of free amino-acids and two of their derivatives, i.e., pyrrolidone carboxylic and trans-urocanic acids, which are crucial for moisturizing the *stratum corneum* and for skin photo-protection, respectively [12,13,15–17]. Deimination of FLG improves its degradation, probably by promoting its detachment from the aggregated keratins and changes in its structure [18,19]. Therefore, in order to control *stratum corneum* moisturization, photo-protection of the skin and epidermal homeostasis through the FLG metabolism, it could be relevant to increase PAD1 and/or PAD3 activity in the epidermis.

In order to identify PAD1 and PAD3 activators, three successive assays were performed. Firstly, a large library of chemical compounds was screened*in silico*. Secondly, the selected candidates were tested using automated PAD activity assays *in vitro*. Thirdly, the best hits were confirmed using an *in vitro* FLG deimination assay. Finally, topical applications of gel formulations on three-dimensional reconstructed human epidermis (RHE) were used to demonstrate that acefylline increased deimination in the *stratum corneum*.

2. Materials and methods

2.1. Material and chemicals

Purified recombinant human PAD1 and PAD3 (active forms without any tag), and purified recombinant human FLG (FLG-His) were produced and purified as previously described [6,19,20]. Dimethyl sulfoxide (DMSO), streptomycin, STI, trypsin and its synthetic substrate BAPNA were purchased from Sigma–Aldrich (L'Isle-d'Abeau Chesnes, France). Trypsin was used in a 100 mM Hepes buffer pH 7.5 (Sigma–Aldrich). The irreversible inhibitor of serine proteases, 4-(2-aminoethyl)-benzene-sulfonyl-fluoride-hydrochloride (AEBSF) was from Fisher Scientific (Illkirch, France). Deimination reactions were performed in conical bottomed 96-well microplates (ABgene, Thermo Fisher Scientific) and final optical densities were measured in clear flat bottomed 96-well microplates (Nunc, Thermo Fisher Scientific). The EpMotion® 5075 TMX automated pipetting system (Eppendorf, France) was used under the control of the Ep Blue ID software (Eppendorf). Caffeine, theobromine, acefylline and its TEA- and Na-salts were obtained from the Pierre Fabre Medicament Library of pure compounds. Acefylline TEA- and Na-salts were synthetized as previously described [21].

2.2. Antibodies

AHF11, a specific murine monoclonal antibody directed to human filaggrin was used as previously described [8]. The anti-modified citrulline (AMC) antibodies were used at 0.08 μg/mL for Western blotting and 0.2 μg/mL for immunohistology, as previously described [22,23]. Negative controls were performed with 3-h incubations at 37 °C with ultra-pure water instead of the chemical modification buffer normally used before AMC detection. The anti-tetra-His (Qiagen, Hilden, Germany) antibody was used at 0.10 μg/mL in Western blot experiments. An anti-actin monoclonal antibody (clone C4) was from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Horseradish peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (H + L) from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA) were used at 1/10,000 for Western blotting analysis with the ECL detection kit from GE Healthcare Europe (Velizy-Villacoublay, France). Horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG (H + L) from Southern Biotech (Birmingham, USA) was used at 1/10,000 for histochemistry with 3,3′-diaminobenzidine (Dako France, Les Ullis, France) as the chromogenic substrate. The Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit IgG (H + L) from Invitrogen Life Technologies (Saint Aubin, France) was diluted to 1/1000 to perform confocal microscopy.

2.3. Automated indirect screening of PAD modulators

An indirect PAD activity assay (named indirect STI-trypsin assay) was derived from previously published reports [7,8,24,25], miniaturized using conical bottomed 96-well microplates and set up on the EpMotion® 5075 TMX automated pipetting system (Supplementary information Fig. S1). It was based on a two steps procedure. Firstly, PAD1 or PAD3 (40 mU for each test) were incubated for 30 min at 37 °C in 20 μL of deimination buffer (100 mM Hepes buffer pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$ and 5 mM DTT) containing the Kunitz soybean trypsin inhibitor (STI) as the substrate and either a selected compound in 1% DMSO or 1% DMSO alone (as the control). The deimination reaction was stopped by the addition of EDTA at 10 mM. Secondly, 2.5 μg of trypsin and 400 μM of its synthetic substrate, Nα-benzoyl-arginine-*p*-nitro-anilide (BAPNA), were added. A second incubation was performed for 30 min at 37 °C. Cleavage of BAPNA produced yellow colored *p*-nitro-aniline. Trypsin activity was stopped by the addition of AEBSF to reach a final concentration of 2 mM. Finally, the amount of produced *p*-nitro-aniline was quantified at 405 nm. Difference in absorbance was related to the effect of the tested compound on PAD activity: increased deimination of STI reduced its inhibitory action on trypsin and therefore induced an enhancement of the absorbance whereas decreased deimination of STI induced a higher trypsin inhibition and therefore a decrease of the absorbance. Each assay was performed in triplicate.

2.4. Screening of PAD modulators with a direct FLG-deimination assay

Modulation of PAD1 and PAD3 activities was measured using purified human recombinant FLG-His as a substrate, as previously described [8], in the presence of 50 and 200 μM of the various compounds, especially xanthine derivatives (Supplementary information Table S1), or with the corresponding vehicle (1% DMSO or ultra-pure water) as a control. Each potent modulator was directly added into the reaction mixture containing 100 ng of Fil-His and 40 mU of PAD1 or PAD3. After incubation at 37 °C, samples were separated by SDS-PAGE, electrotransferred onto nitrocellulose membranes, and immunodetected, as previously described [8], with AHF11 (0.40 μg/mL), AMC and anti-tetra-His antibodies. The intensity of the immunodetection signals was quantified using ImageJ 1.48c (National Institutes of Health).

2.5. Analysis of the effect of a topical application on RHEs of formulations containing xanthine derivatives

RHEs (0.33 cm^2) were produced as previously described [26]. At day 14, they were topically treated for 24 h with 5 mg/cm^2 of

Please cite this article in press as: M.-C. Méchin, et al., Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis, J Dermatol Sci (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.006

aqueous gel formulations with or without 3% of either Na-acefylline or TEA-acefylline salts (Supplementary information Table S2). Total proteins of one half of each RHE were extracted in 100 μL of Laemmli buffer. After boiling for 5 min, they were analyzed by Western blotting. Using imageJ software, the intensity of immunoreactivities was quantified, normalized to actin and expressed in comparison with controls. The second half of each RHE was included in Tissue-Tek® OCT compound (Sakura, Villeneuve Dasq, France), and 6-μm cryosections were analyzed by immunohistochemistry and indirect immunofluorescence, as previously described [7]. Sections were observed on a Nikon eclipse 80i microscope equipped with a Nikon DXM 1200C digital camera and NIS image analysis software (Nikon, Tokyo, Japan). Immunofluorescence was acquired on a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystemes, Nanterre, France) and quantified. Briefly, using the same acquisition gain for each sample (3 areas from 3 experiments) a set measurement was performed using an "adjust-set threshold" at a minimum of 20 and a maximum of 255. Fluorescence intensity was expressed as the mean grey value ± sem for control RHE or treated RHE. For visual representation the intensity of the fluorescence signals was coded as a color gradient with a 16-colors lookup table (LUT), using the ImageJ software.

2.6. Statistical analysis

Statistical differences were determined using student *t*-tests. A p value < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. In silico screening of a chemical library

In order to identify activators of PAD1 and PAD3, we screened the large Pierre Fabre Medicament Library of chemical compounds. To reduce the number of compounds to be tested experimentally, a first *in silico* screening was performed based on the structural backbones derived from synthetic substrates (e.g., benzoyl-arginine ethyl ester (BAEE)) or inhibitors (the pan inhibitors Cl-amidine or EDTA) of the enzymes known in the literature [27–32]. We also selected compounds representative of the structural variability of the whole library. In this way, 211 molecules were preselected.

3.2. Development of an automated assay to measure PAD activity, and identification of PAD1 and PAD3 potential activators

Next, to identify the best potential modulators of PAD1 and PAD3, a simple, robust colorimetric PAD assay reproducible *in vitro* was developed, miniaturized and automated (Supplementary Fig. S1A). We took advantage of the fact that deimination inactivates STI, a trypsin inhibitor [24]. Full trypsin activity produced an OD of 0.83. In the presence of STI, trypsin was almost completely inhibited, with a residual OD of 0.15. When STI was preincubated in the presence of either human PAD1 or human PAD3, produced as recombinant forms, the trypsin activity increased. We fixed conditions in such a way as to be able to recognize either an inhibition or an activation of the PADs, when STI was deiminated in the presence of a tested compound (Supplementary Fig. S1B).

Three successive screenings of the selected compounds were performed using this so called indirect STI-trypsin assay. The molecules were used at 5 mM or 50 μM depending on their solubility in DMSO. At each round, a compound was selected if PAD1 and/or PAD3 activity was activated by at least 20%. At the end, eight potential activators were identified. Among them, one of the best candidates was the compound 80959, a xanthine derivative (its chemical structure is indicated in the Supplementary Table S1). Both PAD1 and PAD3 activity was increased by a factor of 2. Dose-effect analysis, between 0.78 and 50 μM, clearly confirmed the activation of the two isoforms, with an effective concentration (EC50) around 10 μM (Fig. 1).

3.3. Activation of PAD1 and PAD3 by caffeine, theobromine and acefylline, alone or in combinations

Since the aim of this work was to identify PAD1 and PAD3 activators with the objective of increasing FLG deimination in a cosmetic/dermatological formulation, we then tested the effect of compound 80959 on the deimination of a recombinant form (FLG-His) of the physiological substrate human FLG. Based on the similarity of their structure to this compound, we also tested six other molecules of the xanthine family (Supplementary Table S1A), especially the well-known caffeine. As a control modulator and since no available activator was known, we used streptomycin, a known inhibitor of PAD4 with an IC50 of 1.8 ± 0.3 mM [33].

In the absence of any additives and as previously described [8], the non-deiminated FLG-His was immunodetected on Western blotting by AHF11, a FLG-specific monoclonal antibody, as a band around 40 kDa (Fig. 2A). After incubation with a PAD, the fully deiminated protein corresponded to a band around 70 kDa, and intermediate forms showed up as an immunodetected smear between 40 and 70 kDa. These deiminated forms were immunodetected by the anti-modified citrulline antibody AMC.

We observed efficient inhibition of PAD1 and PAD3 by streptomycin (data not shown). Surprisingly and for unexplained reasons, in this assay compound 80959 appeared to be an inhibitor

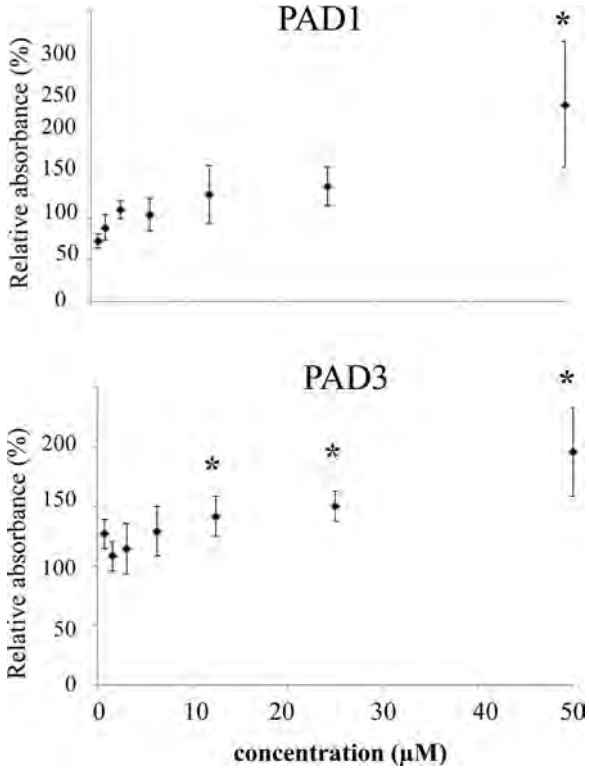


Fig. 1. Activation of PAD1 and PAD3 by a xanthine derivative. The indirect STI-trypsin assay was used to test the effect on PAD1 and PAD3, as indicated, of the compound 80959 used at different concentrations (from 50 to 0.78125 μM) in 1% DMSO. The absorbance values were normalized to that obtained in the presence of DMSO only. Each assay was done in triplicate. Significant p-values (<0.05) are indicated by an asterisk.

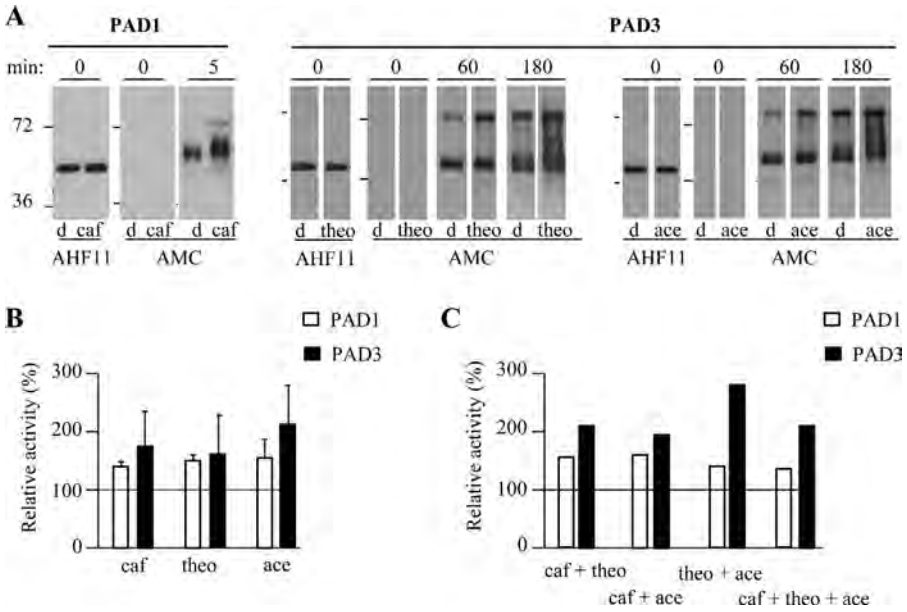


Fig. 2. Activation of PAD1 and PAD3 by caffeine, theobromine and acefylline in a direct assay using FLG. (A) Purified recombinant FLG-His was incubated with PAD1 and PAD3, as indicated, for various lengths of time (5, 60 or 180 min) in the presence of caffeine (caf) diluted to 50 μM in DMSO, of theobromine (theo) at 200 μM, of acefylline (ace) at 200 μM and in DMSO alone (d). Times of incubation were chosen in function of the relative efficacy of each PAD, in order to be in suboptimal conditions. The reaction products were then analyzed by Western blotting with the AHF11 monoclonal antibody specific for FLG and with an antibody directed to modified citrullines (AMC). Representative blots are shown. Unmodified FLG is detected by AHF11 as a ~40 kDa protein, indicating equal loading, but not by AMC. Deimination induces a progressive increase in the apparent molecular mass of FLG, up to 75 kDa, and its detection by AMC. Molecular mass markers are indicated in kDa on the left. (B) Similar experiments were performed in triplicates with the three chemicals diluted to 312.5 μM in ultra-pure water or with water alone. Blots were then scanned and immunodetection intensities quantified. Mean relative immunodetection intensities and sem are indicated. (C) Recombinant FLG and PADs were incubated with a combination of the indicated compounds, each at 312.5 μM in ultra-pure water, and relative immunodetection intensities are given.

of both enzymes. As compared to the deimination of FLG in the presence of the vehicle alone, the most potent activators proved to be caffeine, theobromine and acefylline (Supplementary Table S1 and Fig. 2A). As evaluated by image J quantifications of the immunoreactive bands, in the presence of one of the three xanthine derivatives, the activities of PAD1 and PAD3 increased around 1.5 and 2 times, respectively (Fig. 2B). Furthermore, the three xanthine derivatives used in combinations activated PAD1 and PAD3 with comparable effects (Fig. 2C). In contrast, other xanthine derivatives used at the same concentration range (50 or 300 μM), paraxanthine and hydroxy-ethyl-theophylline, had no clear effect on PAD1 or PAD3 activity.

3.4. Increased amounts of deiminated proteins in RHEs topically treated with acefylline-salted formulations

Since acefylline appeared as the best molecule to activate PAD1 and PAD3 *in vitro*, it was used for subsequent experiments. We first showed that acefylline did not display cytotoxic effects when added at concentrations between 50 and 300 μM in the culture medium of human keratinocytes (Supplementary Fig. S2A). Then, an assay was designed to confirm its activating effect using RHEs as a model. After 14 days of culture at the air-liquid interface of normal human keratinocytes, morphologically differentiated RHE were obtained with proper expression of differentiation markers, including FLG, and a functionally competent *stratum corneum*, as already reported [12,26]. The RHEs were topically treated for 24 h with an aqueous gel. The formulations of the control gel (vehicle) or gels containing (3%w/w) acefylline salts, either Na-acefylline or tri-ethanol-amine (TEA)-acefylline, are given in Supplementary Table S2. The morphology of the treated RHE (data not shown) as well as the cell viability evaluated with the MTT assay (Supplementary Fig. S2B) were not altered confirming the absence of cytotoxic effects. Deimination was then characterized by Western blotting analysis of total protein extracts (Fig. 3A and B), immunohistochemistry (not illustrated) and indirect immunofluorescence (Fig. 3C and D) using the AMC antibody.

Deiminated proteins were detected in the protein extracts and in the *stratum corneum* of the RHEs treated with the control formulation. The labeling was specific to this layer. This demonstrated for the first time that deimination occurs in RHEs with a similar pattern as in normal human epidermis *in vivo* [1,22]. As expected, the amount of deiminated proteins was higher after treatment of the RHEs with acefylline salts, as compared to control (Fig. 3A). After quantification, the amount was found increased by a factor of 1.3 ± 0.35 for TEA-acefylline and 2.38 ± 0.55 for Na-acefylline. Only the effect of Na-acefylline was shown to be statistically significant (Fig. 3B, $p = 0.0437$). Immunohistochemical analysis confirmed the effect of Na-acefylline on RHEs at the *stratum corneum* level (data not shown). Deiminated proteins were then detected and quantified using indirect immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 3C and D). As illustrated on a LUT-16 color representation, the labeling seemed to be more intense after treatment of the RHEs with Na-acefylline (Fig. 3C). The detection was specific since no labeling was observed in the absence of chemical modification of citrullines (data not shown). Quantification of the immunodetection confirmed the enhancement of citrulline detection after Na-acefylline treatment of the RHE as compared to controls ($p = 0.0308$ Fig. 3D).

To the best of our knowledge, only one publication has reported about PAD activation apart from increased intracellular calcium concentration. The zeta isoform of Protein Kinase C appeared to activate PAD4 and the formation of neutrophil extracellular traps [34]. The effect of PAD4 phosphorylation is unknown but it may control the nuclear localization of PAD4 or change its conformation. Similarly, the mechanisms by which acefylline stimulates PAD1/3 activity is not known. On the other hand, discovery of PAD inhibitors is a very active field of research [30–32,33,35–40]. In fact

Please cite this article in press as: M.-C. Méchin, et al., Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis, J Dermatol Sci (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.006

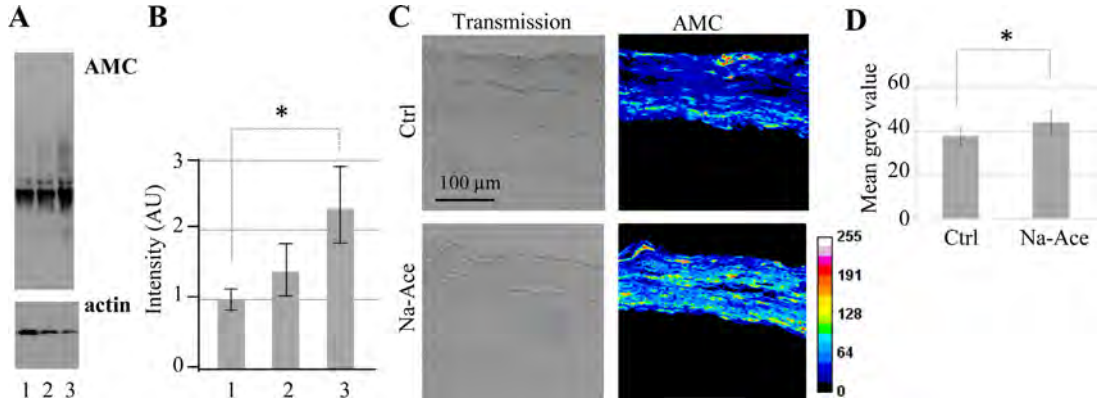


Fig. 3. Activation of protein deimination in RHEs treated with a gel containing acefylline salts. (A–D) RHEs were topically treated for 24 h with an aqueous gel without any acefylline salts (1; Ctrl) or containing 3% of either TEA-acefylline (2) or Na-acefylline (3; Na-Ace). (A and B) Total protein extracts were prepared and immunodetected with the AMC antiserum and with an anti-actin monoclonal antibody. (A) Representative blots. (B) Immunodetected deiminated proteins were quantified and relative intensities are indicated in arbitrary units (AU). *, $p = 0.0437$. (C and D) Cryosections of the RHEs were analyzed by indirect immunofluorescence with the AMC antibody and a confocal microscope. Representative images are shown (C), with the intensity of fluorescence transformed to a color gradient (as depicted) using ImageJ software (right panel), and quantified fluorescence intensities ($n = 3$) were reported as mean ± sem (D). *, $p = 0.0308$.

PAD4 or PAD2 inhibitors have been proposed as antineoplastic agents, especially in breast cancer; they may also reduce the production of targets for anti-citrullinated proteins autoantibody in rheumatoid arthritis, decrease disease severity in ulcerative colitis and multiple sclerosis, and regulate excessive extracellular trap formation by innate immunity-related cells in several diseases such as vasculitis, lupus and sepsis. For example, reversible PAD4-specific inhibitors have recently been characterized [38]. The 7-amino-quinoline-5,8-dione scaffolds of many of these inhibitors interact with the active site of the enzymes, being critical for PAD inhibition [41]. The specificity of the inhibitors should be carefully considered to avoid possible induction of dry skin as a secondary effect of inhibition of filaggrin deimination by PAD1/3 in the epidermis.

Little is known about the biological effects of acefylline, in particular in the skin. It is considered as a phosphodiesterase inhibitor. It has been shown that phosphodiesterases, including subtypes 4 and 6, are expressed in the epidermis and that topical application of phosphodiesterase inhibitors on the skin is not toxic [42]. In addition, phosphodiesterase 4 inhibitors, topically applied, have been shown to improve the lesions of Atopic dermatitis patients [43], and to reduce itching in mice [44]. Here, we show for the first time, to our knowledge, that acefylline is a potent activator of PAD1 and 3. Several studies have pointed out that caffeine consumption has inhibitory effects against UVB-induced skin cancer in mice, and non-melanoma skin cancer in humans. Mechanism studies in mouse skin indicated that caffeine inhibits the formation of thymine dimers and enhances UVB-induced apoptosis [45]. Our data support the idea that caffeine may exert its activity through enhanced formation from FLG of trans-urocanic acid, a natural UVB filter.

In conclusion, for the first time, we have identified acefylline as a PAD activator acting both *in vitro* on recombinant human PAD1 and PAD3, and *in cellulo* on proteins of RHEs used as a three-dimensional model. It could be useful as a research tool to increase PAD activity and study the role of deimination in human epidermis. Further investigation of its biological effects is necessary to envisage acefylline as a cosmetic/therapeutic agent to reduce skin dryness.

Conflicts of interest

The authors declare the following competing financial interest (s): MFG, SDM, SP, JLV, SBT and HD are employees of Pierre Fabre Dermo-Cosmétique. A patent (FR2973704; WO 2012/140095A1) deposited by Pierre Fabre Dermo-Cosmétique has recently been granted.

Acknowledgments

We thank Renan Destrade and Carole Pons for their technical expertise and help with the histology and Western blotting experiments, Françoise Rolland (PFDC Péraudel-Castres) for preparing the chemical library compounds, Sophie Allart and Astrid Canivet (INSERM UMR 1043, Toulouse, France) for their technical expertise at the cellular imaging facility. MCM is grateful to the staff of the microbiotechnology laboratory of PFDC managed by Pr Thien N'Guyen; in particular to Maëlle Bilous for her technical assistance in the use of the EpMotion® automated pipetting system 5075 TMX and in defining the EpMotion program. This work was supported by grants from the French National Center for Scientific Research (CNRS), Toulouse University, the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), and Pierre Fabre Dermo-Cosmétique.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.006.

References

[1] M.-C. Méchin, M. Sebbag, J. Arnaud, R. Nachat, C. Foulquier, V. Adoue, F. Coudane, H. Duplan, A.-M. Schmitt, S. Chavanas, M. Guerrin, G. Serre, M. Simon, Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases, Int. J. Cosmet. Sci. 29 (2007) 147–168.
[2] T. Loos, A. Mortier, P. Proost, Isolation, identification, and production of posttranslationally modified chemokines, Methods Enzymol. 46 (2009) 13–29.
[3] Z. Baka, B. György, P. Géher, E.I. Buzás, A. Falus, G. Nagy, Citrullination under physiological and pathological conditions, Joint Bone Spine 79 (2012) 431–436.
[4] P. Tessarz, T. Kouzarides, Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15 (2014) 703–708.
[5] S. Chavanas, M.-C. Méchin, H. Takahara, A. Kawada, R. Nachat, G. Serre, M. Simon, Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6, Gene 330 (2004) 19–27.
[6] M. Guerrin, A. Ishigami, M.-C. Méchin, R. Nachat, S. Valmary, M. Sebbag, M. Simon, T. Senshu, G. Serre, cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I, Biochem. J. 370 (Pt. 1) (2003) 167–174.

[7] R. Nachat, M.-C. Méchin, H. Takahara, S. Chavanas, M. Charveron, G. Serre, M. Simon, Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin, J. Invest. Dermatol. 124 (2005) 384–393.
[8] M.-C. Méchin, M. Enji, R. Nachat, S. Chavanas, M. Charveron, A. Ishida-Yamamoto, G. Serre, H. Takahara, M. Simon, The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations, Cell Mol. Life Sci. 62 (2005) 1984–1995.
[9] C.N. Palmer, A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, D.R. Goudie, A. Sandilands, L.E. Campbell, F.J. Smith, G.M. O'Regan, R.M. Watson, J.E. Cecil, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C.S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L.B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, W.H. McLean, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, Nat. Genet. 38 (2006) 441–446.
[10] F.J. Smith, A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, A. Sandilands, L.E. Campbell, Y. Zhao, H. Liao, A.T. Evans, D.R. Goudie, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, C.S. Munro, A. Sergeant, G. O'Regan, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, R.B. Presland, P. Fleckman, W.H. McLean, Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause *ichthyosis vulgaris*, Nat. Genet. 38 (2006) 337–342.
[11] J.P. Thyssen, S. Kezic, Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis, J. Allergy Clin. Immunol. 134 (2014) 792–799.
[12] V. Pendaries, J. Malaisse, L. Pellerin, M. Le Lamer, R. Nachat, S. Kezic, A.-M. Schmitt, C. Paul, Y. Poumay, G. Serre, M. Simon, Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation, J. Invest. Dermatol. 134 (2014) 2938–2946.
[13] M. Mildner, J. Jin, L. Eckhart, S. Kezic, F. Gruber, C. Barresi, C. Stremnitzer, M. Buchberger, V. Mlitz, C. Ballaun, B. Sterniczky, D. Födinger, E. Tschachler, Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model, J. Invest. Dermatol. 130 (2010) 2286–2294.
[14] H. Kawasaki, K. Nagao, A. Kubo, T. Hata, A. Shimizu, H. Mizuno, T. Yamada, M. Amagai, Altered *stratum corneum* barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice, J. Allergy Clin. Immunol. 129 (2012) 1538–1546.
[15] A. Sandilands, C. Sutherland, A.D. Irvine, W.H. McLean, Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease, J. Cell Sci. 122 (2009) 1285–1294.
[16] L. Eckhart, S. Lippens, E. Tschachler, W. Declercq, Cell death by cornification, Biochim. Biophys. Acta 1833 (2013) 3471–3480.
[17] C.R. Harding, S. Aho, C.A. Bosko, Filaggrin—revisited, Int. J. Cosmet. Sci. 35 (2013) 412–423.
[18] Y. Kamata, A. Taniguchi, M. Yamamoto, J. Nomura, K. Ishihara, H. Takahara, T. Hibino, A.A. Takeda, Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids, J. Biol. Chem. 284 (2009) 12829–12836.
[19] C.-Y. Hsu, J. Henry, A.-A. Raymond, M.-C. Méchin, V. Pendaries, D. Nassar, B. Hansmann, S. Balica, O. Burlet-Schiltz, A.-M. Schmitt, H. Takahara, C. Paul, G. Serre, M. Simon, Deimination of human filaggrin-2 promotes its proteolysis by calpain 1, J. Biol. Chem. 286 (2011) 23222–23233.
[20] T. Kanno, A. Kawada, J. Yamanouchi, C. Yosida-Noro, A. Yoshiki, M. Shiraiwa, M. Kusakabe, M. Manabe, T. Tezuka, H. Takahara, Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin, J. Invest. Dermatol. 115 (2000) 813–823.
[21] M.-T. Trebosc, G. Mouzin, H. Cousse. Topical slenderizing formulation containing cafeine carboxylic acid derivatives neutralized by organic bases, preparation thereof, and their use in the treatment of cellulite. US Patent US5030451 (1991).
[22] T. Senshu, K. Akiyama, S. Kan, H. Asaga, A. Ishigami, M. Manabe, Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues, J. Invest. Dermatol. 105 (1995) 163–169.
[23] R. Nachat, M.-C. Méchin, M. Charveron, G. Serre, J. Constans, M. Simon, Peptidylarginine deiminase isoforms are differentially expressed in the anagen hair follicles and other human skin appendages, J. Invest. Dermatol. 125 (2005) 34–41.
[24] H. Takahara, H. Okamoto, K. Sugawara, Specific modification of the functional arginine residue in soybean trypsin inhibitor (Kunitz) by peptidylarginine deiminase, J. Biol. Chem. 260 (1986) 8378–8383.
[25] J.A. Gossen, P. Van Den Boogaart. Peptidylarginine deiminase 6. Patent WO02090531 (2002).
[26] B. Guiraud, H. Hernandez-Pigeon, I. Ceruti, S. Mas, Y. Palvadeau, C. Saint-Martory, N. Castex-Rizzi, H. Duplan, S. Bessou-Touya, Characterization of a human epidermis model reconstructed from hair follicle keratinocytes and comparison with two commercially models and native skin, Int. J. Cosmet. Sci. 36 (2014) 485–493.
[27] M. Fujisaki, K. Sugawara, Properties of peptidylarginine deiminase from the epidermis of newborn rats, J. Biochem. 89 (1981) 257–263.
[28] L.B. Pritzker, M.A. Moscarello, A novel microtubule independent effect of paclitaxel: the inhibition of peptidylarginine deiminase from bovine brain, Biochim. Biophys. Acta 1388 (1998) 154–160.
[29] E.M. Stone, W. Fast, A continuous spectrophotometric assay for dimethylarginine dimethylaminohydrolase, Anal. Biochem. 343 (2005) 335–337.
[30] Y. Luo, B. Knuckley, M. Bhatia, P.J. Pellechia, P.R. Thompson, Activity-based protein profiling reagents for protein arginine deiminase 4 (PAD4): synthesis and *in vitro* evaluation of a fluorescently labeled probe, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 14468–14469.
[31] Y. Luo, K. Arita, M. Bhatia, B. Knuckley, Y.H. Lee, M.R. Stallcup, M. Sato, P.R. Thompson, Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization, Biochem. 45 (2006) 11727–11736.
[32] B. Knuckley, C.P. Causey, J.E. Jones, M. Bhatia, C.J. Dreyton, T.C. Osborne, H. Takahara, P.R. Thompson, Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3, Biochem. 49 (2010) 4852–4863.
[33] B. Knuckley, Y. Luo, P.R. Thompson, Profiling Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4): a novel screen to identify PAD4 inhibitors, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 739–745.
[34] I. Neeli, M. Radic, Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release, Front. Immunol. 4 (38) (2013) .
[35] Y. Wang, P. Li, S. Wang, J. Hu, X.A. Chen, J. Wu, M. Fisher, K. Oshaben, N. Zhao, Y. Gu, D. Wang, G. Chen, Y. Wang, Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity, J. Biol. Chem. 287 (2012) 25941–25953.
[36] S. Lange, E. Rocha-Ferreira, L. Thei, P. Mawjee, K. Bennett, P.R. Thompson, V. Subramanian, A.P. Nicholas, D. Peebles, M. Hristova, G. Raivich, Peptidylarginine deiminases: novel drug targets for prevention of neuronal damage following hypoxic ischemic insult (HI) in neonates, J. Neurochem. 130 (2014) 555–562.
[37] E.E. Witalison, P.R. Thompson, L.J. Hofseth, Protein arginine deiminases and associated citrullination: physiological functions and diseases associated with dysregulation, Curr Drug Targets 16 (2015) 700–710.
[38] H.D. Lewis, J. Liddle, J.E. Coote, S.J. Atkinson, M.D. Barker, B.D. Bax, K.L. Bicker, R. P. Bingham, M. Campbell, Y.H. Chen, C.W. Chung, P.D. Craggs, R.P. Davis, D. Eberhard, G. Joberty, K.E. Lind, K. Locke, C. Maller, K. Martinod, C. Patten, O. Polyakova, C.E. Rise, M. Rüdiger, R.J. Sheppard, D.J. Slade, P. Thomas, J. Thorpe, G. Yao, G. Drewes, D.D. Wagner, P.R. Thompson, R.K. Prinjha, D.M. Wilson, Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation, Nat. Chem. Biol. 11 (2015) 189–191.
[39] D.J. Slade, P. Fang, C.J. Dreyton, Y. Zhang, J. Fuhrmann, D. Rempel, B.D. Bax, S.A. Coonrod, H.D. Lewis, M. Guo, M.L. Gross, P.R. Thompson, Protein arginine deiminase 2 binds calcium in an ordered fashion: implications for inhibitor design, ACS Chem. Biol. 10 (2015) 1043–1053.
[40] B. Jang, H.W. Kim, J.S. Kim, W.S. Kim, B.R. Lee, S. Kim, H. Kim, S.J. Han, S.J. Ha, S.J. Shin, Peptidylarginine deiminase inhibition impairs Toll-like receptor agonist-induced functional maturation of dendritic cells, resulting in the loss of T cell-proliferative capacity: a partial mechanism with therapeutic potential in inflammatory settings, J. Leukoc. Biol. 97 (2015) 351–362.
[41] C.J. Dreyton, E.D. Anderson, V. Subramanian, D.L. Boger, P.R. Thompson, Insights into the mechanism of streptonigrin-induced protein arginine deiminase inactivation, Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 1362–1369.
[42] M. Goto, K. Ikeyama, M. Tsutsumi, S. Denda, M. Denda, Phosphodiesterase inhibitors block the acceleration of skin permeability barrier repair by red light, Exp. Dermatol. 20 (2011) 568–571.
[43] J.M. Hanifin, S.C. Chan, J.B. Cheng, S.J. Tofte, W.R. Henderson Jr., D.S. Kirby, E.S. Weiner, Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro anti-inflammatory effects in atopic dermatitis, J. Invest. Dermatol. 107 (1996) 51–56.
[44] T. Andoh, Y. Kuraishi, Antipruritic mechanisms of topical E6005, a phosphodiesterase 4 inhibitor: inhibition of responses to proteinase-activated receptor 2 stimulation mediated by increase in intracellular cyclic AMP, J. Dermatol. Sci. 76 (2014) 206–213.
[45] A.H. Conney, Y.P. Lu, Y.R. Lou, M. Kawasumi, P. Nghiem, Mechanisms of caffeine-induced inhibition of UVB carcinogenesis, Front. Oncol. 3 (144) (2013) .

Please cite this article in press as: M.-C. Méchin, et al., Acefylline activates filaggrin deimination by peptidylarginine deiminases in the upper epidermis, J Dermatol Sci (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.006

AUTHOR: Laura CAU

TITLE: Importance of deimination in epidermis and hair follicle homeostasis

THESIS SUPERVISORS: Michel SIMON and Hidenari TAKAHARA

DATE AND PLACE OF DEFENSE: January 6th, 2017, Toulouse, France

ABSTRACT:

Peptidylarginine deiminases (PADs) catalyze a post-translational modification, named deimination, corresponding to the transformation of arginine residues into citrulline. So far, their role is still poorly understood even if they have been associated with numerous physiological and pathological processes. In the epidermis and the hair follicle, three PADs are expressed, namely PAD1, 2 and 3. Deimination of filaggrin (FLG), a major protein of epidermal differentiation, would lead to its detachment from keratin filaments and allow its full proteolysis. The resulting free amino acids contribute to the barrier function of the cornified layer, the outmost cellular layer of the epidermis. In the hair follicle, deimination of trichohyalin (TCHH), a FLG-related protein, increases its solubility and improves its crosslinking by transglutaminase 3 (TGase 3) to keratins, contributing to the hair shaft formation. However, the function of PADs during keratinocyte differentiation is incompletely described and their involvements in skin diseases have been poorly investigated.

The objective of my work was to better understand the role of PADs in the metabolism of FLG, and more generally in the epidermis and hair follicle homeostasis.

First of all, I demonstrated that a major step in the metabolism of human FLG is its deimination by PAD1 and/or PAD3. This regulates its complete degradation according to the external humidity level. For this purpose, I used reconstructed human epidermis (RHEs) as an experimental model. Lowering relative humidity from 95 to 30-50% during RHE generation enhanced FLG proteolysis as well as the resulting amino acid amount. In parallel, PAD1 expression and FLG deimination were highly increased while the expression or activity of proteases known to target FLG did not vary. Moreover, treatment of RHEs during 24 hours with Cl-amidine, a PAD inhibitor, partially blocked the effect of dryness on FLG metabolism.

Then, I investigated whether deimination could play a more general role during keratinocyte differentiation. I treated RHEs with various concentrations of Cl-amidine during 48 hours and I analyzed the effect of treatments on the epidermis morphology. The inhibition of deimination was dose-dependent and not cytotoxic. At the strongest concentration, Cl-amidine was shown to cause thinning of the cornified layer, to highly increase the number of transitional cells and to induce accumulation of mitochondria and vesicles in the cytoplasm of granular keratinocytes. This suggested that cornification, the ultimate stage of keratinocyte differentiation, is slowed down by Cl-amidine treatment. Besides, as the autophagosome marker LC3B-II was up-regulated in Cl-amidine treated RHEs, PAD1 and/or PAD3 could be involved in the cornification-associated process of autophagy.

Finally, I participated in a new collaborative work that led to discover the cause of uncombable hair syndrome, a rare genetic disorder. Mutations of the genes encoding TCHH, PAD3 and TGase 3 were identified in 11 families and were shown to be responsible for the disease. The nonsense mutation in TCHH gene results in the synthesis, if any, of a very short protein, probably not able to interact with keratins. Mutations in PAD3 and TGase3 genes were shown to induce structural changes and almost total absence of activity of the corresponding enzymes. Moreover, examination of Pad3 deficient mice revealed alterations in the hair morphology. These results allowed a better understanding of this hair disease physiopathology and proved that PAD3 is essential for the hair shaft morphogenesis.

KEY WORD: peptidylarginine deiminase, skin, hair, filaggrin, trichohyalin, differentiation

ACADEMIC DISCIPLINE: Structural and functional biology

LABORATORY: Epithelial Differentiation And Rheumatoid Autoimmunity Unit
U1056 INSERM, University of Toulouse 3 Paul Sabatier, FRE3742 CNRS
Toulouse, France

AUTEUR : Laura CAU

TITRE : Importance de la désimination dans l'homéostasie de l'épiderme et du follicule pileux

DIRECTEURS DE THESE : Michel SIMON et Hidenari TAKAHARA

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 6 janvier 2017

RESUME :

Les peptidyl-arginine désiminases (PADs) catalysent une modification post-traductionnelle, appelée désimination, qui correspond à la transformation des résidus arginine en résidus citrulline. À ce jour, leur rôle est encore mal compris, bien qu'elles aient été impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques. Dans l'épiderme et le follicule pileux, trois d'entre elles sont exprimées, les PAD1, 2 et 3. La désimination de la filaggrine (FLG), protéine essentielle de la différenciation épidermique, semble conduire à sa dissociation des filaments de kératines et permettre sa protéolyse totale. Les acides aminés libres ainsi générés sont nécessaires à la fonction de barrière que remplit la couche cornée, couche cellulaire la plus externe de l'épiderme. Dans le follicule pileux, la désimination de la trichohyaline (TCHH), protéine apparentée à la FLG, augmente sa solubilité et permet sa liaison covalente aux kératines par la transglutaminase 3 (TGase 3), ce qui participe à la formation de la tige pilaire. La description du rôle des PADs au cours de la différenciation des kératinocytes est cependant encore incomplète, et leurs implications dans les maladies de peau peu explorée.

L'objectif de mon travail de thèse a été de mieux comprendre le rôle des PADs dans le métabolisme de la FLG et, plus généralement, dans l'homéostasie de l'épiderme et du follicule pileux.

Tout d'abord, j'ai montré que la désimination de la FLG humaine par la PAD1 et/ou 3 est une étape majeure qui permet de réguler sa dégradation complète en fonction du taux d'humidité extérieure. Pour cela, j'ai utilisé comme modèle expérimental des épidermes reconstruits humains (ERHs). La diminution de l'humidité relative lors de leur production, de 95% à 30-50%, augmente la protéolyse de la FLG et la genèse des acides aminés correspondants. En parallèle, l'expression de la PAD1 et le taux de désimination de la FLG sont fortement accrus alors que ni l'expression ni l'activité des protéases impliquées dans cette protéolyse ne varient. De plus, le traitement d'ERHs pendant 24 heures avec un inhibiteur des PADs, le Cl-amidine, bloque en partie l'effet de la sécheresse sur le métabolisme de la FLG.

J'ai ensuite recherché si la désimination joue un rôle plus global au cours de la différenciation des kératinocytes. J'ai traité des ERHs avec différentes concentrations de Cl-amidine pendant 48 heures et analysé l'effet du traitement sur leur morphologie. L'inhibition de la désimination est dose-dépendante et non toxique. À la plus forte concentration, le Cl-amidine entraîne un amincissement de la couche cornée, une augmentation importante du nombre de cellules transitionnelles, et l'accumulation de mitochondries et de vésicules dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux. Ceci permet de proposer que la cornification, dernière étape de la différenciation kératinocytaire, est retardée. De plus, la protéine LC3B-II, marqueur des autophagosomes, étant plus fortement détectée dans les ERHs traités, les PAD1 et/ou 3 pourraient être impliquées dans le processus d'autophagie associé à la cornification.

Enfin, j'ai participé à un nouveau projet collaboratif qui a permis de découvrir l'origine d'une maladie génétique rare, le syndrome des cheveux incoiffables. Des mutations des gènes de la TCHH, de la PAD3 ou de la TGase 3 ont été identifiées dans 11 familles et sont responsables de ce syndrome. La mutation non-sens du gène de la TCHH aboutit à la synthèse, si elle a lieu, d'une forme très courte, probablement incapable d'interagir avec les kératines. Les mutations des gènes de la PAD3 et de la TGase 3 induisent des changements structuraux et une quasi-absence de l'activité des enzymes correspondantes. De plus, les souris dont le gène de la Pad3 a été inactivé présentent des anomalies de la forme des poils. Ces résultats ont permis de comprendre la physiopathologie de cette maladie des cheveux et ont prouvé que la PAD3 est essentielle à leur morphogenèse.

MOTS CLES : peptidyl-arginine désiminase, peau, cheveu, filaggrine, trichohyaline, différenciation

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Biologie structurale et fonctionnelle

LABORATOIRE : Unité Différenciation Epithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde
U1056 INSERM, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, FRE3742 CNRS
Toulouse, France