

Histoire de la peau

Dans le cadre d'une collaboration avec L'Oréal, mes travaux portaient sur l'identification du dégradome de la couche la plus superficielle de la peau. La peau est un organe composé de l'épiderme, tissu majoritairement épithélial, et du derme, tissu de nature conjonctive [121]. Les kératinocytes sont les cellules les plus nombreuses de l'épiderme. Bien qu'il y ait des variations selon les régions anatomiques, la structure de base de la peau demeure toujours la même.

II-C.1. Organisation des cellules de l'épiderme

La fonction principale de la peau est de former une barrière efficace entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. L'épiderme joue à la fois le rôle de barrière physique et de barrière biochimique. La barrière physique est principalement assurée par le *stratum corneum* (couche la plus superficielle de l'épiderme) alors que la barrière biochimique consiste en un ensemble de molécules comme des lipides, des peptides antimicrobiens ou encore des enzymes. Certains auteurs considèrent que la formation du *stratum corneum* est le but ultime de l'épiderme. L'épaisseur moyenne de l'épiderme varie entre 60 et 100µm et peut atteindre 600µm au niveau du *stratum corneum* de la plante des pieds ou de la paume des mains [122]. Il est constitué principalement (90%) de kératinocytes, mais également d'autres cellules (mélanocytes, cellules de Merkel, cellules de Langerhans...). L'épiderme est organisé en différentes couches de cellules dont la structure change en fonction de leur état de différenciation. Ces couches se nomment des plus profondes aux plus superficielles : basale, épineuse, granuleuse et cornée (Figure 14). Au terme de sa différenciation, la cellule est devenue de plus en plus spécialisée et limitée dans ses fonctions. Les cellules de la couche cornée (certes mortes mais protectrices) desquament : elles sont remplacées par d'autres cellules puisqu'en parallèle des cellules basales prolifèrent. Ainsi l'épaisseur du *stratum corneum* reste relativement constante du fait de ces phénomènes de desquamation et de multiplication bien équilibrés.

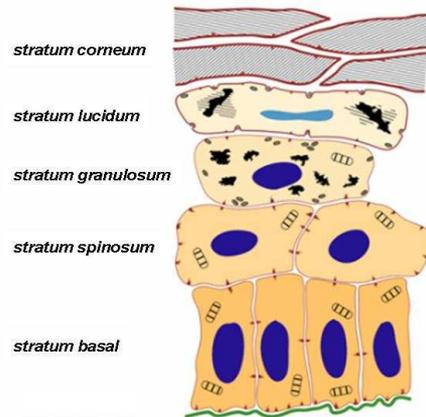


Figure 14 : Schéma de l'épiderme [123].

II-C.1.1. Le stratum basal

La **couche basale (stratum basal)** est formée de cellules en contact avec le derme, dont certaines prolifèrent et donnent naissance aux cellules des couches plus superficielles. La couche basale, composée majoritairement de kératinocytes, possède des cellules peu différenciées (10% des cellules) ainsi que d'autres types cellulaires. Une cellule souche, suite à la mitose, donne naissance à deux cellules identiques : l'une des cellules filles reste dans la couche basale et continue ses cycles de division, l'autre sort du cycle cellulaire pour se différencier. Une fois différenciée en kératinocyte, une cellule basale va, après un temps plus ou moins long, progresser vers la couche supérieure, à savoir la couche épineuse, puis compléter sa différenciation d'une couche à l'autre vers la surface.

La morphologie des cellules basales est d'aspect cubique avec un noyau volumineux. Leur cytosquelette renferme des filaments intermédiaires de kératines [124]. Les filaments de kératines sont reliés aux héli-desmosomes qui ancrent les cellules à la jonction dermo-épidermique et aux desmosomes qui joignent les cellules entre elles.

II-C.1.2. Le stratum spinosum

La **couche épineuse** tire son nom des nombreux desmosomes qui joignent les cellules et qui leur donnent un aspect épineux [125]. Il s'agit d'une couche de plusieurs cellules. Des changements morphologiques sont observables entre les cellules situées plus profondément dans la couche épineuse et celles plus superficielles [121]. Celles localisées plus profondément sont polyédriques avec un gros noyau et peuvent présenter des mitoses. Celles en position plus superficielle, davantage différenciées, présentent un accroissement de leur taille ainsi qu'un aplatissement. Ces cellules sont en synthèse active de protéines en particulier de kératines de types 1 et 10 [124]. Ces cellules plus matures que les cellules basales progressent vers la troisième couche grâce à la poussée des cellules sous-jacentes.

II-C.1.3. Le stratum granulosum

La **couche granuleuse** moins épaisse est constituée de quelques cellules aplaties seulement et forme la dernière couche nucléée de l'épiderme. Les cornéocytes (kératinocytes en fin de différenciation) sont entourés d'une matrice extracellulaire, nommée enveloppe cornée. Les précurseurs de celle-ci font progressivement leur apparition dans le *stratum granulosum*. L'involucrine commence à apparaître dans la couche épineuse et s'accumule dans la couche granuleuse [121]. Il en est ainsi des transglutaminases, enzymes qui catalysent la formation de cette enveloppe protéique dans la couche cornée [126]. La loricrine est un autre constituant majeur de cette enveloppe qui apparaît dans la couche granuleuse [127].

II-C.1.4. Le stratum lucidum

La **couche claire** n'est retrouvée que dans l'épiderme épais de la paume des mains et de la plante des pieds. Il s'agit d'une couche de transition continue entre la couche granuleuse encore métaboliquement active et la couche cornée inerte. Dans les autres sites anatomiques, cette couche n'existe pas.

II-C.1.5. Le stratum corneum

La **couche cornée** est composée de cellules kératinisées (**cornéocytes**) qui proviennent des couches sous-jacentes et qui desquameront une fois leur rôle de protection joué. Avant de devenir inerte et adaptée pour remplir sa fonction de protection, la cellule subit donc une série de modifications. Les organelles cellulaires commencent à disparaître progressivement. La membrane devient perméable et une partie du contenu cytoplasmique fuit. L'espace intercellulaire s'élargit et le volume cytoplasmique décroît. Les organelles cellulaires, incluant le noyau, continuent à être dégradées. La **membrane cytoplasmique disparaît tandis que l'enveloppe cornée s'épaissit**.

Plusieurs protéines ou structures apparues dans la couche granuleuse deviennent fonctionnelles dans la couche cornée. Ces éléments contribuent alors au développement de la fonction barrière, soit le principal rôle de la couche cornée.

Les cornéocytes sont des cellules mortes. A l'exception des filaments de kératine, la presque totalité du contenu cytoplasmique, incluant le noyau et les organelles, est dégradée par diverses enzymes : protéases, hydrolases acides [121]. La membrane cytoplasmique devient perméable, puis le noyau se dégrade. Le cornéocyte se déshydrate et perd ses débris d'organelles dans l'espace intercellulaire par exocytose de sorte que les **amas de kératines** composent alors **80%** du contenu intercellulaire [128].

Avant de desquamer, les cornéocytes s'avèrent bien adaptés pour remplir la fonction barrière et réguler l'hydratation du *stratum corneum*. Ils sont inertes, dotés d'une bonne cohésion et entourés d'une

matrice lipidique : modèle des briques et du mortier [129]. Les lipides intercellulaires et les acides aminés résiduels de la filaggrine, en permettant à la couche cornée et à l'épiderme de conserver leur hydratation, contribuent à maintenir ses propriétés de distension, d'élasticité et, conséquemment, de fonction barrière efficace [130]. Des desmosomes, modifiés appelés cornéodesmosomes, demeurent présents [121]. Plus les **cornéocytes** sont proches de la **surface**, plus les **cornéodesmosomes** vont être **dégradés** sous l'action de différentes **enzymes**. Comme ceux-ci sont responsables en grande partie de la cohésion cellulaire, leur **disparition** conduit à la **desquamation** de ces résidus cellulaires [131].

Aplatis, les cornéocytes sont devenus les plus grandes cellules de l'épiderme.

II-C.2. Constituants du *stratum corneum*

II-C.2.1. Les kératines

Les filaments intermédiaires (FI) forment, avec les microtubules et les microfilaments d'actine, les différentes architectures du cytosquelette. Ces structures jouent toutes un rôle dans le maintien de la forme de la cellule, l'organisation des structures internes et la motilité. Les **kératines** forment une famille protéique qui **compose les FI** : elles sont exprimées exclusivement dans les épithéliums.

Dans cette partie sont rappelées quelques propriétés de ces protéines (profil d'expression, interaction avec les protéines, fonctions).

***a* Expression des kératines**

Les kératines sont des **éléments structuraux majeurs** des cellules épithéliales. Chacun des 49 gènes code pour une protéine unique dont la classification est basée sur l'ordre de leur migration, dans un gel de polyacrylamide en deux dimensions [132].

On distingue **deux classes** de protéines :

- Les kératines de type I **acides** ($pI < 6$) (K9–K23)
- Les kératines de type II **basiques** ($pI > 6$) (K1–K8)

Les protéines d'un type s'associent obligatoirement avec l'autre type et forment des filaments hétérodimériques. Donc, pour qu'une cellule puisse produire des filaments de kératines, elle doit exprimer au moins une kératine de type I et une autre de type II [133].

Le **profil d'expression et de couplage** des différentes kératines est indicateur de fonctions spécialisées et complémentaires de ces protéines au sein des cellules. Par exemple, au niveau de

l'épiderme, les cellules de la couche basale expriment la paire K8/K18. La couche épineuse infrabasale se compose des K5/K14 et, lorsque qu'on remonte vers la couche épineuse suprabasale, il y a un remplacement graduel des K5/K14 par la paire K1/K10 [124, 134]. De plus, la K22 se rajoute au niveau de la couche granuleuse [135]. L'expression de kératine K9 est confinée dans l'épiderme palmo-plantaire [136]. Alors que dans la couche basale, les kératines représentent 30% des protéines totales, elles composent à 80% les cornéocytes du *stratum corneum* [128]. Ainsi, au sein d'un même tissu, les différentes cellules qui le composent peuvent exprimer diverses paires de kératines qui ont des fonctions différentes.

b Les interactions protéines-kératines

Les kératines peuvent interagir avec plusieurs protéines. Par exemple, la **famille des plakines**, relie les filaments intermédiaires aux microfilaments, aux microtubules et/ou à des complexes d'adhésion.

Les plakines incluent notamment la **desmoplakine**, la **plectine**, la **périplakine**, l'**envoplakine** et forment une famille de protéines cytoplasmiques servant de lien entre la membrane et le réseau de FI pour maintenir l'intégrité des tissus. Les **plakines lient les FI via leur extrémité globulaire C-terminale** [137], et sont exprimées plus particulièrement dans les tissus épithéliaux et musculaires subissant un stress mécanique. La desmoplakine peut lier diverses kératines (K5/K14 et K8/K18) et la vimentine [138, 139].

D'autres protéines peuvent aussi se lier aux FI, sans toutefois affecter leur organisation. Plusieurs d'entre elles sont des protéines impliquées dans une ou plusieurs voies de signalisation. Les kératines peuvent se lier directement entre elles, à la protéine kinase C γ [140], l'ARN polymérase II [141]...

c Les fonctions des kératines

Le rôle mécanique des kératines au niveau des épithéliums stratifiés est bien établi. Les mutations mineures dans les kératines ont comme conséquence la plupart des phénotypes ichtyosiques ou bulleux, ce qui prouvent le rôle essentiel de ces protéines dans l'intégrité et la cohésion de l'épiderme. Plusieurs maladies affectant l'épiderme sont dues à des mutations génétiques dans les kératines dont l'*epidermolysis bullosa simplex*. Cette maladie se traduit par une fragilité excessive de la peau à tout contact physique [142]. Les mutations majeures sont, elles, incompatibles avec la vie.

II-C.2.2. Les jonctions cellulaires

a Généralités

Les jonctions intercellulaires peuvent être classées en trois groupes [143] :

- Les jonctions étanches : sites où les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes s'accolent,
- Les jonctions de communication : structures membranaires permettant une communication directe et la transmission de molécules entre cellules,
- Les jonctions d'adhésion : structures permettant l'ancrage des cellules entre elles.

Parmi ces dernières, on peut détailler trois types :

- Les jonctions adhérentes associées aux microfilaments,
- Les **desmosomes** : sites d'adhésion retrouvés principalement dans les cellules épithéliales. Les kératinocytes sont les cellules humaines qui contiennent la plus importante densité de desmosomes sur la surface membranaire,
- Les héli-desmosomes : jonctions situées au niveau des contacts cellules basales-membrane basale. Ces jonctions ont une structure similaire à un demi-desmosome, bien qu'ayant des constituants biochimiques différents.

Dans la suite, nous nous sommes concentrés sur les desmosomes et les cornéodesmosomes qui assurent la cohésion épidermique en jouant le rôle de **Velcro intercellulaire** [144].

b Structure et composition du desmosome et du cornéodesmosome

Les desmosomes (Figure 15) sont des jonctions intercellulaires qui confèrent une **stabilité mécanique** à de nombreux tissus. Ces structures sont plus abondantes dans les zones soumises à un stress mécanique dont l'épiderme, le cœur... Les desmosomes se comportent comme des boutons ou des scratch qui joignent les faces latérales de cellules adjacentes. Le premier site d'adhésion est situé dans les **domaines extracellulaires** de protéines transmembranaires de la famille des **cadhérines**. Du côté intracellulaire des desmosomes, se trouve la plaque divisée en une région proche de la membrane (plaque dense extérieure) et en une région plus éloignée de la membrane (plaque dense intérieure). La zone extérieure contient les **domaines intracellulaires** de **cadhérines** et aussi deux protéines **armadillo** (**plakoglobine** et **plakophiline**). La zone intérieure est composée de la **desmoplakine** qui relie les sites d'adhésion intercellulaires au réseau des **FI**, ce qui renforce mécaniquement les sites d'adhésion intercellulaires [145].

L'aspect de cette structure change en fonction de la différenciation. Cette région transparente aux électrons devient **dense aux électrons** au niveau du *stratum corneum*. Pour souligner cette différence, le desmosome s'appelle alors **cornéodesmosome** [144, 146].

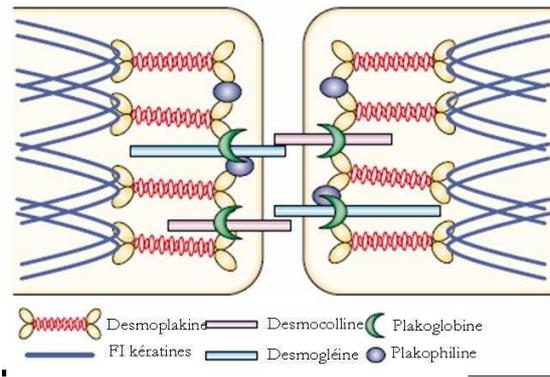


Figure 15 : Desmosome, mise en évidence de certaines des interactions principales protéines-protéines [147].

Quelques propriétés des principales protéines des cornéodesmosomes sont rappelées ici.

Desmoplakine

La desmoplakine interagit avec les filaments intermédiaires. La desmoplakine est une très grosse molécule en forme d'haltère, avec des domaines N-terminal et C-terminal d'un millier d'acides aminés, séparés par un domaine central d'à peu près la même taille [148]. Elle interagit avec la **plakophiline** par son domaine **N-terminal** [149]. La zone **C-terminale**, composée de trois domaines plakines [150], interagit avec les **FI** [151].

Protéines armadillo

Les protéines **armadillo** que l'on trouve dans les desmosomes regroupent les **plakophilines** et la **plakoglobine** [152]. Certaines données suggèrent que la plakoglobine pourrait être impliquée dans la régulation de l'association des autres composants des desmosomes, notamment à travers son domaine C-terminal [153]. Les plakophilines sont capables de lier de très nombreuses protéines des desmosomes par leur domaine N-terminal [149]. Une des hypothèses envisagées serait l'association des plakophilines aux cadhérines [154, 155] mais sans réels résultats définitifs au niveau structurel ou fonctionnel.

Cadhérines desmosomales

Les **cadhérines** desmosomales sont des constituants **transmembranaires** des desmosomes [156]. Il existe 3 isoformes de la desmocolline et 4 de la desmogléine. Leurs domaines extracellulaires peuvent être divisés en plusieurs sous-domaines appelés «**domaines cadhérines**» [157]. Les différentes isoformes présentent des profils de distribution et d'expression différentes dans l'épiderme. Les formes 2 et 3 sont présentes dans les couches plus profondes alors que les **formes 1** (et la desmogléine 4) sont des **marqueurs tardifs de la différenciation** épidermique [158-160]. Ces protéines présentent des **propriétés d'adhésion**. Les desmocollines et les desmogléines se lient de façon **hétérophile** [161, 162].

Cornéodesmosine

La **cornéodesmosine** est une glycoprotéine sécrétée **incorporée aux desmosomes** lors de leur conversion en cornéodesmosomes dans les **couches cornées** de l'épiderme. Sa fonction serait de stabiliser le cornéodesmosome contre les stress mécaniques. Cette protéine est une **protéine d'adhésion** [163], notamment par ses **boucles glycine N- et C-terminales** riches en glycines et en sérines [164] dont la **dégradation** protéolytique est un **prérequis à la desquamation** [165]. Sa protéolyse prématurée et la fragilité desmosomale associée est importante dans les pathologies liées au syndrome de Netherton [166]. Au contraire, la persistance de la cornéodesmosine conditionne les phénomènes de peau sèche (xérose) [167].

II-C.3. La peau, une structure vivante : cas particulier la desquamation

II-C.3.1. Généralités

La desquamation épidermique est un phénomène partagé par tous les mammifères. Cette activité du corps, continue mais invisible, est la plupart du temps ignorée tant que la production de squames ne devient pas anormale.

Sont rappelés par la suite les mécanismes de la desquamation, les protéases impliquées et les facteurs de régulation.

La desquamation est un processus actif et non passif comme supposé encore jusque dans les années 80. Dans l'une des premières expériences s'intéressant à la question et réalisée par Goldschmidt, la surface épidermique était couverte et protégée d'influences extérieures. La récupération de cornéocytes isolés et totalement matures a conduit à la conclusion que ni friction ni toilette n'était nécessaire à leur détachement [168]. De même, la perte spontanée de cellules différenciées des cultures stratifiées de kératinocytes humains a souligné que la desquamation était l'étape finale et active dans le processus de différenciation des kératinocytes [169].

Les observations ultrastructurales du *stratum corneum* montrent que la taille et la distribution des desmosomes diminuent d'autant plus que les cornéocytes s'approchent de la surface [170]. Comme les **desmosomes** ont un rôle central dans l'**adhésion intercellulaire**, leur **destruction** est l'hypothèse de base au mécanisme de **desquamation**.

II-C.3.2. Rôle des enzymes

Au-delà de cette disparition morphologique, de nombreuses observations mettent en évidence le rôle important de plus d'une classe d'enzymes. En plus de protéases, un traitement avec glycosidase est nécessaire pour réduire significativement la taille des desmosomes [171]. L'analyse des protéines du *stratum corneum* montrent une **dégradation progressive des cadhérines** [172-174], de la **desmoplakine** [175] et de la **cornéodesmosine** [165]. Des protéases ont été isolées du *stratum corneum* et plusieurs sont exprimées et activées dans l'épiderme dans les étapes finales de la différenciation : la kallikréine 7 (**SCCE**) [176], la kallikréine 5 (**SCTE**) [177], la **cathepsine D** [178], et des **protéases à cystéine** (cathepsine L2 [175]). De plus l'application d'inhibiteur de protéase permet d'augmenter l'épaisseur du *stratum corneum* chez la souris [179]. Les desmosomes pourraient ne pas être les seuls substrats de protéases importants dans la desquamation. Par exemple, l'absence de matriptase est associée avec l'accumulation de profilaggrine et une cohésion plus forte du *stratum corneum* [180].

a Les protéases à sérine

De nombreuses kallikréines sont localisées dans les couches supérieures du *stratum granulosum* et dans le *stratum corneum*. Encore récemment, l'activité de cette famille de protéases n'était attribuée dans la peau qu'à la SCCE et la SCTE. Cependant, d'autres rôles cutanés des kallikréines sont devenus évidents ces dernières années. Ces enzymes sont capables de dégrader différents substrats impliqués dans la desquamation, les défenses antimicrobiennes, l'inflammation de la peau, la pigmentation... Dans la suite, nous avons résumé le rôle des kallikréines dans le processus de desquamation, d'autres informations pourront être trouvées dans une revue récente [181].

La **SCCE** est responsable de la **dégradation** des structures cohésives comme la **desmogléine** [172, 182]. Il a également été démontré que cette protéase était associée avec la plaque cornéodesmosomale [183], ce qui pourrait être relié aux fragments de plakines mis en évidence au cours de la différenciation [175]. Son pH optimum se trouve autour de 7-8 tout en conservant une activité résiduelle à pH 5,5, pH mesuré du *stratum corneum*. La SCCE est activée par la SCTE une autre protéase à sérine. La SCCE recombinante est également capable de **dégrader la cornéodesmosine** ainsi que les **desmocollines** *in vitro* mais **pas la desmogléine** [184].

La **SCTE** est une enzyme capable de s'auto-activer et présentant une activité tryptique [185]. Son pH optimum se situe à pH 8 mais comme la SCCE, elle présente encore une activité importante à pH 5,5. Cette protéase est capable de **dégrader** seule la **desmocolline**, la **desmogléine** et la **cornéodesmosine** [165, 184].

b Les protéases à acide aspartique

En 1995, Rawlings *et al.* ont mis en évidence pour la première fois le rôle de la **cathepsine D** dans la desquamation [186]. Plus tard, Horikoshi *et al.* ont montré que la libération des cornéocytes *in vitro* était inhibée à 40% par la pepstatine, inhibiteur des protéases à acide aspartique [178, 187]. Cette activité est due, dans le *stratum corneum*, pour 80% à la cathepsine D et pour 20% à la cathepsine E. Cependant, le rôle de celle-ci dans la desquamation a été *a priori* écarté du fait de sa localisation dans les cornéocytes et non spécifiquement dans l'espace intercellulaire comme la cathepsine D [188].

c Les protéases à cystéine

En 1999, Watkinson *et al.* ont identifié une nouvelle protéase à cystéine nommée, *stratum corneum thiol protease* (SCTP) [189]. Son activité n'est présente que dans les kératinocytes différenciés ce qui en fait un bon candidat pour jouer un rôle dans la desquamation. De plus, les auteurs ont démontré sa capacité à dégrader la desmocolline *in vitro*. Plus tard, cette protéase a été caractérisée un peu plus finement par Bernard *et al.* comme étant la **cathepsine L2** mais son expression ne semble pas liée au processus de différenciation tardive [175]. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence une autre protéase à cystéine nommée *stratum corneum cathepsine L like* (**SCCL**) de 28kDa capable de **dégrader in vitro** la **cornéodesmosine** à pH acide.

II-C.3.3. Régulation de la desquamation

Différents facteurs peuvent intervenir dans la régulation de la desquamation comme le pH, la présence d'inhibiteurs, la modification des substrats par le calcium, l'hydratation *etc.*

Certaines **protéases** sont synthétisées sous forme de **précurseurs inactifs** et doivent être **activées**. Par exemple, la pro-SCCE est activée par la SCTE, la SCTE s'auto-active et la pro-cathepsine D est activée par une protéase à cystéine non identifiée.

Le *lymphoepithelial Kazal-type 5 serine protease inhibitor* (LEKTI) est un exemple d'**inhibiteur** important dans le phénomène de **desquamation**. Des peptides dérivés de LEKTI ont une activité inhibitrice sur la SCCE et la SCTE. Dans le syndrome de Netherton, le gène qui code pour LEKTI subit des mutations qui créent une protéine tronquée et par conséquent moins de peptides inhibiteurs. De ce fait, le SCCE et la SCTE sont plus actives, ce qui conduit à une desquamation exacerbée caractéristique du

syndrome [190]. Ceci a notamment été confirmé par des travaux de Descargues *et al.* qui montrent que chez des souris KO, la desmogléine et la profilaggrine subissent une dégradation plus rapide [191].

Le **pH** du *stratum corneum* **diminue** des couches profondes **vers la surface**. Il paraît évident que cette variation **a des conséquences sur les activités enzymatiques**. La SCCE et la SCTE pourraient donc être actives en profondeur puis d'autres enzymes de pH optimum acide (comme la cathepsine D) pourraient prendre le relais [178, 187].

II-C.4. Définition des échantillons

Au cours de cette thèse, nous avons travaillé sur différents types d'échantillon de peau (pour les protocoles de préparation détaillés, voir la Partie V-A.1 Préparation des échantillons de *stratum corneum* non digéré).

Pour la mise au point des conditions d'analyses de peptides endogènes, nous avons réalisé nos expériences sur des extraits de **peptides endogènes issus de *stratum corneum* plantaire**. Il s'agit de cornes de pied mélangées correspondant à différents donneurs. Dans la suite du manuscrit, nous faisons référence à ces échantillons en utilisant généralement l'abréviation **SCP**. Pour la comparaison topologique du dégradome de différentes zones de peau, nous avons comparé ces échantillons de SCP à des échantillons de ***stratum corneum* non plantaire**. Ces échantillons sont préparés à partir de poudre acétonique obtenue à partir de différents donneurs. Ces poudres acétoniques consistent à récupérer les cornéocytes arrachés sur une zone de peau particulière par *stripping* [192]. Dans notre cas, nous avons travaillé sur des ***strippings* de la jambe**. Dans la suite du manuscrit, la référence à de tels échantillons se fait par l'abréviation **PA**.

Enfin la comparaison des protocoles de séparation en chromatographie liquide mono- et multidimensionnelle a été réalisée sur des échantillons digérés de SCP.