



**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE**

Présentée et soutenue publiquement par :

**Marie LAMIAUX**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Spécialité : Immunologie

---

**ImoHS**

**« Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite  
suppurée et Evaluation *in vitro* et *ex vivo* d'une nouvelle stratégie thérapeutique »**

---

Soutenue le mardi 12 décembre 2023

Devant le jury composé de :

**Président du jury**

**Pr Bertrand LIAGRE**, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

**Rapporteurs**

**Pr Sophie HUE**, Professeur des Universités, Université Paris Est (UPEC), France

**Pr Céline FROCHOT**, Professeur des Universités, Directrice de recherche CNRS, Université de Lorraine, France

**Examineur**

**Dr Rabah BOUKHERROUB**, Directeur de recherche CNRS, Université de Lille, France

**Membre invité**

**Pr Pierre GOSSET**, Professeur des Universités, Université Catholique de Lille, France

**Direction de thèse**

**Pr Nadira DELHEM**, Professeur des Universités, Directrice de recherche INSERM, Université de Lille, France

**Pr Philippe MODIANO**, Professeur des Universités, Université Catholique de Lille, France

*Thérapies Assistées par Lasers et Immunothérapies pour l'Oncologie  
INSERM Unité 1189 OncoThAI*

*Hôpital Saint Vincent GHICL*



*« Les choses en médecine ne se mesurent et ne se considèrent  
que par leurs sens et effets. »*

Ambroise Paré

*« La médecine c'est guérir parfois, soulager souvent, écouter toujours. »*

Louis Pasteur

*A ma famille,  
A Mathieu & Isaac*



## Remerciements

### Aux membres du jury

**Professeur Sophie Hue**, je vous remercie d'avoir accepté la fonction de rapporteur de ce travail ainsi que l'intérêt que vous y porterez. C'est un réel honneur et j'espère que vous apprécierez la lecture de ce manuscrit.

**Professeur Céline Frochot**, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail. Je suis honorée que vous ayez manifesté de l'intérêt pour mon sujet d'étude et que vous ayez accepté de faire partie de mon jury.

**Professeur Bertrand Liagre**, je vous remercie vivement d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail de Thèse. Merci d'avoir pris le temps de l'échange ainsi que pour vos remarques constructives durant mon CSI.

**Docteur Rabah Boukherroub**, je vous suis très reconnaissante de l'intérêt que vous portez à mon sujet d'étude et vous remercie d'avoir accepté d'en être l'examineur. J'espère que vous apprécierez ce travail.

**Professeur Pierre Gosset**, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'apporter votre expertise pour ce travail et de participer à ce jury. Recevez l'expression de toute ma gratitude.

**Professeur Nadira Delhem**, je tiens à vous remercier pour avoir dirigé mes recherches. Je vous remercie également pour la confiance que vous m'avez témoignée tout au long de ces années et pour tous ces conseils et remarques constructives. Vous pouvez être assurée de mon sincère respect et de ma profonde gratitude.

**Professeur Philippe Modiano**, je vous remercie de m'avoir proposé ce travail et de l'avoir dirigé. Votre savoir et votre pédagogie m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances en dermatologie. Soyez assuré pour cela de mon profond respect.

### A mon comité de CSI

Je souhaite également remercier chaleureusement les membres de mon CSI. Si j'ai eu l'occasion d'exprimer mes remerciements les plus sincères et mon profond respect au **Pr Bertrand Liagre**, je souhaite également les exprimer au **Pr Delphine Staumont** et au **Pr Emilie Sbidian**. Je vous remercie sincèrement pour votre bienveillance ainsi que pour vos conseils avisés qui m'ont beaucoup apporté et qui ont participé à la réussite de ce doctorat. Merci beaucoup.

### Aux organismes d'encadrement et de financement

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'obtention des appels à projet du **GHICL** et de l'appel à soutien de l'**Université de Lille**. Je tiens à remercier également les laboratoires pharmaceutiques **UCB** et **Leo pharma** pour leurs dons à la recherche qui sont une aide précieuse. Je remercie plus particulièrement, **Solidarité Verneuil**, pour votre soutien dans mon travail et votre combat pour l'amélioration du quotidien des patients. Je mesure la chance que j'ai eu de travailler dans cet environnement. Merci.

Je tiens à remercier les membres de la **délégation de la recherche**, en particulier, **Mme Amélie Lansiaux**, **Mme Julia Lemaire** et **Mme Marie Desolere**, pour l'aide et les conseils à la rédaction des documents réglementaires à la mise en place de l'étude

clinique ImoHS. Je vous remercie de m'avoir accordé votre temps.

Je remercie également **l'École Doctorale Biologie Santé de Lille**, et plus particulièrement **François Delcroix**. Merci pour votre aide, votre disponibilité et votre compréhension tout au long de ma thèse.

### **Aux membres associés**

Je remercie le **Dr Boniotto** pour sa collaboration dans mon projet d'étude, merci d'avoir accepté le partage des lignées cellulaires HaCaT.

Je remercie le **Dr Quinchon**, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa bonne humeur ainsi que toute **l'équipe d'anatomopathologie de l'hôpital Saint Vincent** pour leur aide dans le projet de thèse.

Je remercie le **Dr Dardenne et le Dr Dabrowski**, merci pour votre soutien dans ce travail de recherche, merci pour votre dynamisme et vos conseils.

### **Aux membres du laboratoire et de l'hôpital**

**Nadira**, je souhaite vous remercier de m'avoir permis de poursuivre mon projet de thèse sur l'HS au sein de votre laboratoire. Malgré vos responsabilités, vous avez toujours réussi à m'accorder du temps, me soutenir moralement et apporter vos conseils et corrections qui m'ont permis de progresser. Merci pour vos échanges et votre implication auprès de vos étudiants.

**Pr Modiano**, je vous remercie pour votre accompagnement et votre implication dans mon parcours de ces trois dernières années. Merci pour votre écoute et votre bienveillance.

**Guillaume**, je tenais à te remercier de m'avoir co-encadrée tout au long de ma thèse. Tes conseils avisés et ton écoute ont permis de résoudre bien des problèmes. Merci pour tous les services que tu m'as rendu durant ces trois années. Ton aide m'aura été précieuse.

**Olivier**, merci pour ta bonne humeur, j'ai toujours pris plaisir à discuter avec toi. Merci également d'avoir pris le temps pour corriger mes travaux.

**Clément**, merci pour ta patience et ton écoute durant les manip ! Merci d'avoir pris le temps d'être là surtout lorsque celui-ci manquait ! J'ai pu ainsi finir dans les délais !

Ces quelques lignes sont aussi l'occasion d'exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont composé mon environnement professionnel durant ces trois dernières années. La thèse étant menée à temps partiel sur le laboratoire OncoThAI et le service de dermatologie du GHICL, j'ai eu la chance de rencontrer beaucoup de collègues qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier au sein de **l'équipe OncoThAI : Anthony, Anne-Sophie, Cindy, Grégory, Bertrand, Faty, Camille, Léa et Smail**. Merci à l'ensemble de l'équipe pour votre bienveillance et votre soutien. Je vous souhaite à tous le meilleur dans la réalisation de vos projets.

**Ségoène**, tu auras été une co-CCA d'enfer (dans le bon sens du terme !). Tu as été un soutien sans faille et nos échanges du mardi étaient primordiaux pour moi ! Tu es une super amie sur qui on peut compter !

Je remercie également l'ensemble de **l'équipe médicale et paramédicale de dermatologie** de l'hôpital Saint-Vincent de Paul. Je remercie tout particulièrement l'équipe de la RCP Verneuil, **Dr Dardenne, Dr Coviaux, Dr Sannier, Mme Dubaele, Mme Bry**, pour votre engagement et vos témoignages de sympathie.

Je remercie également les étudiants que j'ai pu encadrer durant mon projet de thèse, **Florian et Mel**, pour leur implication et leur aide.

Merci aux autres membres d'ONCOLille : **Elisa, Clémentine, Marie, Martine**, et tous ceux que j'oublie, toujours là pour discuter et pour échanger. Merci.

### **A mes proches,**

**Maman**, merci d'être toujours présente dans les bons moments comme dans les plus difficiles, merci pour ton soutien sans faille, merci pour tes encouragements et pour ton amour qui m'ont toujours permis d'aller de l'avant.

J'ai une pensée particulièrement émue à mon **papa** et à **Isabelle**, partis bien trop tôt vous avez laissé un grand vide. Il n'y a pas un jour qui passe sans que votre souvenir soit présent.

**Mamie**, merci pour ta présence et tes encouragements, merci d'être là, de nombreux et bons souvenirs d'enfance refont à chaque fois surface lorsque tu es là ! **Papi** me manque beaucoup !

**Titia**, merci d'être une grande sœur à l'écoute ! Ta joie de vivre et ton énergie me remettent en selle à chaque fois ! Merci à mon filleul **Robin**, à mon neveu **Noé** et à mon beau-frère **Quentin**, nos moments en famille sont des petites bulles d'oxygène dans cette vie à 100 à l'heure !

**Jean-Paul, Séverine, Romain, Marceau et Castille** merci pour les bons moments en famille partagés et votre soutien.

**Clara et Sarah**, merci d'être des amies à 100%, merci de m'avoir permis de m'évader de n'importe quelle situation et d'avoir pu passer de supers moments à vos côtés ! Merci de me reconnecter parfois à la vraie vie et aux choses qui comptent !

**Jérémy, Céline, Ambre et Hugo**, merci les amis pour votre présence et votre écoute, hâte de vous revoir !

Enfin, **Mathieu**, merci pour tout. Tu combles ma vie et tu comptes pour toute une vie. Cela n'est pas toujours très paisible mais malgré tout tu es là. Je ne te remercierai jamais assez.

**Isaac**, merci pour le sens que tu as donné à ma vie. J'ai compris à tes côtés ce qu'était l'amour inconditionnel. J'ai hâte de vivre tous les moments de bonheur que la vie nous réservera (avec Urya et Chipie) !



## Table des matières

Remerciements .....	5
Table des matières .....	9
Tables des illustrations .....	11
Table des abréviations .....	13
Préambule .....	15
<b>INTRODUCTION</b> .....	17
<b>A. Biologie cutanée</b> .....	19
A1. Les Kératinocytes représentants majeurs de la peau .....	19
A2. Processus de cicatrisation .....	22
A3. Les peptides anti-microbiens cutanés : effecteurs de la « barrière cutanée chimique » ...	24
A4. Le microbiote cutané .....	26
<b>B. Description de l'hidradénite suppurée</b> .....	27
B1. Aspects cliniques .....	27
B2. Score de sévérité .....	28
B3. Phénotypes de la maladie .....	31
B4. Comorbidités-Associations .....	32
B5. Formes syndromiques .....	35
B6. Complications .....	37
B7. Epidémiologie et facteurs de risque de l'hidradénite suppurée .....	38
B7.1) Epidémiologie .....	38
B7.2) Facteurs de risque .....	39
B7.2.1. Tabagisme .....	39
B7.2.2. Surpoids-Obésité .....	40
B7.2.3. Rôle hormonal .....	41
B7.2.4. Héritéité, formes familiales .....	41
B8. Traitements actuels de la maladie .....	45
B8.1) Mesures hygiéno-diététiques : pansement, hygiène de vie .....	46
B8.2) Traitements locaux .....	48
B8.2.1 Les antiseptiques .....	48
B8.2.2 Les antibiotiques locaux .....	48
B8.3) Traitements systémiques .....	48
B8.3.1 Gluconate de zinc .....	48
B8.3.2 Antibiothérapies .....	48
B8.3.3 Antiandrogènes .....	49
B8.3.4 Rétinoïdes .....	50
B8.3.5 Biothérapie .....	50
B8.4) Traitements physiques .....	52
B8.4.1 La chirurgie .....	52
B8.4.2 Le laser .....	53
<b>C. Physiopathologie de l'Hydradénite suppurée</b> .....	54
C1. Occlusion folliculaire .....	54
C2. Rôle du système immunitaire et implication dans l'HS .....	57
C2.1) Rôle du système immunitaire inné dans l'HS .....	57
C2.2) Perte de contrôle du système immunitaire adaptatif dans l'HS .....	61
C2.3) Altération de l'homéostasie immunitaire dans l'HS .....	64
C2.4) La dysrégulation immunitaire favorise la dysbiose cutanée .....	65
C2.5) Dysbiose cutanée .....	66
<b>D. La thérapie photodynamique : un traitement prometteur ?</b> .....	68
D1. Histoire et indications de la thérapie photodynamique .....	68
D2. Modalités de la thérapie photodynamique .....	69
D3. Les photosensibilisateurs .....	70
D4. Intérêt de la PDT dans les maladies inflammatoires .....	71
<b>OBJECTIFS &amp; HYPOTHESES DE TRAVAIL</b> .....	76
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	79
A) Culture cellulaire .....	81
B) Analyse transcriptomique .....	82
C) Analyse protéique par Western Blot .....	85
D) Dosage de cytokines par multiplex .....	87
E) Test de cicatrisation de blessure (ScratchWound Healing Assay) .....	88
F) Cytométrie en flux .....	89

G)	Mise en culture d'explants cutanés.....	90
H)	Protocole d'histochimie.....	90
I)	Test de fluorométrie.....	91
J)	Protocole de thérapie photodynamique (PDT).....	92
K)	Analyses statistiques.....	93
<b>RESULTATS</b> .....		95
<b>A. Caractérisation de la réponse inflammatoire de l'HS à partir d'un modèle <i>in vitro</i> de lignée kératinocytaire humaine</b> .....		97
A1)	Caractérisation du modèle <i>in vitro</i> HaCaT KO (modèle HS).....	97
A2)	Caractérisation des états de différenciation des lignées kératinocytaires HaCaT WT et KO.....	99
A3)	Evaluation de la réponse inflammatoire à partir du modèle <i>in vitro</i> d'HS.....	102
A4)	Analyse de l'impact de l'inflammation sur les voies de signalisation et différenciation kératinocytaire.....	105
A5)	Evaluation des capacités de cicatrisation de nos lignées HaCaT.....	108
A6)	Analyse de l'expression des transcrits de PAMs sur le modèle <i>in vitro</i> d'HS.....	112
<b>B. Mise en place de l'étude clinique ImoHS</b> .....		115
B1)	Rédaction des documents réglementaires et évaluation du projet par le CPP.....	115
B2)	Mise en place d'une culture d'explants cutanés pour l'évaluation du modèle <i>ex vivo</i> d'HS.....	115
B3)	Détermination et caractérisation des cellules lymphoïdes innées à partir de donneurs sains.....	118
<b>C. Evaluation de la PDT dans le modèle <i>in vitro</i> d'HS et mise au point du dispositif de PDT pour le traitement d'explants cutanés <i>ex vivo</i></b> .....		120
C1)	Evaluation de l'effet de la PDT au 5-ALA et au bleu de méthylène sur le modèle <i>in vitro</i> d'HS.....	120
C1.1.	Mise en place des paramètres de PDT : évaluation de l'incorporation intracellulaire du PS par test de fluorométrie.....	120
C1.2.	Evaluation de la PDT au BdM <i>in vitro</i> sur les lignées HaCaT.....	124
C1.3.	Evaluation de la PDT au 5-ALA sur nos modèles <i>in vitro</i> HaCaT WT et KO.....	128
C2)	Mise au point et évaluation du dispositif de PDT à partir d'explants cutanés de donneur sain.....	128
<b>DISCUSSION</b> .....		133
A.	Choix du modèle d'étude.....	135
B.	Modèle <i>in vitro</i> HaCaT NCSTN <sup>-/-</sup> mimant l'HS.....	136
C.	Impact de l'inflammation sur le modèle HaCaT KO.....	138
D.	L'inflammation altère l'état de différenciation kératinocytaire et les capacités de cicatrisation de notre modèle <i>in vitro</i> d'HS.....	145
E.	Etude des PAMs dans le modèle <i>in vitro</i> d'HS.....	150
F.	Les ILCs : nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'HS.....	156
G.	Effets de la PDT sur notre modèle <i>in vitro</i> d'HS.....	159
<b>PERSPECTIVES</b> .....		162
Collaborations du projet d'étude.....		162
Encadrements durant le projet d'étude.....		162
Financements du projet d'étude.....		163
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		165
Résumé de la thèse.....		195
Abstract of thesis.....		197
Figures supplémentaires.....		199
<b>ANNEXES</b> .....		201
Annexe 1 : Article médical publié dans JAAD Case Report.....		203
Annexe 2 : Article scientifique publié dans Archives of Clinical and Medical Case Reports.....		204
Annexe 3 : Protocole de recherche clinique ImoHS.....		225
Annexe 4 : Avis du comité de protection des personnes.....		250
Annexe 5 : Cahiers d'inclusion patients & témoins.....		251
Annexe 6 : Notice d'information pour les patients et témoins.....		263
Annexe 7 : Formulaire de recueil de non opposition.....		270
Liste de mes publications.....		273

## **Tables des illustrations**

### **Figures**

<b>Figure 1</b> : Caractérisation du modèle <i>in vitro</i> HaCaT WT et KO indifférenciés. ....	98
<b>Figure 2</b> : Caractérisation de l'état de différenciation du modèle <i>in vitro</i> HaCaT WT et KO. ....	101
<b>Figure 3</b> : Caractérisation de la réponse inflammatoire du modèle HaCaT WT et KO. ....	105
<b>Figure 4</b> : Impact de l'inflammation sur les voies de signalisation et les marqueurs de la différenciation kératinocytaire à partir du modèle <i>in vitro</i> HaCaT WT et KO. ....	108
<b>Figure 5</b> : Caractérisation des capacités de migration des lignées HaCaT. ....	111
<b>Figure 6</b> : Mise en place de la culture tissulaire et évaluation de la viabilité des explants cutanés. ...	117
<b>Figure 7</b> : Analyse de l'expression des gènes de PAMs des lignées HaCaT. ....	114
<b>Figure 8</b> : Analyse de la fréquence des sous-groupes d'ILCs par cytométrie en flux. ....	119
<b>Figure 9</b> : Evaluation qualitative et quantitative de l'incorporation intracellulaire du bleu de méthylène dans les lignées HaCaT WT et KO. ....	122
<b>Figure 10</b> : Evaluation quantitative de l'incorporation intracellulaire du 5-ALA dans les lignées HaCaT WT et KO. ....	123
<b>Figure 11</b> : Test de viabilité cellulaire des lignées HaCaT indifférenciés et différenciés après PDT au bleu de méthylène. ....	125
<b>Figure 12</b> : Test de viabilité cellulaire des lignées HaCaT WT et KO, indifférenciés et différenciés, après PDT au bleu de méthylène à concentration $\leq 10 \mu\text{M}$ . ....	127
<b>Figure 14</b> : Mise au point du dispositif d'illumination laser pour réalisation de la PDT sur un modèle <i>ex vivo</i> d'HS. ....	131
<b>Figure S1</b> : Caractérisation de l'état de différenciation du modèle HaCaT WT et KO. ....	199

### **Tableaux**

<b>Tableau 1</b> . Classification de sévérité de l'HS par Hurley .....	29
<b>Tableau 2</b> . Essais thérapeutiques en cours en 2020 dans l'hidradénite suppurée .....	52
<b>Tableau 3</b> . Tableau regroupant les séquences sens et anti-sens des primers utilisés pour l'analyse de 38 gènes d'intérêts et des 4 gènes de ménages retenus pour la PCR. ....	83
<b>Tableau 4</b> . Tableau regroupant les anticorps primaires et secondaires utilisées lors de la quantification protéique par Western Blot. ....	87
<b>Tableau 5</b> . Panels d'anticorps pour immunophénotypage des ILCs par cytométrie de flux. ....	90

### **Illustrations**

<b>Illustration 1</b> . Schéma modifié représentant les différentes couches cellulaires de l'épiderme et les étapes de différenciation kératinocytaire suivant un gradient calcique. ....	21
<b>Illustration 2</b> . Les peptides antimicrobiens et leurs multiples fonctions lors d'une agression cutanée. ....	25
<b>Illustration 3</b> . Schéma modifié représentant la structure de la $\gamma$ -sécrétase avec les différentes sous-unités et ses substrats ainsi que son implication dans la voie de signalisation Notch ..	43
<b>Illustration 4</b> . Implication de la voie Notch dans l'HS. ....	44
<b>Illustration 5</b> . Algorithme de prise en charge des patients selon la sévérité et selon les formes d'HS. ....	46
<b>Illustration 6</b> . Mécanismes physiopathologiques de l'hidradénite suppurée .....	55
<b>Illustration 7</b> . Image modifiée représentant les facteurs physiopathologiques identifiés dans l'HS .....	56
<b>Illustration 8</b> . Représentation des différents acteurs du système immunitaire dans la physiopathologie de l'HS. ....	61
<b>Illustration 9</b> . Représentation des acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative dans l'évolution des lésions d'HS .....	64
<b>Illustration 10</b> . Limites de la PDT dans le traitement des lésions d'HS. ....	73
<b>Illustration 11</b> . Structure chimique et spectre d'absorption des photosensibilisateurs utilisés. ....	75
<b>Illustration 12</b> . Inhibition de la voie de signalisation Notch entraînant le blocage secondairement de la voie PI3K/AKT .....	144
<b>Illustration 13</b> . Implication des PAMs dans la physiopathologie de l'HS .....	151
<b>Illustration 14</b> . Rôle des ILC3 résidents dans la symbiose hôte – microbiote cutané .....	158



## Table des abréviations

<b>A</b>			
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	<b>L</b>	
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>	LDPDT	<i>Low Dose PDT</i>
5-ALA	Acide 5-aminolévulinique	LL-37	Cathélicidine
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché	LPS	Lipopolysaccharide
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament	<b>M</b>	
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène	MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
APP	Précurseur du Peptide Amyloïde	MEC	Matrice ExtraCellulaire
ARN	Acides RiboNucléiques	MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
ARNm	ARN messenger	MMP	MétalloProtéinase Matricielle
<b>B</b>		<b>N</b>	
BdM	Bleu de Méthylène	NCSTN	Nicastrine
<b>C</b>		NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
CD	Clusters de différenciation	<b>P</b>	
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PAM	Peptide antimicrobien
CPP	Comité de protection des personnes	PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
CRTH2	<i>Chemoattractant Receptor Th2 cells</i>	PBMC	Cellule mononucléée du sang périphérique
<b>D</b>		PBS	Tampon Phosphate Salin
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>	PDT	Thérapie photodynamique
DC	Cellule Dendritique	PGA-HS	<i>Physician Global Assessment-HS</i>
DCD	Dermcidine	PI3K	<i>Phospholinositide 3-Kinase</i>
DLQI	<i>Dermatology Life Quality Index</i>	PIK3R3	<i>Phospholinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 3</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Pp-IX	Protoporphyrine IX
<b>E</b>		PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
EFS	Etablissement Français du sang	PS	Photosensibilisateur
EMT	Transition épithélio-mesenchymateuse	PSEN 1	Préséniline
EVA	Echelle Visuelle Analogique	PSENE1	<i>Presenilin Enhancer <math>\gamma</math>-Secretase Subunit</i>
<b>G</b>		PSTPIP1	<i>Proline-Serine Threonine Phosphatase Interacting Protein 1</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate DesHydrogénase	<b>R</b>	
GHICL	Groupements des Hôpitaux Catholiques de Lille	RNAse	Ribonucléase
<b>H</b>		ROR $\gamma$ t	<i>Retinoid related Orphan Receptor <math>\gamma</math>t</i>
hBD	<i>human-<math>\beta</math> Defensin</i>	<b>S</b>	
HDPDT	<i>High Dose PDT</i>	S100A7	Psoriasine
HES	Héματοxyline Eosine Safran	S100A8	Calgranuline A
HiSCR	<i>HS Clinical Response</i>	S100A9	Calgranuline B
HiSQOL	<i>The Hidradenitis Suppurativa Quality Of Life</i>	SAA	Protéine sérique Amyloïde A
HpD	Dérivé d'Hématoporphyrine	SHBG	<i>Sex Hormone-Binding Globulin</i>
HPV	PapillomaVirus Humain	siARN	ARN interférent
HS	Hidradénite Suppurée	SVF	Sérum de veau fœtal
<b>I</b>		<b>T</b>	
IFN	Interféron	TGF- $\beta$	<i>Tumor Growth Factor-<math>\beta</math></i>
IHS4	<i>International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System</i>	T <sub>H</sub>	<i>T helper</i>
IL	Interleukine	TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
ILC	Cellule Lymphoïde Innée	TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
IMC	Indice de Masse Corporelle	TNFR1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
IVL	Involucrine	T-reg	Lymphocyte T régulateur
<b>K</b>		TSLP	LymphoPoïétine Stromale Thymique
KC	KératinoCyte	<b>W</b>	
KID	<i>Keratitis-Ichtyosis-Deafness</i>	WT	<i>Wild type/Phénotype sauvage</i>
KRT	Kératine		



## Préambule

Cher(e)s membres du jury, cher(e)s lecteurs,

Cette thèse est divisée en quatre grandes parties : introduction, matériels et méthodes, résultats et une discussion générale couplée à des perspectives concernant mon travail de thèse.

L'introduction est divisée en deux parties. La première partie décrit des notions de biologie cutanée, puis une seconde partie aborde la physiopathologie ainsi que les aspects épidémiologiques et cliniques de l'hidradénite suppurée (HS) et les traitements actuels proposés. La troisième partie se concentre sur la thérapie photodynamique (PDT) en présentant les modalités de traitement et ses limites, les indications classiques et nouvelles dans les pathologies inflammatoires, les effets sur l'immunomodulation et la régulation du microbiote. L'introduction se termine sur la présentation du contexte scientifique de la thèse et de ses objectifs.

Un matériels et méthodes reprenant les protocoles de chaque expérience menée est décrit à la suite de l'introduction.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont ensuite présentés. Tout d'abord, nous avons caractérisé la réponse inflammatoire de l'HS à partir d'un modèle *in vitro* de lignée kératinocytaire humaine *knock out* pour le gène de la Nicastrine. S'en suit la description de la mise en place de l'étude clinique ImoHS. Puis nous avons voulu identifier de nouvelles cibles thérapeutiques telles que les peptides antimicrobiens et les cellules lymphoïdes innées qui semblent être impliquées dans la physiopathologie de l'HS. Enfin, nous avons évalué l'effet de la PDT dans le modèle *in vitro* d'HS et nous avons mis au point un dispositif de PDT afin de pouvoir l'appliquer sur des explants cutanés *ex vivo*. Ce manuscrit termine par une discussion générale et une perspective de l'ensemble de mes travaux.

A la fin du manuscrit se trouvent les annexes constituées d'une publication en rapport avec mon sujet de thèse (**Annexe 1**) et un travail scientifique sur le mélanome publié en premier auteur que j'ai réalisé en parallèle de mon travail de thèse (**Annexe 2**), j'ai également inséré tous les documents réglementaires rédigés pour la mise en place de l'étude clinique ImoHS.



# **INTRODUCTION**



## **A. Biologie cutanée**

### **A1. Les Kératinocytes représentants majeurs de la peau**

La peau humaine est l'enveloppe protégeant le corps contre l'extérieur, il s'agit de l'organe le plus grand environ 2 m<sup>2</sup> pour un adulte. La peau est divisée en trois compartiments du plus superficiel au plus profond : l'épiderme, le derme et l'hypoderme<sup>1,2</sup>. L'épiderme est la couche en contact avec l'environnement, son épaisseur varie grâce à celle de la couche cornée, en moyenne entre 75 et 150 µm mais pouvant atteindre jusqu'à 700 µm selon la localisation anatomique<sup>3,4</sup>.

L'épiderme n'est pas vascularisé les échanges se faisant par diffusion, il s'agit d'un épithélium pluristratifié, pavimenteux et kératinisé. Il comporte quatre types cellulaires différents. Les mélanocytes sont responsables de la pigmentation de la peau grâce à la synthèse de mélanine et sont présents uniquement au niveau de la couche basale épidermique. Il y a également les cellules de Langerhans qui sont des cellules du système immunitaire. Les cellules de Merkel ont une fonction principalement sensorielle de la peau. Et enfin les cellules qui composent à plus de 80% l'épiderme sont les kératinocytes (KCs) qui sont composés de protéines les kératines (KRT) et de lipides qui sont différents selon l'état de différenciation. En effet, les KCs subissent plusieurs étapes de différenciation selon leur migration de la couche basale vers la couche cornée (surface cutanée).

Le derme est un tissu composé principalement de fibres de collagène et de fibres élastiques entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) et composé de différents types cellulaires. Les fibroblastes en sont les représentants principaux et les autres cellules présentes sont : les cellules endothéliales, les cellules immunitaires en particulier les cellules dendritiques (DCs), les macrophages, les cellules lymphoïdes innées (ILCs) et les lymphocytes. Dans le derme, il y a la présence de vaisseaux sanguins et lymphatiques dermiques ce qui en fait une zone d'échange et de mise en relation entre la peau et l'hôte.

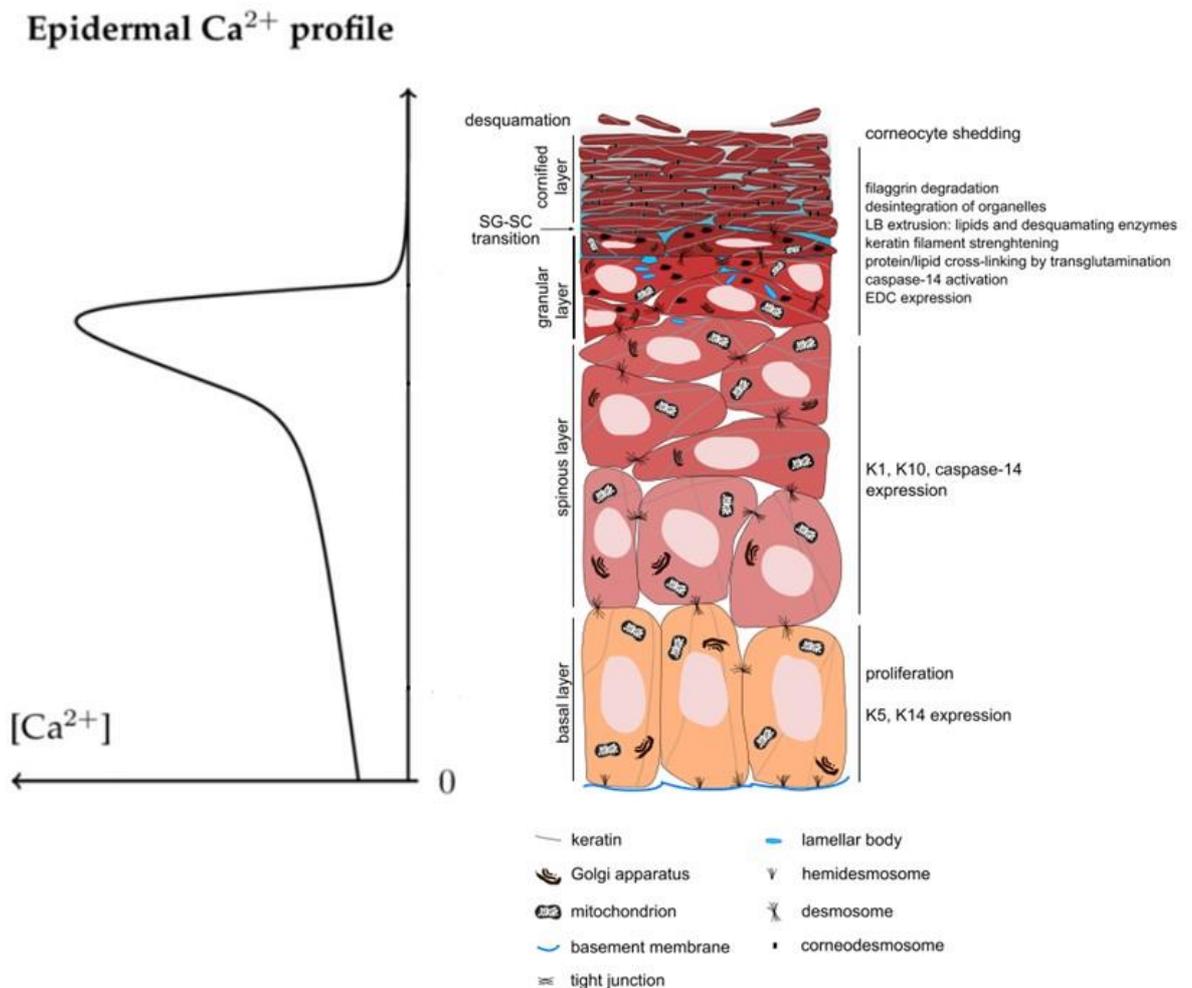
L'hypoderme est composé d'adipocytes, il s'agit d'un tissu grasseux également vascularisé, il joue un rôle de protection thermique et mécanique mais également inflammatoire avec la synthèse d'adipokines.

L'épiderme humain est donc stratifié de plusieurs couches cellulaires selon l'état de différenciation et donc de kératinisation des kératinocytes. La couche basale (*Stratum Basale*), qui représente la première et seule assise kératinocytaire qui est

liée à la membrane basale par des jonctions d'hémidesmosomes ce qui assure leur différenciation. Les KCs basaux ont une forme cubique et représentent la couche de prolifération, puisqu'ils permettent le renouvellement de la peau environ tous les 21 jours et compensent ainsi le mécanisme de desquamation. Les KCs issus de cette couche basale vont alors migrer afin de former les couches superficielles (suprabasales). La couche épineuse (*Stratum Spinosum*) est la couche qui suit la couche basale. Les KCs forment plusieurs assises cellulaires et sont liés par des desmosomes. Leurs caractéristiques morphologiques changent et prennent une forme polygonale et vont s'aplatir en migrant vers les couches plus superficielles de la peau. Cette modification morphologique rentre dans le cadre du processus de différenciation kératinocytaire. Ensuite, il y a la couche granuleuse (*Stratum Granulosum*) dont les cellules continuent à s'aplatir, elle est composée d'environ 1 à 5 assises cellulaires<sup>1</sup>. Les kératinocytes se caractérisent par la formation de grains de kératohyaline (d'où le nom de la couche cellulaire) contenant des protéines et des granules riches en lipides afin de former le ciment de la couche cornée. Enfin, la couche cornée (*Stratum Corneum*) est la couche la plus superficielle de la peau en contact direct avec l'extérieur. Elle est composée de cornéocytes qui sont des KCs complètement aplatis, sans noyau ni organelles dans leur cytoplasme et remplis de KRT, ils peuvent former jusqu'à 20 assises cellulaires selon la localisation anatomique<sup>1</sup>. Les cornéocytes sont des cellules mortes entourées de ciment lipidique dont la fonction est de constituer la barrière cutanée. Les cornéocytes des assises les plus superficielles de la couche cornée perdent leur cornéodesmosomes, n'étant plus liés, ils vont alors subir un processus de desquamation.

La migration des KCs sur l'ensemble des différentes couches de l'épiderme, de la couche basale vers la couche cornée jusqu'à la desquamation est soumise à un processus de différenciation. Les KCs basaux correspondent à des cellules indifférenciées, qui ont un potentiel de prolifération élevé afin d'être capable de produire des cellules filles et assurer le renouvellement de l'épiderme. Ainsi la prolifération des KCs basaux assure l'homéostasie épidermique. Les KCs suivent ensuite un programme de migration verticale et se différencient progressivement jusqu'à la couche cornée<sup>1,2</sup>. La différenciation des KCs jusqu'à l'état de cornéocytes évolue sur environ 30 jours<sup>5</sup>. Pour les KCs, les capacités de prolifération et de différenciation sont réciproquement exclusives. Les KCs, au cours du processus de différenciation, présentent plusieurs changements notamment sur le plan morphologique, mais également sur l'expression de gènes et leur composition en

protéine et en lipide. Ces modifications sont utilisées pour distinguer chaque étape de la différenciation (**Illustration 1**). On peut ainsi identifier les cellules non différenciées, représentant les cellules de la couche basale, par leur forme cubique, leur noyau volumineux et l'expression spécifique des kératines 5 et 14 (KRT5, KRT14)<sup>2</sup>.



**Illustration 1.** Schéma modifié représentant les différentes couches cellulaires de l'épiderme et les étapes de différenciation kératinocytaire suivant un gradient calcique d'après Eckhart et al.2013<sup>1</sup> et Adams<sup>6</sup>.

Les cellules en différenciation précoce de la couche épineuse synthétisent les kératines 1 et 10 (KRT1, KRT10) remplaçant les KRT5 et KRT14<sup>7</sup>. Les étapes tardives du processus de différenciation sont caractérisées au niveau de la couche épineuse supérieure par l'expression de l'involucrine (IVL) alors que la profilaggrine est retrouvée dans les grains de kératohyaline au niveau de la couche granuleuse. Au cours de la cornification, processus de différenciation terminale des KCs qui va induire un programme de mort cellulaire programmée par apoptose, l'IVL, la loricrine et la filaggrine sont nécessaires pour former les cornéodesmosomes et les enveloppes cornifiées<sup>8</sup>. L'élafine est un inhibiteur spécifique de l'élastase, c'est également une

protéine composant l'enveloppe cornée des KCs, elle posséderait également un rôle antimicrobien.

L'un des facteurs modulables de la différenciation kératinocytaire est le calcium, bien connu et utilisé dans de nombreuses études dans le but de moduler et d'étudier ce processus cellulaire. Il existe un gradient de calcium épidermique, avec une faible concentration calcique au niveau de la couche basale et qui augmente progressivement en regard des couches épineuse et granuleuse afin ensuite de diminuer au sein de la couche cornée<sup>9</sup> (**Illustration 1**). Ce gradient est essentiel dans le contrôle de la différenciation kératinocytaire. Il a été montré, sur des études *in vitro*, à partir de kératinocytes murins et humains, que les cellules ont une capacité de prolifération plus importante si la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu est inférieure ou égale à 0,07 mM<sup>10</sup>. Il a été décrit que lorsque la concentration calcique du milieu est supérieure à 1 mM, on notait la synthèse de desmosomes permettant les contacts inter-cellulaires et de l'IVL, ainsi que la mise en place d'une stratification et la formation d'une enveloppe cornée, autant d'éléments caractérisant la différenciation kératinocytaire<sup>11,12</sup>. Lors de l'augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, il a été montré dans les heures suivantes que les KCs synthétisaient les kératines suprabasales KRT1 et KRT10 à défaut des kératines basales KRT5 et KRT14<sup>13</sup>, puis secondairement il était montré une élévation du taux de profilaggrine, de loricrine, d'IVL<sup>14</sup>. L'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  est rapide et agit d'abord au niveau transcriptionnel avec l'augmentation du taux d'ARNm (Acides Ribonucléiques messagers) des gènes impliqués dans la différenciation kératinocytaire<sup>13,14</sup>. Il a été démontré que selon les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture, les expressions de la filaggrine<sup>15</sup>, de la loricrine<sup>14</sup> et de la KRT1<sup>16</sup> pouvaient être modulées. Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue également un rôle dans la conformation de protéines impliquées dans l'enveloppe cornée telles que les protéines S100 ou la filaggrine.

## **A2. Processus de cicatrisation**

Lors d'une agression externe ou interne de la barrière cutanée, le processus de cicatrisation cutanée commence par une inflammation, suivie d'une période de régénération tissulaire comprenant la réépithélialisation, l'angiogenèse et la formation de collagène, et aboutissant à un processus de remodelage afin de restaurer le tissu. La plaie cutanée est un exemple physiologique de transition épithélio-mesenchymateuse (EMT). Lors de la réépithélialisation, il existe une activation des KCs en bordure de la lésion<sup>17</sup>. C'est le dommage tissulaire qui provoque des signaux

permettant une reprogrammation transcriptionnelle se caractérisant par des modifications phénotypiques et l'initiation de la migration<sup>18</sup>. Pour cela, les KCs en marge se dépolarisent, réorganisent leurs jonctions adhérentes et leurs desmosomes ainsi que leur cytosquelette<sup>18</sup>. Des études réalisées sur des HaCaT, KCs immortalisés observent que la distance entre les noyaux des cellules augmente jusqu'à 60 %<sup>19</sup>.

Les kératinocytes activés expriment les KRT5, KRT14 et KRT16, physiologiquement restreintes au phénotype basal<sup>20</sup>. L'initiation de la motilité cellulaire ainsi que de la prolifération sont majeures dans l'EMT et indispensable dans l'étape de réépithélialisation cutanée. Ainsi, les KCs activés subissent une conversion phénotypique correspondant à une EMT partielle. À la suite d'une plaie, les KCs migrent dans un contexte inflammatoire à la suite de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-1 [IL-1], IL-6, Facteur de Nécrose Tumorale [TNF- $\alpha$ ]) par les polynucléaires neutrophiles, ces mêmes cytokines activent dans un second temps les KCs<sup>18,21</sup>. Les cytokines TGF- $\beta$  (*Tumor Growth Factor- $\beta$* ), TNF- $\alpha$  et IL-1 ont montré jouer un rôle motogénique sur les KCs car favorisant leur mouvement cellulaire *in vitro*<sup>21</sup>. Il a été également démontré le rôle de la signalisation PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), contrôlant les voies PTEN/AKT dans le processus de cicatrisation<sup>22</sup>.

Il est important de noter que l'échec d'un de ces mécanismes peut conduire à la formation de plaies chroniques. Dans ce contexte, les infections microbiennes sont des facteurs fréquents qui favorisent et pérennisent ces plaies chroniques comme on peut le voir dans l'hidradénite suppurée (HS)<sup>23</sup>. Les pathogènes opportunistes, tels que le *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie Gram négatif) ou le *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram positif), sont capables de coloniser ces lésions cutanées persistantes, et vont ainsi former des biofilms, correspondant à une agrégation de cellules bactériennes immobilisées dans une matrice adhésive de substances polymériques extracellulaires<sup>23,24</sup>. Cela rend l'éradication des bactéries difficile, principalement en raison de la faible pénétration des antibiotiques et de la résistance aux mécanismes d'élimination de l'hôte, phénomène observé dans l'HS<sup>25,26</sup>. De plus, les toxines libérées par les bactéries contribuent au recrutement des cellules immunitaires, et surenrichissent la réponse inflammatoire de l'HS aggravant d'autant plus le retard de cicatrisation et devenant nocive pour l'hôte<sup>27</sup>.

Ainsi, le processus de cicatrisation des plaies est initié par une reprogrammation précoce des KCs, induite par des cytokines pro-inflammatoires et permettant la réépithélialisation. Elle se caractérise par une conversion phénotypique kératinocytaire, correspondant à une EMT partielle, contribuant à la migration et à la

prolifération des KCs. Un défaut de ce processus peut initier le développement de plaies chroniques, sièges d'inflammation et de prolifération microbienne empêchant alors la régénération tissulaire. La cicatrisation cutanée est un processus complexe, naturel et dynamique qui fait intervenir de nombreux acteurs tels que les peptides antimicrobiens (PAMs).

### **A3. Les peptides anti-microbiens cutanés : effecteurs de la « barrière cutanée chimique »**

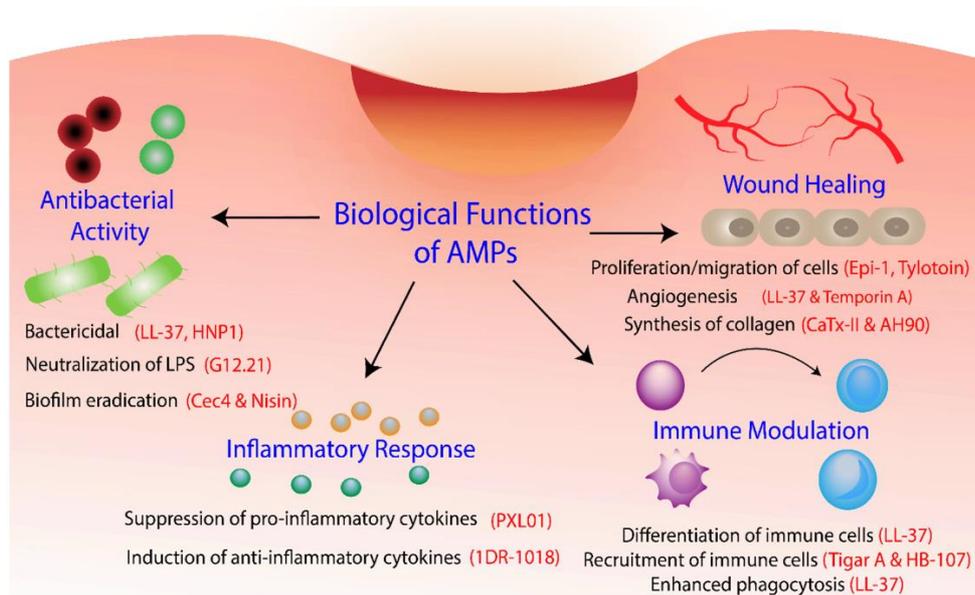
Les PAMs cutanés sont des protéines de faible poids moléculaire, généralement de 10 à 50 acides aminés, produits en majorité par :

- les cellules épithéliales telles que les KCs pour les Défensines- $\beta$  humaines 1,2,3 (hBD), la Psoriasine (S100A7), la Ribonucléase 7 (RNase 7), la Calgranuline A (S100A8) ; Calgranuline B (S100A9)
- les annexes épidermiques telles que les glandes sudoripares pour la Dermcidine (DCD)
- les leucocytes circulants pour la cathélicidine (LL-37), les Peptides neutrophiles humains 1 à 3, la Défensine- $\alpha$ .

Les PAMs font partis du système immunitaire innée cutané, il s'agit d'un système de défense peu spécifique mais rapidement efficace. Ils jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération microbienne permettant de maintenir un équilibre permanent avec le microbiote cutané. Sous l'influence du microbiote, les PAMs vont être sécrétés rapidement, en particulier en cas d'invasions par des germes non commensaux potentiellement pathogènes. Les PAMs ont une action bactéricide en perturbant l'intégrité membranaire des bactéries par la formation de pores et en inhibant/bloquant la synthèse des acides nucléiques et des protéines bactériennes limitant ainsi leur fonction pathogène<sup>29</sup>. Ces divers mécanismes d'action font que les PAMs agissent sur un large spectre d'espèces. L'intérêt des PAMs est que, contrairement aux antibiotiques, ils agissent comme immunomodulateurs ce qui explique qu'il y a peu de résistance bactérienne à ces molécules<sup>30</sup>.

Les PAMs peuvent être exprimés de façon constitutive (hBD-1, S100A7, S100A8, DCD) ou être induits (hBD-2, hBD-3, RNase 7, LL-37) en cas d'infection ou d'inflammation. En plus de leur effet antibactérien, les PAMs exercent une fonction immunomodulatrice par la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-17,

IL-23, IFN- $\gamma$ ), la facilitation de la reconnaissance des DAMPs (*Damage Associated Molecular Pattern*) par les TLRs (*Toll-like receptors*), leur rôle de chimioattraction sur les neutrophiles<sup>31</sup> et la capture des antigènes pour présentation aux DCs<sup>29,32</sup> (**Illustration 2**). En effet, lorsqu'un microorganisme pathogène pénètre dans la peau, il est reconnu grâce aux PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes) par les récepteurs de reconnaissance (PRR), en particulier les TLR des macrophages. Cela active les macrophages qui vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, principalement l'IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-18. Ces dernières sont de puissants inducteurs de hBD-2, S100A7 et de la calprotectine (S100A8 et S100A9). L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-23 régulées à la hausse lors d'une invasion microbienne, vont promouvoir la différenciation des cellules Th17. Les cellules Th17 produisent de l'IL-17 qui induit l'expression de plusieurs PAMPs, notamment hBD-2, hBD-3, S100A8, S100A9<sup>33</sup>. Certains PAMPs peuvent également avoir des propriétés chimiotactiques en particulier à l'égard des neutrophiles et des lymphocytes, eux-mêmes producteurs des cytokines pro-inflammatoires. Les PAMPs, les chimiokines et les interleukines créent alors une boucle de rétroaction inflammatoire positive<sup>31</sup>.



**Illustration 2.** Les peptides antimicrobiens et leurs multiples fonctions lors d'une agression cutanée d'après Haidari et al.,2022<sup>28</sup>.

Il a également été montré que les PAMPs jouaient un rôle dans la cicatrisation cutanée non seulement en luttant contre l'infection des plaies mais également en favorisant l'angiogenèse et la réépithélialisation du fait d'une influence sur la migration et la prolifération des KCs<sup>29,34</sup> (**Illustration 2**). Il a été montré une induction des PAMPs

à chaque étape de la cicatrisation cutanée, ce qui laisse penser qu'ils jouent un rôle dans ce processus. Les PAMs en tant que régulateurs antimicrobiens participent également activement à l'équilibre du microbiote cutané. Actuellement beaucoup d'études évaluent l'impact de l'altération du microbiote dans la physiopathologie de nombreuses maladies notamment inflammatoire comme l'HS.

#### **A4. Le microbiote cutané**

A la surface cutanée, ainsi que dans les follicules pileux et les conduits des glandes sébacées, il existe de nombreux micro-organismes principalement composés de bactéries (environ 60%, plus de 1000 espèces différentes) mais également de virus (30%), d'acariens et de champignons<sup>35</sup>. Le microbiote à la surface cutané est très divers selon les régions anatomiques chez un même individu et il est très influencé par les facteurs de l'environnement. Il a aussi été montré que le microbiote cutané présentait des modifications selon les étapes de développement de l'individu et de son âge<sup>36</sup>. Le nombre de micro-organismes au sein du microbiote cutané est estimé à  $10^{12}$ <sup>36</sup>. Ces micro-organismes commensaux sont inoffensifs pour l'hôte, voire ils sont bénéfiques l'un pour l'autre, c'est le concept de « mutualisme »<sup>35</sup>. Pourtant, certains microorganismes peuvent être nocifs et coloniser durablement la peau. Ils sont présents au sein du microbiote mais sont toutefois minoritaires et divisés en 2 types :

- Les pathogènes qui sont retrouvés dans la flore commensale et qui peuvent induire des maladies même chez un sujet sain, cela dépend de leur pouvoir pathogène.
- Les opportunistes qui sont fréquents au sein de la flore commensale, ils ne causent pas de maladie chez le sujet sain mais peuvent en déclencher chez un sujet qui présente un déficit immunitaire ou une altération de la barrière cutanée.

La flore commensale va donc entrer en compétition en termes de nutriments et d'espace avec les micro-organismes pathogènes limitant leur possibilité d'installation et de prolifération à la surface cutanée. Les bactéries commensales produisent également des bactériocines<sup>35</sup>, qui sont des métabolites toxiques bloquant le développement des bactéries pathogènes. Il a également été montré que le microbiote cutané permettait de stimuler et d'entretenir la réponse immunitaire, par la production de cytokines, en particulier d'IL-17 par les lymphocytes T et par l'induction de sécrétion

de PAMs par les kératinocytes<sup>37</sup>, dans le but de maintenir l'homéostasie du microbiote.

Par ailleurs, la couche cornée est un milieu hostile pour le développement et la colonisation de nombreux micro-organismes. La desquamation cutanée permet de préserver l'équilibre du microbiote en diminuant l'intensité microbienne. Les glandes sudoripares par sécrétion d'électrolytes imposent des conditions physicochimiques plutôt acide et salée. Les glandes sébacées associées aux follicules pileux apportent des lipides dans le but de lubrifier l'épiderme mais ont également une activité antibactérienne et fongicide.

Lorsqu'il y a une perturbation des compositions microbiennes au sein du microbiote on parle alors de dysbiose cutanée. En effet, l'altération de l'équilibre des bactéries commensales favorise l'installation de microorganismes non commensaux qui peuvent être pathogènes et promouvoir des effets néfastes sur l'hôte. La perte d'une part des effets bénéfiques des microorganismes commensaux et la présence d'autre part des microorganismes pathogènes aux fonctions néfastes, entraînent une activation du système immunitaire, qui dans le cadre de pathologies inflammatoires, telles que l'HS, peuvent alors aggraver la pathologie<sup>36</sup>. Actuellement, il est encore débattu de savoir si la dysbiose cutanée est l'élément primaire dans le développement de maladies ou alors si elle n'est qu'une conséquence de la pathologie.

## **B. Description de l'hidradénite suppurée**

### **B1. Aspects cliniques**

L'hidradénite suppurée (HS) encore appelée hidrosadénite suppurée et communément appelée maladie de Verneuil a été décrite pour la première fois en 1839 par le chirurgien français Velpeau. Les premières descriptions ont été complétées par le chirurgien Verneuil d'où son nom. Hidradénite est un mot d'origine grecque qui signifie « inflammation des glandes sudoripares » et le mot suppuré désigne la « formation de pus » présent dans les formes les plus sévères de la maladie. Le nom de la maladie n'est pas totalement correct puisque les données actuelles sont plutôt en faveur d'un trouble primaire de l'épithélium folliculaire associé aux glandes apocrines, qu'à une anomalie primaire de ces dernières. Il s'agit d'une dermatose inflammatoire chronique et douloureuse se localisant principalement aux plis cutanés. Cette maladie évolue par des poussées inflammatoires aiguës parfois subintrantes. Les poussées sont caractérisées par des nodules inflammatoires, des douleurs, des abcès et des suppurations. Il a été évalué que 23 %, 30 % et 31 % des patients

présentaient respectivement une poussée quotidienne, hebdomadaire et mensuelle<sup>38</sup>. A terme, l'inflammation chronique a pour conséquence la constitution de fistules/sinus et cicatrices hypertrophiques « en corde » qui limitent les mouvements parfois jusqu'à entraîner un handicap physique. L'ensemble de ces éléments altèrent considérablement la qualité de vie des patients.

Le diagnostic de l'HS est clinique et repose sur l'association de 3 critères :

- la **présence de lésions cutanées caractéristiques : nodules inflammatoires et abcès douloureux** évoluant vers la fistulisation ou la formation de cicatrices hypertrophiques, la présence de pseudo-comédons,
- **l'atteinte des plis** : aisselles, plis inguinaux, seins et plis sous-mammaires, pli interfessier, pubis, région périanale/périnéale,
- le **caractère chronique et récidivant** des lésions avec une évolution au moins sur 3 mois ou la notion d'au moins 2 poussées en 6 mois<sup>39</sup>. La maladie peut également être présente en continue.

Il existe une importante hétérogénéité clinique de la maladie, avec parfois la présence de lésions atypiques (folliculites/forme acnéiforme) et/ou des localisations ectopiques (tronc, abdomen, membres, barbe, cuir chevelu, pli rétro-auriculaire)<sup>40</sup>. L'HS ne doit pas être confondue avec d'autres atteintes infectieuses comme les abcès, les furoncles, la syphilis nodulo-ulcéralive ; des affections inflammatoires notamment la maladie de Crohn pour l'atteinte périnéale et d'autres dermatoses touchant les annexes cutanées telles que l'acné conglobata ou le sinus pilonidal.

## **B2. Score de sévérité**

Plusieurs scores de classification existent pour mesurer la sévérité et l'évolutivité de la maladie et apporter une aide à la prise en charge thérapeutique. Cependant, la grande hétérogénéité clinique et topographique de l'HS explique qu'actuellement aucun score ne permette de décrire l'ensemble des situations rencontrées et de répondre aux besoins des différents intervenants dans cette pathologie. Ainsi, les instruments cliniques existants sont mal utilisés et peu connus mais ils sont les seuls à pouvoir suivre l'évolution de la pathologie car aucun examen complémentaire n'existe pour le suivi de l'HS, tout repose sur des critères cliniques. Nous décrivons les principaux scores utilisés dans la prise en charge des patients<sup>41</sup> :

- **La classification de Hurley<sup>42</sup> (tableau 1)** du nom du chirurgien qui la décrit, est à but chirurgical. Son utilisation est simple et facilement reproductible. Elle est utile pour la prise de décision chirurgicale en particulier dans l'atteinte des plis axillaires. Elle est moins adaptée aux autres localisations. Par son caractère statique et l'absence de quantification, elle ne permet pas d'évaluer l'efficacité des traitements chez un patient ou lors d'essais pharmaceutiques<sup>43</sup>. De plus, elle porte sur la description clinique d'une seule localisation de la maladie et ne peut donc rendre compte de la gravité globale chez un patient. Il faut également préférer le terme de « grade » I à III plutôt que de stade car il n'existe pas d'évolutivité en termes de sévérité ou très peu chez les patients. Un patient de grade II restera probablement au même grade tout au long du suivi de la maladie. Il a été estimé dans une étude française que deux tiers des patients sont au grade I, un tiers des patients ont une forme modérée de grade II et moins de 5% sont à un stade sévère<sup>44</sup>.

**Tableau 1.** Classification de sévérité de l'HS par Hurley<sup>41</sup>.

Classification de Hurley	
<b>Grade I</b> Forme légère	Abcès unique ou multiples sans fistules ni processus cicatriciel fibreux
<b>Grade II</b> Forme modérée	Abcès récidivants avec formation de fistules et de cicatrices hypertrophiques. Lésion unique ou lésions multiples séparées les unes des autres.
<b>Grade III</b> Forme sévère	Atteinte diffuse ou quasi diffuse ou fistules interconnectées et abcès sur toute l'étendue de la zone atteinte.

- **Le score Sartorius** est plus détaillé et global que la classification de Hurley. Il a été publié en 2003<sup>45</sup> puis a été modifié en 2007<sup>46</sup>. Il comprend le nombre de zones atteintes, le type de lésions élémentaires, la distance maximale entre les lésions d'une même zone et la présence ou non de peau saine dans la zone atteinte. Ce score est long à réaliser mais il est plus dynamique que la classification de Hurley. Il est facilement reproductible. Cependant, les données recueillies évaluent l'atteinte globale ainsi que locale de la maladie et mélange lésions inflammatoires et cicatricielles. Ce caractère hybride n'est pas optimal

dans l'évaluation au long cours du patient. Plusieurs variantes de ce score, afin de l'améliorer, ont été réalisées mais au prix d'une complexification à sa réalisation.

- **Le score IHS4** (*Hidradenitis Suppurativa Severity Score System*) pondère de manière croissante le type de lésion : nodules (1 point), abcès (2 points) et sinus (4 points). Ce score international a été validé<sup>47</sup>. Il existe une bonne corrélation de ce score avec les scores d'autoévaluation patient concernant la douleur et la qualité de vie<sup>48</sup>.
- **Le score PGA-HS** (*Physician Global Assessment HS*) prend en compte le nombre de nodules non inflammatoires, de nodules inflammatoires et de lésions suppuratives (abcès et fistules avec écoulement) dans une localisation spécifique ce qui permet de déterminer 6 niveaux de sévérité<sup>49</sup>. Il existe une bonne concordance avec d'autres échelles en particulier celui de la douleur/EVA (*échelle visuelle analogique*) qui est l'autoévaluation de la douleur par le patient. Cet instrument est bien adapté à l'évaluation de la réponse à un traitement dans l'HS et par sa simplicité, il peut être utilisé facilement en consultation médicale.
- **Le HiSCR** (*HS Clinical Response*) permet de définir un critère principal de réponse à un traitement<sup>50</sup>. L'objectif est de diminuer au moins de 50% le nombre de lésions inflammatoires (nodules, abcès et fistules) et de ne pas avoir l'apparition de nouvelles lésions inflammatoires. Ce score a été validé et il est actuellement utilisé dans l'évaluation des traitements dans le cadre d'études pharmaceutiques. Cependant, il est moins corrélé aux scores d'autoévaluation des patients.

Une équipe a proposé un système d'évaluation échographique combiné au score de Hurley pour l'HS (SOS-HS)<sup>51</sup>. Cet examen permet d'identifier les lésions subcliniques facilitant ainsi le diagnostic et l'évaluation de la gravité de la maladie<sup>52</sup>.

Les autoévaluations par le patient sont des aides complémentaires très utiles dans la prise en charge de la maladie :

- L'EVA permet d'évaluer l'intensité de la douleur des patients grâce à une

échelle visuelle ou numérique allant de 0 à 10. Il est facile à réaliser en pratique quotidienne.

- Le DLQI (*Dermatology Life Quality Index*) est le score qualité de vie le plus utilisé par sa validation et sa simplicité de réalisation. Il permet d'évaluer le retentissement de la maladie et la qualité de vie des patients. Cependant il s'agit d'un score général utilisé dans plusieurs autres dermatoses inflammatoires (psoriasis, dermatite atopique, ...).
- Des outils d'évaluation de qualité de vie spécifiques ont été développés et validés pour l'HS : HiSQOL (*The Hidradenitis Suppurativa Quality Of Life*)<sup>53</sup> ce questionnaire comprend 17 items adaptés à la maladie (présence de suppurations, odeurs), HSQoL-24<sup>54</sup> et des questionnaires rapportés par les patients (patient-reported outcome PRO)<sup>55</sup>.
- Il a également été mis en place, récemment, un outil graphique permettant de représenter au mieux le fardeau vécu par les patients atteints d'HS, nommé HIDRADisk<sup>56</sup>.

### B3. Phénotypes de la maladie

La présentation clinique de l'HS est très variable par sa topographie, ses différentes lésions élémentaires, sa sévérité et son évolution expliquant les difficultés diagnostiques. Cette variation phénotypique pourrait être le reflet de processus physiopathologiques différents mais à ce jour encore mal comprises ce qui complexifie la classification de la maladie. Il a d'ailleurs été montré que la fiabilité inter-juge concernant les phénotypes de l'HS était faible et donc peu utile en pratique clinique<sup>57</sup>. Cette variation de profil clinique est également liée au sexe du patient.

L'équipe de Canoui-Poitrine a distingué 3 phénotypes sur 618 patients<sup>58</sup> :

- **phénotype « axillo-mammaire » (48 % de la population d'étude)** avec une atteinte préférentielle des plis sous-mammaires et axillaires et présence de lésions de type nodule et cicatrices en ponts. Ce phénotype « typique/classique » concerne principalement les femmes présentant une obésité.
- **phénotype « folliculaire » (26 %)** avec une atteinte diffuse : axillaires, mammaires, rétro-auriculaires, thoraciques, du dos, des membres et ayant des

lésions de type folliculaires (kystes épidermiques, comédons, sinus pilonidal). Cette forme sévère était plus fréquente chez les hommes fumeurs.

- **phénotype « fessier/glutéal » (26 %)** avec une atteinte prédominante sur la région fessière avec des lésions à type de papules et folliculites touchant le plus souvent des hommes ayant un indice de masse corporelle (IMC) normal.

Ce modèle simplifie de manière globale les liens génotype-phénotype dans l'HS et ne présente pas d'intérêt dans le choix du traitement ainsi que dans le pronostic de la maladie.

L'équipe de Van Der Zee a décrit 6 phénotypes d'HS : (i) forme classique ; (ii) forme d'abcès frictionnels ; (iii) forme de folliculite cicatricielle ; (iv) forme conglobata, (v) forme syndromique et (vi) forme ectopique<sup>59</sup>.

Récemment, il a été proposé de distinguer plutôt la maladie en deux phénotypes distincts : folliculaire et inflammatoire, car le phénotype inflammatoire est associé à un pronostic plus sévère de la maladie<sup>60</sup>. Ces différentes classifications distinguent finalement les formes classiques inflammatoires localisées aux plis, les formes atypiques de type folliculaire plus diffuse atteignant parfois le visage et les formes syndromiques considérées comme de véritables maladies auto-inflammatoires<sup>61</sup>. L'identification de phénotypes est importante sur le plan clinique puisqu'ils pourraient être associés à un pronostic variable et nécessiter des stratégies thérapeutiques différentes. Le classement en phénotypes peut être utile si les caractéristiques sont cliniquement distinctes permettant une fiabilité inter- et intra-évaluateur importante ce qui n'est actuellement pas le cas.

## **B4. Comorbidités-Associations**

L'HS n'est pas seulement une dermatose inflammatoire cutanée, il s'agit d'une maladie inflammatoire systémique. L'HS est associée à un nombre élevé de comorbidités en particulier auto-inflammatoires<sup>62-64</sup> mais également auto-immunes et métaboliques qui jouent un rôle sur la gravité de la maladie et la qualité de vie des patients. Les comorbidités indépendamment associées à l'HS sont majoritairement de nature cardio-vasculaires (diabète, syndrome métabolique, hypertension artérielle, dyslipidémie, athérosclérose, obésité, tabagisme), inflammatoires (maladies inflammatoires du tube digestif/MICL, spondylarthropathie, pyoderma gangrenosum) et psychologiques (anxiété, addictions, dépression, suicide) entraînant un impact majeur

sur la qualité de vie de ces patients. La plupart des études évaluant ces facteurs de risque sont observationnelles ce qui explique que le lien de causalité reste encore difficile à définir.

L'HS est associée à de nombreux facteurs de risque cardiovasculaire (l'obésité, le tabagisme, le diabète, la dyslipidémie...). Il a d'ailleurs été montré que la durée de vie moyenne d'un patient atteint d'HS était significativement réduite en lien principalement avec les comorbidités cardiovasculaires. En effet, l'âge moyen au décès était de 60,5 ans pour les patients-HS, de 71,1 ans pour les patients atteints de psoriasis (dermatose inflammatoire) et de 75,2 ans pour les témoins<sup>65</sup>. Il s'agit notamment d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux et de décès d'origine cardiovasculaire qui sont d'ailleurs regroupés sous le terme d'événements cardiovasculaires indésirables majeurs (MACE) et sont de véritables problèmes de santé publique. Il a été montré que l'inflammation, en particulier, l'élévation du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 circulants peuvent induire un dysfonctionnement endothélial et ainsi favoriser l'athérosclérose et la formation de thrombose<sup>66</sup>. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 sont deux cytokines pro-inflammatoires, dont le taux sérique est élevé chez les patients HS.

Les MICI sont comme l'HS des affections inflammatoires chroniques et récurrentes de l'épithélium digestif en lien avec des altérations de la flore commensale. Il existe également des épisodes de suppuration et une inflammation granulomateuse aboutissant à la formation de fistules et de sinus. Elles partagent des signatures cytokiniques semblables et des traitements communs. Il était montré chez 50 000 patients atteints d'HS que la prévalence de la maladie de Crohn était de 2 %, contre 0,6 % chez les témoins. Les patients atteints d'HS avaient 3 fois plus de risque de développer une maladie de Crohn que la population générale<sup>64,67</sup>.

De même, la spondylarthrite ankylosante est une maladie inflammatoire dont les médiateurs sont communs à l'HS, notamment le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-17, suggérant un lien biologique entre ces pathologies. Il a été montré, sur 1 700 patients atteints d'HS, que la prévalence des spondylarthropathies était de 52,5 % contre 3 % chez les sujets témoins<sup>62</sup>. Après ajustement, le risque de spondylarthrite chez les patients atteints d'HS était de 1,5 à 9,4 fois plus élevé que la population générale<sup>64,68</sup>.

Dans le cadre de la dépression, il a été montré un niveau élevé de cytokines circulantes telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans le sérum des patients avec une corrélation sur la gravité de la dépression<sup>69</sup>. L'utilisation de l'interféron en cancérologie peut également entraîner des troubles dépressifs chez les patients même dépourvus d'antécédents psychiatriques. L'activation du système immunitaire peut ainsi induire

des troubles de l'humeur jusqu'à la dépression avec des symptômes tels que l'anorexie, l'isolement social et l'anhédonie. Ainsi, l'altération de la qualité de vie des patients HS ainsi que l'instauration d'une inflammation chronique peuvent contribuer au risque de dépression, d'anxiété et de suicide. La prévalence de la dépression est élevée chez les patients HS de l'ordre de 26 %, après ajustement, elle est 1,3 à 4,8 fois plus importante que la population témoin<sup>64</sup>. Le taux de dépression est corrélé à la gravité de l'HS. Les registres nationaux européens décrivent une incidence plus élevée de suicide chez les patients atteints d'HS. En Finlande, 4,4 % des décès chez les patients atteints d'HS étaient dus à un suicide, contre 1,8 % chez les témoins. Le risque de suicide chez les patients HS était significativement augmenté de 2,8 % (IC à 95 %, 1,7-4,5 %) par rapport à la population générale<sup>64</sup>.

Il a également été montré que la prévalence des patients atteints d'HS ayant des troubles liés à l'utilisation de substances psychoactives était de 4% contre 2% chez les témoins. Cette augmentation de risque chez les patients HS s'expliquait par la présence de douleurs chroniques et les conséquences physiques, émotionnelles et psychologiques de la maladie. Les substances consommées les plus courantes étaient l'alcool suivis des opioïdes et du cannabis<sup>64</sup>. Dans une étude de cohorte, sur 20 000 patients atteints d'HS naïfs d'opiacés, l'incidence de l'utilisation chronique d'opioïdes sur un an était de 0,3 %, soit le double par rapport aux témoins. Les patients atteints d'HS avaient 1,5 fois plus de risque de développer un usage chronique d'opioïdes<sup>70</sup>. L'utilisation du cannabis concernait 430 des 1315 patients HS soit une prévalence de 29,7%<sup>70</sup>.

La douleur parfois intense, les suppurations purulentes itératives, les mauvaises odeurs et la limitation des mouvements font que l'HS est jugée comme l'une des dermatoses les plus handicapantes et pénibles pour le patient<sup>71</sup>. Plus de la moitié des patients ont présenté une douleur récente liée à l'HS qu'ils ont jugé comme modérée à sévère et 5 % d'entre eux l'ont décrit comme étant la pire douleur ressentie<sup>38</sup>. Cette maladie affecte tous les domaines de vie, que ce soit la vie professionnelle/l'éducation ou la vie personnelle avec les loisirs, la sexualité, l'image de soi<sup>72</sup>. Les conséquences sont considérables avec une isolation sociale, la présence d'addictions, un risque élevé de dépression/suicide, une diminution du niveau socio-économique<sup>73,74</sup>. Ces associations sont importantes à connaître puisqu'une étude de cohorte américaine a évalué que le dépistage et la prise en charge précoce des comorbidités dans l'HS pouvaient réduire la mortalité<sup>63</sup>.

## B5. Formes syndromiques

Il existe trois formes syndromiques de l'HS : le syndrome d'occlusion folliculaire, les syndromes auto-inflammatoires et l'HS associée aux syndromes génétiques.

**Le syndrome d'occlusion folliculaire ou tétrade folliculaire** associe HS, acné conglobata, cellulite disséquante du cuir chevelu et le sinus pilonidal. C'est à partir de ce syndrome qu'il a été proposé le terme d'acné inversé pour l'HS. L'acné conglobata est une forme d'acné sévère, étendue, nodulaire, inflammatoire et suppurative, laissant une rançon cicatricielle majeure. Elle peut atteindre le visage, le cou, le tronc et les membres. Il s'agit d'un diagnostic différentiel de l'HS. Il peut exister des manifestations systémiques notamment articulaires et une hyperthermie. Le sinus pilonidal est une lésion due à la pénétration transcutanée de follicules pileux dans le sillon interfessier entraînant de l'inflammation et causant des suppurations et parfois une fistulisation. Il est dans un tiers des cas associé à l'HS. La cellulite disséquante du cuir chevelu est une alopécie cicatricielle primaire neutrophilique rare. Elle est caractérisée par des plaques alopéciques et la présence de nodules purulents parfois douloureux du cuir chevelu. L'ensemble de ces atteintes prédomine chez les hommes.

**L'HS fait également partie de syndromes auto-inflammatoires** qui comportent de manière commune la présence d'une hyperthermie et une augmentation de marqueurs de l'inflammation sérique (VS, CRP).

Les entités décrites sont :

- *PAPASH syndrome* : Arthrite pyogénique, Pyoderma gangrenosum, Acné, Hidradénite Suppurée ;
- *PASH syndrome* : Pyoderma gangrenosum, Acné, Hidradénite Suppurée **(Annexe 1)** ;
- *PASS syndrome* : Pyoderma gangrenosum, Acné, hidradénite Suppurée et Spondylarthrite ankylosante ;
- *PsAPASH syndrome* : rhumatisme Psoriasique, Pyoderma gangrenosum, Acné, Hidradénite Suppurée.

Certains auteurs pensent que l'HS peut être intégrée dans le spectre des dermatoses neutrophiliques, comme le pyoderma gangrenosum. Dans une étude, il était montré, après ajustement, que sur 65 000 patients atteints d'HS, la probabilité

d'avoir un PG était 20 fois plus élevé comparé au groupe témoins<sup>75</sup>. L'HS et le pyoderma gangrenosum présentent des caractéristiques communes telles que la présence de lésions cutanées suppuratives, un infiltrat inflammatoire riche en neutrophiles, une réponse thérapeutique aux anti-TNF $\alpha$  et une coexistence dans le cadre de syndromes auto-inflammatoires<sup>76</sup>.

### **L'HS peut également être associé à des syndromes génétiques :**

- Syndrome de Down ou trisomie 21 : Dans des cohortes de patients atteints de trisomie 21, la prévalence de l'HS était estimée entre 2,1 à 14,6%. Cette association pourrait être attribuée à une altération de l'expression de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) qui se trouve sur le chromosome 21, son expression serait augmentée dans la trisomie 21. La  $\gamma$ -sécrétase clive l'APP et les récepteurs Notch, des mutations perte de fonction sur des gènes codant pour ce complexe protéique ont été décrites chez les patients HS. Il a été montré que des taux élevés d'APP pourraient altérer le clivage des récepteurs Notch par la  $\gamma$ -sécrétase et ainsi favoriser l'HS<sup>77</sup>. Les particularités de l'HS en association avec la trisomie 21 étaient l'absence de tabagisme, un début à un âge précoce, des antécédents familiaux peu fréquents et un phénotype folliculaire prédominant<sup>78</sup>.
- La maladie de Dowling-Degos est une génodermatose rare caractérisée par une pigmentation réticulée des plis. Il s'agit d'une maladie bénigne qui entraîne des lésions folliculaires, des comédons et des cicatrices acnéiformes du visage, et des régions génito-fessières. Il a été décrit plus d'une vingtaine de cas d'association entre la maladie de Dowling-Degos et la maladie de Verneuil, c'est 2 maladies comportent une occlusion folliculaire et surviennent dans les mêmes zones, une majorité des patients comportait une mutation dans le gène PSENEN (*Presenilin Enhancer Gamma-Secretase Subunit*). PSENEN code pour la protéine préséniline 2, un membre du complexe enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase. La  $\gamma$ -sécrétase est responsable du clivage intracellulaire des récepteurs Notch qui sont nécessaires à l'activation de la signalisation Notch. Une altération de la signalisation Notch peut entraîner des troubles pigmentaires et provoquer une hyperkératose épidermique et folliculaire ainsi que la formation de kystes épidermiques compatible avec les lésions cutanées

décrites dans les 2 maladies.

- KID (*Keratitis-Ichthyosis-Deafness*) syndrome est un trouble dysplasique rare d'origine ectodermique, caractérisé par une kératite bilatérale progressive, une atteinte cutanée ichtyosique et une surdité sévère. Il existe des mutations dans les gènes des connexines 26 et 30 ce qui provoque une hyperprolifération des kératinocytes contribuant ainsi à une occlusion folliculaire. Ces anomalies sont également retrouvées dans l'HS. Il a été décrit 5 patients présentant un KID syndrome et une HS concomitante, ils étaient tous atteints de la triade d'occlusion folliculaire (acné, HS, cellulite disséquante du cuir chevelu)<sup>79</sup>.

## **B6. Complications**

Au cours de l'HS, il existe des complications en lien notamment avec l'inflammation aiguë et chronique causée par la maladie.

- **Les complications aiguës :**

- **Les infections bactériennes (abcès, dermo-hypodermite)**

L'inflammation persistante des lésions cutanées d'HS provoque au long cours la destruction tissulaire et la formation de fistules sous cutanées qui sont favorables à la pullulation microbienne et la formation de biofilm bactérien. Ces lésions surinfectées peuvent donc évoluer vers un abcès, une dermohypodermite bactérienne voir parfois une ostéite<sup>80</sup>.

- **Les complications chroniques :**

- **Limitation des mobilités articulaires**

Les cicatrisés des lésions d'HS sont caractéristiques, elles sont hypertrophiques et linéaires prenant un aspect rétractile dite en « pattes de crabe ». Ce type de cicatrice aux plis axillaires peut entraîner une réduction de l'élévation du membre supérieur et provoquer un handicap physique.

- **Lymphœdème**

Par ailleurs, cette rétraction fibreuse peut également être la cause d'une obstruction lymphatique et de l'apparition d'un lymphœdème<sup>81</sup>. Les cicatrices des lésions localisées aux plis inguinaux peuvent être responsable de lymphœdème de la vulve et

des lèvres chez les femmes et du pénis et scrotum chez l'homme<sup>81</sup>.

### ➤ **Amylose AA**

Par ailleurs, la présence d'une inflammation chronique entraîne au long cours des atteintes systémiques notamment une anémie<sup>82</sup>, une hypoprotéïnémie jusqu'à évoluer vers une amylose AA<sup>83</sup>. L'amylose AA est due à une augmentation de la production de la protéine sérique amyloïde A (SAA) dans le cadre d'une inflammation incontrôlée au long cours. En cas d'accumulation de la SAA, cette dernière se dépose dans les tissus en particulier le rein et le système digestif. Le pronostic est lié à l'atteinte et au dysfonctionnement rénal.

### ➤ **Carcinomes épidermoïdes cutanés**

La transformation des lésions chroniques d'HS en carcinome épidermoïde est considérée comme une complication rare mais étant la plus sévère. La prévalence du carcinome épidermoïde associé à l'HS est estimée à 4,6 %. Cette transformation est plus fréquente chez les hommes et survient le plus souvent dans les régions fessières ou périanales<sup>84</sup>. Le diagnostic est souvent retardé et le pronostic est sombre. Récemment, l'infection par le papillomavirus humain (HPV) et le tabagisme ont été identifiés comme des facteurs de risque de développer un carcinome épidermoïde chez des patients HS<sup>85</sup>.

## **B7. Epidémiologie et facteurs de risque de l'hidradénite suppurée**

### **B7.1) Epidémiologie**

L'HS débute souvent après la puberté, la tranche d'âge la plus concernée se situe entre 20 et 40 ans et sa fréquence décline au-delà de 50 ans. L'HS touche préférentiellement les femmes avec un sex-ratio de 3 femmes touchées pour 1 homme. La prévalence de l'HS est variable dans le monde allant de 0,00033% à 4,10% en population générale<sup>86</sup>, variant selon le pays, le mode de recueil, les origines ethniques et le mode de vie. En Europe, la prévalence de l'HS est estimée à 0,7%<sup>87</sup>. Néanmoins une étude récente cas-témoins réalisée au Danemark a estimé une prévalence de l'HS à 1,8 %<sup>88</sup>. La prévalence de l'HS est 2 à 3 fois plus fréquente chez les Afro-Américains comparée aux Caucasiens<sup>89</sup>. Cette maladie n'est donc pas rare, néanmoins, elle reste encore méconnue de la communauté médicale avec un retard

diagnostic estimé à 7 ans<sup>84,90</sup>. Une étude de cohorte aux Etats-Unis montrait que seulement 20% de patients HS avaient pu rencontrer un dermatologue<sup>91</sup>. Une meilleure sensibilisation sur la maladie et une amélioration de l'accès au soin permettraient une prise en charge précoce et adaptée.

## **B7.2) Facteurs de risque**

### ***B7.2.1. Tabagisme***

Il existe une association significative entre le tabagisme et l'HS sans que toutefois la relation de causalité n'est pu être démontrée. Il a été montré que la nicotine présente dans le tabac pouvait induire une hyperplasie kératinocytaire de l'infundibulum<sup>92</sup> et une inflammation épidermique<sup>93</sup>. Il joue donc un rôle dans l'occlusion folliculaire. De plus, le tabac entraîne une altération de la réponse immunitaire cutanée, une augmentation de la virulence microbienne, une diminution de la production des PAMs modifiant le microbiote cutané, une libération de TNF- $\alpha$  par les KCs et les lymphocytes T<sub>H</sub>17 (*T helper*) et une altération du chimiotactisme des neutrophiles ce qui pourrait expliquer son action dans l'HS<sup>64,93</sup>.

On estime que 70 à 90% des patients atteints d'HS sont fumeurs<sup>94,95</sup>. Grâce à une large cohorte aux États-Unis, il a été décrit une augmentation de 90% du risque de nouveau diagnostic d'HS en cas de tabagisme actif par rapport aux non-fumeurs, ce qui pourrait suggérer que le tabagisme pourrait être un facteur de risque<sup>96</sup>. De plus, les patients HS présentant un tabagisme actif avaient une atteinte lésionnelle plus sévère<sup>97,98</sup>. Il a été montré que le facteur le plus important associé à une insatisfaction du traitement pour l'HS était le tabagisme actif<sup>99</sup>, du fait d'une maladie plus sévère et/ou d'une plus grande résistance thérapeutique. Le tabac est donc un facteur de risque modifiable affectant l'incidence, la sévérité et la résistance aux traitements de l'HS<sup>89,94</sup>. Il a été mis en évidence que les patients non-fumeurs ou ex-fumeurs avaient 2,6 fois plus de chances d'obtenir une réduction des symptômes de l'HS en réponse à une première ligne thérapeutique en comparaison aux patients fumeurs<sup>100</sup>. De même, les patients non-fumeurs avaient 2,8 fois plus de chances d'être en rémission de l'HS comparé aux patients fumeurs<sup>101</sup>. Il est clair que le sevrage partiel ou complet du tabac doit être encouragé notamment en termes de cicatrisation des plaies, de diminution des risques cardio-vasculaires et d'amélioration de la santé générale du patient.

### **B7.2.2. Surpoids-Obésité**

Le facteur de risque le plus fréquents des patients-HS est le surpoids-obésité. L'obésité a été corrélée au risque de développer l'HS et à sa gravité<sup>102-104</sup>. L'association HS et obésité s'explique d'une part par la génération de frictions mécaniques plus importantes dans les plis favorisant ainsi l'occlusion folliculaire et la rupture des kystes<sup>84,93</sup>. D'autre part, l'obésité en augmentant les zones de plis provoque plus d'humidité ce qui favorise la prolifération bactérienne. Enfin, l'obésité induit une réponse inflammatoire chronique par les macrophages présents dans la graisse viscérale et qui produisent des cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- $\alpha$ <sup>84,93</sup> expliquant également une résistance thérapeutique plus grande.

Il est évalué que 50 à 75% des patients-HS présentent un IMC $\geq$ 25<sup>105</sup>. Les patients-HS ayant un IMC élevé avaient une maladie plus sévère, avec plus de zones lésionnelles et des scores d'autoévaluation plus péjoratifs que les patients-HS ayant un IMC $<$ 25<sup>106</sup>. Il a été montré que les patients-HS présentant une obésité (IMC $>$ 30) avaient une moins bonne réponse de manière significative à la biothérapie par adalimumab (anti-TNF- $\alpha$ )<sup>107,108</sup>. De même, l'efficacité des antibiotiques oraux, dans le traitement de l'HS, était réduite si l'IMC des patients était élevé<sup>109</sup>. Le surpoids ou l'obésité semble être associé à une atténuation de la réponse au traitement pouvant être expliqué par le volume de distribution plus important chez ces patients. Plusieurs études ont mis en évidence un bénéfice d'une perte de poids induite par chirurgie bariatrique ou par un régime alimentaire, sur la sévérité de l'HS chez les patients souffrant d'obésité<sup>110-112</sup>.

L'HS est également associée au syndrome métabolique qui regroupe le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité abdominale et les dyslipidémies<sup>113</sup>. Le lien physiopathologique entre l'obésité/le syndrome métabolique et l'HS est encore mal compris, à savoir si l'une de ces affections est un facteur causal de l'autre ou si elles se développent simultanément sur un fond immunologique commun. L'une des hypothèses avancées est que la dyslipidémie et/ou l'obésité favorise l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires, responsables d'inflammation et de recrutement de cellules immunitaires de type neutrophiles et lymphocytes T<sub>H</sub>17 participant à la physiopathologie de l'HS<sup>114</sup>. Ces données sont actuellement démontrées dans le psoriasis qui est également une dermatose inflammatoire chronique<sup>115</sup>.

### **B7.2.3. Rôle hormonal**

L'HS débute majoritairement après le début de la puberté et la maladie semble être moins active après la ménopause<sup>116,117</sup>. En effet, les glandes apocrines contiennent l'enzyme 5-alpha réductase active sur la testostérone qui est fonctionnelle à partir de la puberté période à laquelle débute les premiers signes de l'HS<sup>39</sup>. De plus, l'HS concerne préférentiellement le sexe féminin et certaines patientes peuvent présenter des poussées inflammatoires prémenstruelles<sup>118</sup>, c'est-à-dire lors de la phase lutéale du cycle, au moment où les ovaires sont stimulés par les androgènes. Durant la grossesse, les résultats sont variables, environ un quart des patientes auront une amélioration de l'HS, la majorité présentera une stabilisation et 20% des patientes subiront une aggravation de la maladie, et plus de la moitié des patientes auront une poussée d'HS après l'accouchement<sup>117,119</sup>. Ces données suggèrent une participation des hormones sexuelles en particulier des androgènes dans la physiopathologie de la maladie<sup>120</sup>. Par ailleurs, l'HS est associée au syndrome métabolique et donc à un hyperinsulinisme. Un taux élevé d'insuline peut indirectement accroître la sensibilité des androgènes circulants aux récepteurs androgéniques<sup>121</sup>. De plus, l'obésité également associée à l'HS, diminue le taux sérique de globuline liant les hormones sexuelles (SHBG), provoquant une augmentation des androgènes circulants<sup>121</sup>. Cependant, les séries de cas publiées n'ont pas un niveau de preuve suffisant pour l'utilisation des anti androgènes dans l'HS. Leur utilisation reste limitée aux patientes présentant des troubles hormonaux associés<sup>122</sup>.

### **B7.2.4. Hérité, formes familiales**

Plus d'un tiers des patients souffrent de formes familiales d'HS révélant un mode de transmission autosomique dominante<sup>123</sup>. A partir de 2010, il a été mis en évidence des mutations hétérozygotes, perte de fonction, dans les gènes codant les protéines du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase. Cette dernière clive de nombreuses protéines transmembranaires, en particulier les récepteurs Notch. Cette protéase transmembranaire est composée de 4 sous-unités (**Illustration 3**) :

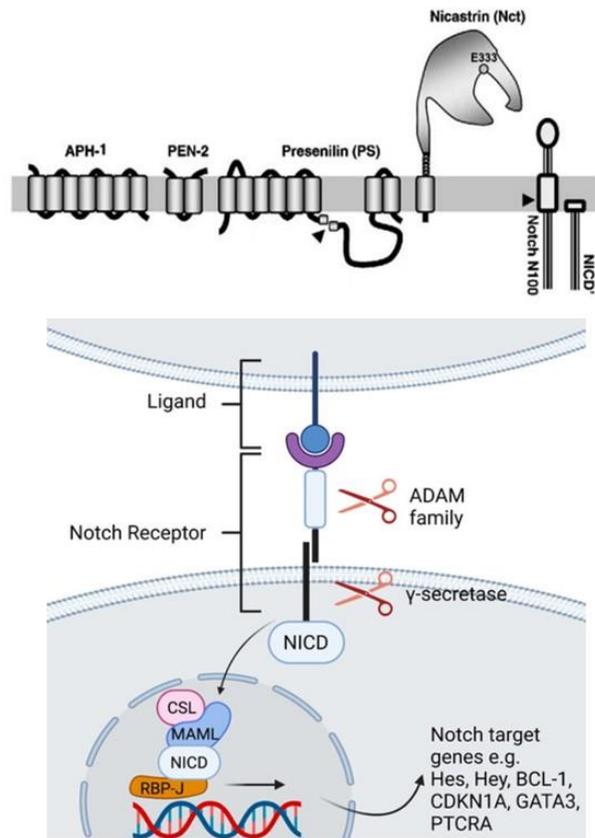
- la préséniline, sous-unité protéolytique (gènes PSEN1/2),
- la préséniline-enhancer 2 (gène PSENEN),
- la nicastrine (gène NCSTN),
- l'antérieur pharynx defective (gène APH1A/APH1B).

Actuellement, environ 41 mutations du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase ont été

décrites dans l'HS, dont 28 mutations concernent le gène de la *NCSTN*<sup>117,123–125</sup>, ce qui souligne son rôle central dans la maladie<sup>126</sup>. D'autres gènes de ce complexe sont également impliqués tels que *PSENEN* et *PSEN1*<sup>125</sup>. La nicastrine est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa, composée d'un domaine extracellulaire jouant un rôle majeur dans la reconnaissance du substrat par le complexe de la  $\gamma$ -sécrétase<sup>127</sup>. L'ectodomaine de la nicastrine est important car il comporte les sites de glycosylation nécessaire à la stabilisation de la protéine. En effet, en cas de mutation sur cette partie de la *NCSTN*, cela peut entraîner la perte de reconnaissance du substrat et donc de l'activation de la  $\gamma$ -sécrétase<sup>128</sup>. La nicastrine est donc nécessaire à l'assemblage du complexe, à sa maturation et à sa stabilité<sup>129</sup>.

Une équipe a montré, à partir d'un modèle murin *knockout* sur le gène de la *NCSTN*, que l'absence du gène *NCSTN* entraînait chez les souris le développement de lésions cutanées inflammatoires épidermiques et folliculaires (kératinisation folliculaire, kystes épidermiques et hyperplasie épidermique) caractéristiques de l'HS<sup>130</sup>. Il a également été décrit qu'un traitement par inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase, dans un modèle murin, entraînait le développement de lésions cutanées similaires que chez les souris *NCSTN*<sup>-/-</sup>. Les auteurs suggéraient donc qu'une déficience génétique en *NCSTN* pouvait réduire l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase.

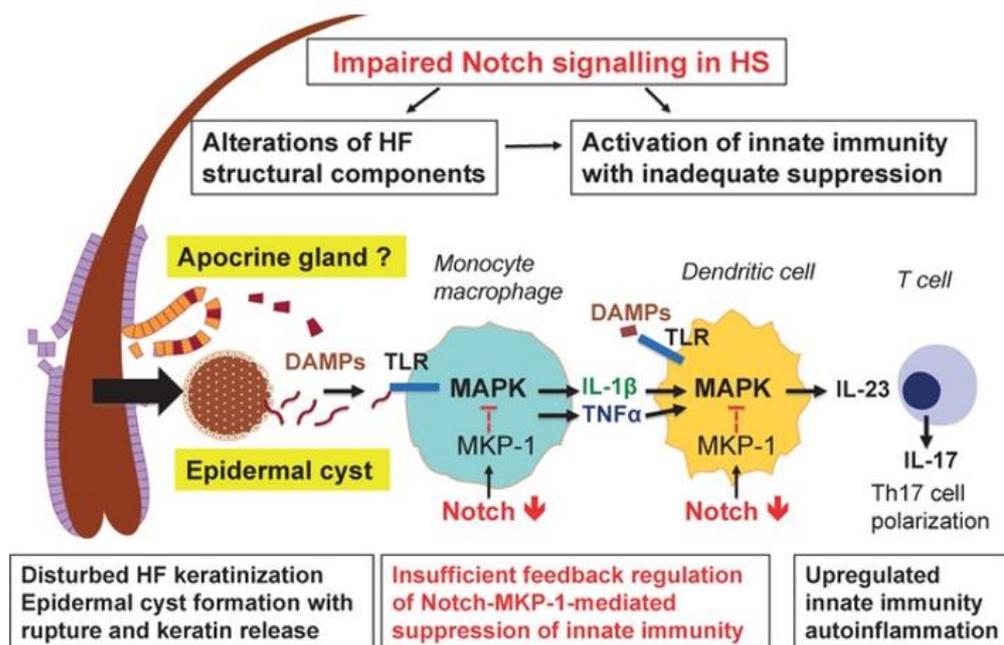
Les familles ayant des mutations sur le gène *NCSTN* ont la particularité d'avoir des formes atypiques d'HS, elles sont plus sévères, diffuses et résistent aux traitements<sup>132</sup>. Par ailleurs, un essai clinique évaluant un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase dans le traitement des tumeurs desmoïdes, le nirogacestat, a révélé chez 6 des 17 adultes traités, l'apparition de lésions folliculaires et kystiques dans les zones de plis cutanés<sup>133</sup>. Ces données indiquent que l'altération de la fonction de la  $\gamma$ -sécrétase joue un rôle crucial dans le développement de l'HS. Concernant les cibles de la  $\gamma$ -sécrétase, il y a notamment les récepteurs Notch. Il existe quatre récepteurs transmembranaires hautement conservés, Notch-1, -2, -3 et -4, et cinq ligands, à savoir jagged-1, -2, delta-like-1, -3 et -4. Dans la région transmembranaire des protéines Notch, deux clivages successifs se produisent aux sites S2 et S3 par la désintégrine/métalloprotéinase (ADAM) et la  $\gamma$ -sécrétase, respectivement (**Illustration 3**). Ce processus déclenche la libération du domaine intracellulaire de NOTCH (NICD-intracellular domain of Notch) dans le cytoplasme.



**Illustration 3.** Schéma modifié représentant la structure de la  $\gamma$ -sécrétase avec les différentes sous-unités et ses substrats ainsi que son implication dans la voie de signalisation Notch d'après Shah S et al., 2005<sup>127</sup> et Gallenstein N et al., 2023<sup>131</sup>.

Ensuite, le NICD se déplace vers le noyau et active les gènes cibles HEY/Hairy and enhancer of split related, HES/Hairy and enhancer of split, cycline D1 et p21. Ces gènes interviennent dans de nombreux processus cellulaires, en particulier dans l'épiderme, ils sont impliqués dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes, la différenciation terminale des follicules pileux et la régulation de la réponse immunitaire<sup>134</sup>.

Il a été décrit que l'altération de la voie Notch provoquait un trouble de différenciation des cellules de la gaine radulaire externe du follicule pileux favorisant ainsi la formation de kystes épidermiques<sup>135</sup> (**Illustration 4**). La voie Notch joue également un rôle important pour la réponse immunitaire en participant notamment à la régulation des lymphocytes T, des lymphocytes B, à l'activation des lymphocytes T, à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> (clusters de différenciation) et à la régulation des cellules de l'immunité innée comme les cellules lymphoïdes innées (ILCs)<sup>136,137</sup> (**Illustration 4**). La signalisation Notch joue donc un rôle essentiel dans l'acquisition de fonctions effectrices des cellules immunitaires<sup>134,138</sup>, elle intervient aussi bien dans l'immunité innée que dans l'immunité adaptative.



**Illustration 4.** Implication de la voie Notch dans l'HS d'après Bodo C et al., 2013<sup>135</sup>.

Par ailleurs, il a été observé que les changements épidermiques ainsi que ceux des follicules pileux présents chez des souris déficientes en  $\gamma$ -sécrétase sont identiques à ceux décrits par des souris déficientes en Notch 1 et 2<sup>139</sup>.

Ainsi, au vu des données issues de la voie Notch, une des hypothèses reprise par plusieurs auteurs<sup>126,135</sup>, serait que l'altération de cette voie semblerait être un mécanisme physiopathologique majeur dans l'HS pouvant être en lien avec les mutations observées de la  $\gamma$ -sécrétase.

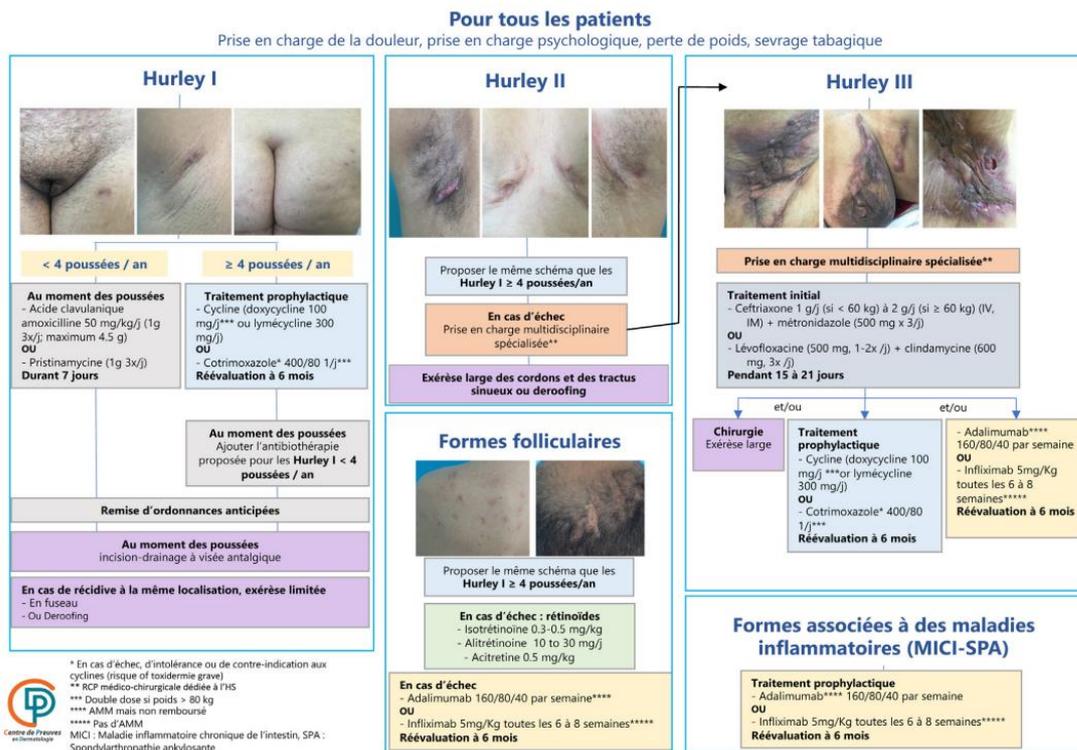
De nombreux variants pathogènes de gènes ont également été identifiés dans des cas d'HS sporadiques (non familiaux). Cependant, la fréquence d'identification de variants pathogènes est seulement de 5% sur l'ensemble des cas d'HS<sup>140</sup>. Il reste encore difficile aujourd'hui d'établir des corrélations entre génotype et phénotype de la maladie<sup>61,124,132</sup>. Ainsi, les mutations concernant la  $\gamma$ -sécrétase ne concernent qu'une minorité de patients HS, suggérant que l'altération de ce complexe protéique n'est pas suffisante à elle seule pour entraîner le phénotype d'HS<sup>141</sup>. L'HS est une maladie complexe par son caractère multifactoriel, polygénique et auto-inflammatoire.

En effet, l'HS fait partie de différents syndromes auto-inflammatoires décrits ci-dessus (PASS, PASH, PAPASH syndromes). Ces différents syndromes sont causés par des mutations activatrices dans le gène *PSTPIP1* (*proline-serine threonine phosphatase interacting protein 1*)<sup>123</sup> codant ainsi une protéine CD2-BP1 (*CD2-*

*binding protéine 1*) qui se lie alors à la pyrine activant ainsi l'inflammasome<sup>142</sup>. L'inflammasome est un complexe protéique présent dans les neutrophiles et les macrophages. En cas de mutation activatrice de ce complexe, cela entraîne une libération incontrôlée de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17, l'IL-23 et le TNF- $\alpha$ . Il a également été identifié d'autres variants sur des gènes de l'auto-inflammation tels que MEFV, POFUT1, FGFR2, NOD2, NLRP3, MVK, IL1RN...chez des patients atteints d'HS<sup>117</sup>, d'une forme syndromique<sup>123</sup> ou associée à d'autres maladies auto-inflammatoires comme la fièvre méditerranéenne familiale<sup>143</sup>. L'auto-inflammation joue donc un rôle majeur dans la pathogenèse de l'HS. Il reste donc encore à identifier d'autres gènes impliqués dans la physiopathologie de l'HS actuellement non connus. Ces facteurs génétiques pourraient favoriser l'apparition de l'HS mais également jouer un rôle dans le phénotype de la maladie. Ainsi, l'hétérogénéité génétique expliquerait en partie l'hétérogénéité clinique.

## **B8. Traitements actuels de la maladie**

La prise en charge thérapeutique de l'HS est un véritable défi par la complexité de la maladie et la persistance de zones d'ombre dans les connaissances sur la physiopathologie de l'HS. Aucun traitement médical ne permet d'obtenir une guérison de la maladie. Le traitement chirurgical est le seul à être curatif mais parfois au prix de délabrement tissulaire important et de limitations fonctionnelles majeures. Il est mis en place des algorithmes à plusieurs niveaux selon l'atteinte lésionnelle et l'intensité de la maladie afin d'aider dans le choix des traitements combinant parfois des antibiothérapies et des immunomodulateurs afin de cibler les médiateurs de l'inflammation<sup>64,144</sup> (**Illustration 5**). Récemment des recommandations françaises sur la prise en charge selon la sévérité de la maladie ont été élaborées afin de rendre la prise en charge de l'HS plus consensuelle<sup>39</sup>. L'objectif du traitement est de réduire la fréquence des poussées, de diminuer l'intensité des symptômes notamment le nombre de lésions et la douleur et d'améliorer la qualité de vie du patient. L'approche multidisciplinaire permet d'optimiser la prise en charge et le suivi du patient. Malheureusement, à l'heure actuelle, encore un patient sur deux se déclare insatisfait de son traitement pour l'HS<sup>99</sup>.



**Illustration 5.** Algorithme de prise en charge des patients selon la sévérité (classification de Hurley) et selon les formes d'HS<sup>39</sup>.

### B8.1) Mesures hygiéno-diététiques : pansement, hygiène de vie

Ces mesures sont recommandées selon un avis d'experts, ils n'ont pas fait l'objet d'une validation clinique :

- Il est recommandé aux patients d'avoir une hygiène quotidienne avec lavage à l'eau et au savon afin de limiter les odeurs en lien avec la colonisation bactérienne des plaies cutanées. Il est conseillé d'éviter le rasage, l'épilation à la cire et l'utilisation de produits dépilatoires car ils causent un stress mécanique et une inflammation locale. L'utilisation de la tondeuse, moins traumatique, ou encore l'épilation laser est à privilégier. Les déodorants en contact avec les zones lésionnelles (format « billes ») sont déconseillés. Il est recommandé de porter des vêtements amples et en matière coton afin d'éviter les frictions mécaniques.
- Il est nécessaire d'insister sur l'arrêt des facteurs favorisants/aggravants tels que le tabagisme. Il n'a jamais été prouvé que le tabac soit un facteur causal de l'HS, cependant, il a été montré que les patients HS fumeurs présentaient une plus grande résistance thérapeutique, les poussées étaient plus fréquentes et plus sévères<sup>94</sup>. Par ailleurs, le tabac peut altérer les capacités de cicatrisation notamment en cas d'exérèses larges dans le cadre de l'HS.

- Chez les patients en surpoids ou obèse, il est recommandé la mise en place d'un rééquilibrage alimentaire afin de favoriser la perte de poids car plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la sévérité de l'HS et l'élévation de l'IMC<sup>145</sup>. Aucun régime alimentaire n'est recommandé, on conseillera plutôt une alimentation équilibrée dans le cadre de la réduction du risque cardiovasculaire. En effet, les patients HS, ayant une perte d'au moins 15% de leur poids corporel total, présentait une maladie moins sévère<sup>144</sup>. Cette perte de poids avait plus d'impact sur les premiers grades de l'HS<sup>146</sup>.
- L'utilisation de pansements de type alginates ou hydrocellulaires permettent d'absorber les exsudats et limitent ainsi les suppurations, la macération et l'irritation. Des pansements au charbon peuvent avoir un intérêt dans le contrôle des odeurs. Ces éléments diminuent l'impact psycho-social de la maladie et offrent une meilleure qualité de vie.
- La prise en charge de la douleur est primordiale. Beaucoup de patients ressentent des douleurs chroniques d'origines multiples : inflammatoire, non inflammatoire, neuropathique, ischémique, psychologique. Le retentissement de la douleur surtout chronique est dévastateur. Elle peut être la source d'un mal être psychologique allant jusqu'à la dépression, le développement de troubles addictologiques ou alimentaires. Il est recommandé d'utiliser les antalgiques adaptés au type de douleur et de débiter les traitements progressivement du palier I puis des paliers supérieurs selon l'intensité de la douleur. Seuls les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ne sont pas recommandés à visée antalgique du fait d'un risque infectieux dans l'HS.
- Une évaluation du retentissement psychologique est nécessaire lors de la consultation. Cette évaluation peut déboucher sur la mise en place d'un soutien psychologique ou d'une prise en charge psychiatrique si nécessaire. Il faut également encourager les temps d'échanges entre patients *via* la mise en relation avec les associations de patients. Ce temps d'écoute et de prise en compte du retentissement de la maladie est un vrai bénéfice pour le patient. Une reconnaissance en affection longue durée (hors liste) peut être demandée par le médecin traitant.

## **B8.2) Traitements locaux**

### ***B8.2.1 Les antiseptiques***

Aucune étude n'a montré un gain en termes d'efficacité sur les lésions d'HS par rapport à un nettoyage des plaies à l'eau et au savon. De plus, les antiseptiques peuvent être sources de dermatite de contact et leur utilisation prolongée altère la flore microbienne cutanée.

### ***B8.2.2 Les antibiotiques locaux***

D'après les recommandations françaises de prise en charge de l'HS, les données sur l'utilisation des antibiotiques locaux dans la maladie ont un faible niveau de preuve<sup>39</sup>. Du fait d'un risque d'émergence de résistance bactérienne, il n'est pas recommandé de les utiliser.

## **B8.3) Traitements systémiques**

### ***B8.3.1 Gluconate de zinc***

Le zinc est un élément essentiel au développement de l'organisme, il est indispensable au fonctionnement de plus d'une centaine d'enzymes. Il est nécessaire à la prolifération cellulaire et intervient aussi bien dans l'immunité innée que adaptative notamment dans la différenciation et le fonctionnement des lymphocytes T<sup>147</sup>. Il a également été montré que le zinc inhibait les réponses inflammatoires médiées par les TLRs, notamment au niveau des muqueuses respiratoires, protégeant ainsi l'hôte contre les réponses inflammatoires incontrôlées liée aux agents pathogènes<sup>148</sup>.

Ce traitement n'a pas été retenu dans les recommandations françaises pour faible niveau de preuve<sup>39</sup> mais il est décrit dans l'arsenal thérapeutique européen de l'HS<sup>140</sup>. Il est utilisé plutôt à forte dose, au moins à l'initiation du traitement (90 mg/jour) et il est recommandé en traitement d'entretien pour les formes légères à modérées d'HS. Deux études ont décrit des effets bénéfiques du zinc chez des patients HS de grade Hurley I et II<sup>147,149</sup>.

### ***B8.3.2 Antibiothérapies***

Les antibiotiques oraux sont surtout utilisés en cas de poussée aiguë d'HS, dans le cadre d'une antibioprofylaxie secondaire et enfin en période préopératoire afin de limiter la zone d'inflammation et favoriser la cicatrisation. Du fait d'une

microbiologie variable des lésions d'HS, l'utilisation des antibiotiques oraux est probabiliste, à large spectre et à visée anti-inflammatoire. Les prélèvements bactériologiques locaux et les hémocultures ne sont réalisés qu'en cas d'infection bactérienne invasive.

D'après les recommandations françaises, une antibiothérapie par amoxicilline-acide clavulanique ou pristinamycine peut être proposée, en traitement séquentiel des poussées inflammatoires aiguës, chez les patients-HS de grade I et II de Hurley. S'il existe plus de 4 poussées par an, il est alors proposé une antibioprofylaxie secondaire par cyclines ou cotrimoxazole avec réévaluation thérapeutique à 6 mois. En cas de lésions sévères de grade Hurley III, il peut être proposé un traitement d'attaque par céphalosporine par voie injectable associée à une dose orale de métronidazole pour une durée limitée à 15-21 jours. L'association lévofloxacine et clindamycine ne doit plus être utilisée, du fait d'une alerte de l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) concernant les risques d'effets indésirables graves et irréversibles des fluoroquinolones. L'utilisation de l'association rifampicine et clindamycine est controversée car il a été montré que la rifampicine, par son effet inducteur sur le cytochrome P4503A4, augmente le métabolisme de la clindamycine diminuant ainsi sa concentration<sup>150</sup>. Cela compromet donc l'efficacité à long terme de cette association ainsi qu'un risque d'émergence de résistance bactérienne plus important. Toute mise en place d'une antibiothérapie doit être prescrite sur une durée limitée et doit être réévaluée du fait d'un risque d'émergence de résistance bactérienne, d'autant plus que leur effet thérapeutique n'est que suspensif.

### **B8.3.3 Antiandrogènes**

D'après les Recommandations Européennes, il est indiqué la mise en place d'un traitement hormonal en cas de trouble du cycle menstruel, de signes d'hyperandrogénie ou d'anomalie hormonale telle qu'un taux élevé de déhydroépiandrostérone (DHEA), d'androstènedione ou de SHBG<sup>140</sup>. Il a été montré un bénéfice clinique chez les patients HS traités par œstrogènes ou anti-androgènes (Spironolactone, Acétate de cyprotérone, Finastéride) alors que l'utilisation des progestatifs semble aggraver la maladie par leurs propriétés androgéniques. Cependant, ils ne sont pas recommandés dans l'indication spécifique du traitement de l'HS en France, car le niveau de preuve des études est faible en partie par le faible effectif de patients.

### **B8.3.4 Rétinoïdes**

D'après les recommandations françaises, le niveau de preuve est insuffisant pour recommander l'utilisation des rétinoïdes systémiques (isotrétinoïne, acitrétine et alitrétinoïne) dans l'HS<sup>39</sup>. Cependant, l'acitrétine fait partie des indications européennes de traitement de seconde intention pour les stades modérés d'HS<sup>140</sup>. En pratique, il est utile dans le traitement des formes folliculaires et comédoniennes d'HS et en cas d'échappement ou de mauvaise tolérance des antibiotiques. Chez la femme en âge de procréer, il sera utilisé plutôt l'alitrétinoïne ou l'isotrétinoïne du fait de leur durée plus limitée sur le risque tératogène que l'acitrétine.

### **B8.3.5 Biothérapie**

Une biothérapie est un traitement biotechnologique, fabriquée à partir de cellules vivantes. Il s'agit d'anticorps monoclonaux provenant de cellules de souris dont le patrimoine génétique a été modifié afin d'obtenir les molécules d'intérêts. Un anticorps, issu d'un clone unique de lymphocytes B, est spécifique d'une seule cible, c'est ce qu'on appelle un anticorps monoclonal. L'obtention de ces traitements est plus complexe ce qui explique leurs prix plus onéreux que les traitements conventionnels. Ils sont administrés par voie injectable car étant des protéines, les anticorps seraient détruits par la digestion gastrique. Bien que les traitements de l'HS ont une efficacité limitée, les biothérapies ciblant le TNF- $\alpha$ <sup>151,152</sup> ou l'IL-17<sup>153,154</sup> sont les traitements ayant montré la plus grande efficacité associée à une diminution de la douleur, de la fréquence des poussées et une amélioration de la qualité de vie<sup>153,155</sup>.

#### **➤ Les anti-TNF- $\alpha$**

L'adalimumab (Humira®, laboratoire AbbVie), antagoniste du TNF- $\alpha$ , est le premier traitement approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis dans l'HS. Cette biothérapie a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe, en 2015, pour l'HS modérée à sévère chez les adultes, en cas d'échec des traitements systémiques conventionnels.

Bien que l'adalimumab présente une efficacité supérieure aux autres traitements utilisés dans l'HS, tels que les antibiotiques systémiques à large spectre, les rétinoïdes oraux, son efficacité reste limitée. Les études PIONEER I et II, étude de phase 3, montrent une réponse clinique significative à 3 mois (définie par la réduction

d'au moins 50% des abcès et nodules inflammatoires sans apparition de nouvelles lésions) chez 41,8% des patients HS versus 26% dans le groupe placebo<sup>151</sup>. Initialement, le service médical rendu a été jugé insuffisant pour justifier d'une prise en charge par la sécurité sociale. Il faudra attendre mars 2021 pour obtenir le remboursement du traitement. Même si l'efficacité de l'adalimumab dans la prise en charge de l'HS reste modeste, son effet est supérieur à toutes les autres thérapeutiques disponibles actuelles<sup>144</sup>. Cependant, d'après une étude de cohorte aux Etats-Unis, il a été montré que moins de 2% des patients avaient pu bénéficier d'une biothérapie par anti-TNF- $\alpha$ <sup>156</sup>, probablement en lien avec le coût des soins à la charge du patient.

L'infliximab (Remicade®) est un autre anti-TNF- $\alpha$ . Il n'a pas d'AMM dans l'HS. Cependant, il a été utilisé dans cette maladie du fait de son analogie avec l'adalimumab. L'infliximab est délivré en milieu hospitalier et administré en intraveineux sous forme de perfusion. Son intérêt est la possibilité de moduler la posologie et la fréquence des perfusions afin d'optimiser les résultats surtout lorsque les patients présentent une obésité permettant d'optimiser la biodisponibilité du traitement.

### ➤ **Les anti-IL-17**

Le Sécukinumab (Cosentyx®, laboratoire Novartis), anticorps monoclonal humain anti-IL-17A, a obtenu en juin 2023 l'AMM dans le traitement de l'HS. Les études internationales de phase III, SUNSHINE et SUNRISE, ont démontré l'efficacité et la tolérance du Sécukinumab chez des adultes souffrants d'HS modérée à sévère. Le critère de jugement principal était le pourcentage de patients, obtenant une réponse clinique à la semaine 16, selon le score HiSCR, défini comme une réduction d'au moins 50 % du nombre d'abcès et de nodules inflammatoires, sans augmentation du nombre d'abcès et/ou de fistules drainantes par rapport à l'inclusion (HiSCR50). Dans l'essai SUNSHINE, incluant 676 patients HS, il a été montré que dans le bras Sécukinumab, 300 mg toutes les 2 semaines, 45% patients atteignaient le HiSCR50 contre 34% du groupe placebo ( $p=0,0070$ ) à S16<sup>153</sup>. Dans l'essai SUNRISE, il était retrouvé également des résultats significatifs, avec 42% des patients atteignant le HiSCR50 à S16 dans le bras Sécukinumab 300 mg toutes les 2 semaines contre 31% du groupe placebo ( $p=0,015$ ) et 46% des patients dans le bras Sécukinumab 300 mg toutes les 4 semaines contre 31% pour le groupe placebo ( $p=0,0022$ )<sup>153</sup>. Il était observé le maintien de la réponse après 52 semaines de traitement.

Beaucoup d'essais thérapeutiques sont en cours dans l'HS, ils concernent surtout les molécules de biothérapies<sup>84</sup> (**tableau 2**). Certaines ont été essayées, dans de petites séries de patients, notamment les anti-IL-1 (anakinra) et les anti-IL-12/23 (ustekinumab), avec de bonnes réponses<sup>157,158</sup> mais ne possèdent pas d'indications dans l'HS.

**Tableau 2.** Essais thérapeutiques en cours en 2020 dans l'hidradénite suppurée<sup>84</sup>.

Target	Drug name	Structure	Sponsor	Study start	Phase	Estimated enrolment	Status <sup>a</sup>	Trial number
G-CSF	CSL324	Monoclonal antibody	CSL Behring	July 2019	I	40	Recruiting	NCT03972280
IL-23 p19	Risankizumab	Monoclonal antibody	AbbVie	June 2019	II	190	Recruiting	NCT03926169
IL-17RA	Brodalumab	Monoclonal antibody	Florida Academic Dermatology Centers	May 2019	II	20	Not yet recruiting	NCT03910803
Cannabinoid receptors	Cannabis oil	Olive oil extract	TO Pharmaceuticals	May 2019	II	40	Not yet recruiting	NCT03929835
CD40	Iscalizumab	Monoclonal antibody	Novartis	February 2019	II	90	Recruiting	NCT03827798
Unknown	LYS006	Unknown	Novartis	February 2019	II	90	Recruiting	NCT03827798
IL-17A	Secukinumab	Monoclonal antibody	Novartis	February 2019	III	471	Recruiting	NCT03713632
IL-17A	Secukinumab	Monoclonal antibody	Novartis	January 2019	III	471	Recruiting	NCT03713619
C5a receptor	Avacopan (C5aR antagonist)	Small molecule	ChemoCentryx	December 2018	II	391	Recruiting	NCT03852472
JAK1	INCB054707	Small molecule	Incyte corporation	September 2018	II	36	Completed	NCT03607487
IL-23 p19	Guselkumab	Monoclonal antibody	Janssen Research & Development, LLC	September 2018	II	184	Active, not recruiting	NCT03628924
IL-1 $\alpha$	Bermekimab	Monoclonal antibody	XBiotech	June 2018	II	20	Recruiting	NCT03512275
C5a	IFX-1	Monoclonal antibody	InflaRX GmbH	February 2018	II	175	Active, not recruiting	NCT03487276
IL-17A and IL-17F	Bimekizumab	Monoclonal antibody	UCB Biopharma S.P.R.L.	September 2017	II	157	Completed	NCT03248531
Inflammation, protozoa	Hydroxychloroquine	Small molecule	Elena Gonzales Brant, MD	September 2017	I and II	17	Active, not recruiting	NCT03275870
PDE4	Apremilast	Small molecule	M.B.A. van Doorn, Erasmus Medical Center	February 2017	II	20	Completed	NCT03049267
PDE4	Apremilast	Small molecule	Florida Academic Dermatology Centers	July 2016	II	20	Completed	NCT02695212

## B8.4) Traitements physiques

### B8.4.1 La chirurgie

Lorsqu'il existe des lésions fistulisées (grade Hurley II ou III) voir une large zone inflammatoire et indurée (plastron), il est recommandé de réaliser une exérèse large sous anesthésie générale, prenant une marge de sécurité en latéral et en profondeur de 1 à 3 cm. Dans ce contexte, la suture directe n'est pas possible. Il est donc proposé soit une cicatrisation dirigée, soit la réalisation d'une greffe de peau mince ou d'un lambeau. Cette technique d'exérèse large permet d'obtenir les meilleurs résultats avec

les taux de récurrence les plus bas de 0 à 15% sur la zone concernée par rapport aux autres méthodes d'exérèses. Les soins post-opératoires sont prolongés durant souvent plusieurs mois. L'un des risques est la survenue de cicatrices rétractiles post opératoire (brides axillaires, béance vulvaire, sténose anale), qu'il est parfois possible de prévenir par la réalisation de séances de kinésithérapie.

#### **B8.4.2 Le laser**

##### ➤ **Laser CO<sub>2</sub>**

C'est le premier type de laser à avoir été utilisé pour le traitement des lésions d'HS. Il agit grâce à un effet thermique induisant soit une excision soit une vaporisation des zones traitées ainsi qu'une action d'hémostase. Il est utilisé soit pour l'exérèse chirurgicale ou soit pour la marsupialisation (ouverture et mise en drainage d'abcès) des lésions modérées à sévères d'HS. Il s'agit d'une méthode plus rapide et moins invasive que la chirurgie mais avec un risque de récurrence plus élevé<sup>159,160</sup>.

##### ➤ **Laser CO<sub>2</sub> fractionné**

Le laser CO<sub>2</sub> fractionné est indiqué dans le traitement des cicatrices atrophiques. Il a été décrit une atténuation de cicatrices cribiformes d'HS à partir d'un rapport de cas<sup>161</sup>.

##### ➤ **Lasers épilatoires**

Du fait de l'origine primaire de l'HS qui concerne le follicule pileux et génère une réponse inflammatoire, l'utilisation du laser épilatoire dans cette maladie a été proposée. Il existe quelques données de la littérature dont les résultats sont plutôt favorables. Le laser dépilatoire Nd:YAG (*Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet laser*) a été évalué dans 3 études prospectives chez 63 patients à un stade modéré à sévère. Une séance par mois pendant 3 à 4 mois était réalisée et seul un côté était traité, l'autre côté servait de contrôle. Les séances ont montré une diminution significative du score de Sartorius de 31,6 à 72% selon les études<sup>162,163</sup>. Cependant aucun essai randomisé sur l'utilisation des lasers dans l'HS n'a été réalisé. D'après les recommandations françaises, l'utilisation du laser épilatoire Nd:YAG long pulse peut être utilisée à visée préventive. Cependant, le traitement par laser CO<sub>2</sub> ne semble pas être plus avantageux que le traitement chirurgical<sup>39</sup>.

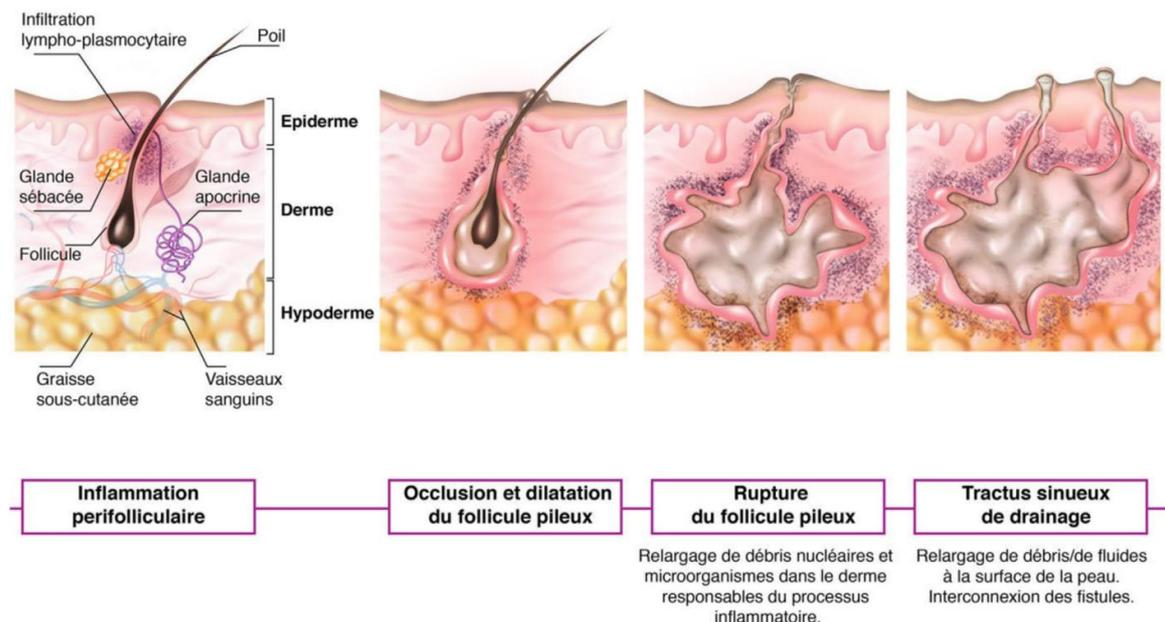
En résumé, l'HS est considérée comme une maladie orpheline par le fait de l'absence de traitement médical curatif. La prise en charge médicale se limite surtout à l'utilisation prolongée d'antibiotiques mais se heurte à des problèmes de tolérance et d'induction de résistance bactérienne<sup>39</sup>. De manière assez récente, les biothérapies, comme les anti-TNF- $\alpha$  et les anti-IL-17, ont obtenu une indication dans l'HS permettant d'obtenir un contrôle partiel de la maladie dans certains cas d'HS les plus sévères<sup>151,153</sup>. L'exérèse chirurgicale lorsqu'elle est large est la seule à être curative, mais au prix parfois, de délabrements importants entraînant des conséquences cicatricielles majeures. En d'autres termes, les traitements actuels de l'HS sont très invasifs et/ou partiellement efficaces. Il est donc important que les données de la recherche permettent de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

## **C. Physiopathologie de l'Hidradénite suppurée**

### **C1. Occlusion folliculaire**

La physiopathologie de l'HS n'est pas encore totalement comprise. Auparavant cette maladie était décrite comme une inflammation primitive des glandes sudoripares apocrines d'où son nom car le mot « hidrosadénite » vient du grec hidros signifiant sueur et adeno pour glande avec le suffixe "ite" correspondant à l'inflammation. Cette théorie provenait du fait que les lésions d'HS se situent dans les zones de localisation des glandes apocrines. On évoquait parfois la maladie sous le terme « apocrinite ». Cette hypothèse est aujourd'hui réfutée à la suite de plusieurs études histopathologiques qui montrent que les glandes apocrines ne présentent pas de différence en taille, en densité ou en morphologie chez les patients atteints d'HS comparés à une population contrôle<sup>164</sup>. La plupart des auteurs sont en accord sur le fait que la lésion initiale de l'HS est une occlusion des follicules pilo-sébacés associés aux glandes sudorales apocrines d'où la localisation des lésions (**Illustration 6**). Les glandes sébacées sont annexées aux poils ce qui forme l'unité pilo-sébacée et se situe dans le derme. Les glandes sudoripares apocrines sont toujours annexées à un follicule pilo-sébacé. Elles se localisent notamment dans les régions axillaires, génitales et en interfessier. La sécrétion sudorale apocrine est souvent mélangée au sébum, elle est provoquée par des stimuli émotionnels. Le sébum joue un rôle important dans l'homéostasie de la peau notamment via la synthèse de

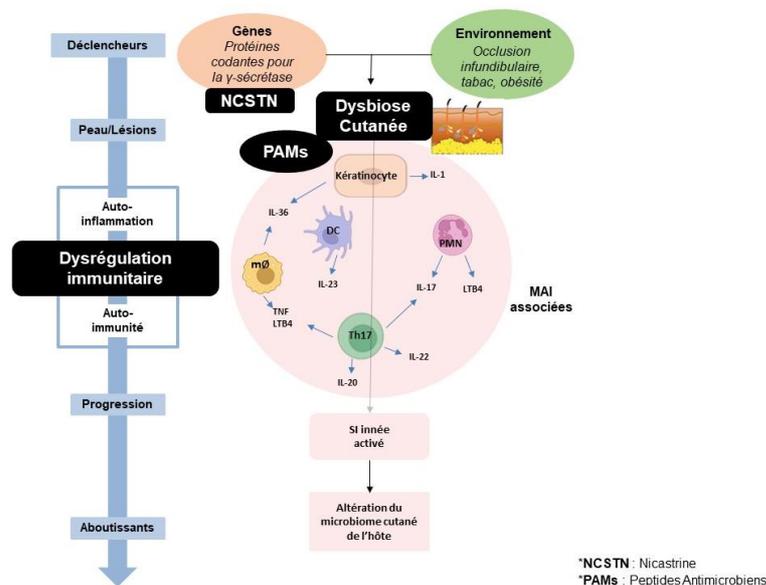
métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui s'y trouvent. Ces MMPs jouent un rôle important dans les processus d'inflammation, de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et de cicatrisation. Les MMPs peuvent dégrader tous les composants de la MEC, c'est pourquoi elles doivent être correctement régulées. L'expression des MMPs augmente lors des processus de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique sous l'effet de facteurs notamment inflammatoires ou traumatiques (IL-1, TNF- $\alpha$ , blessure cutanée). Les principales MMPs, jouant un rôle dans la cicatrisation tissulaire, sont les MMP-1, 2 et 9. Lorsqu'il existe un défaut d'inhibition des MMPs cela altère la capacité de cicatrisation des plaies qui suivent alors une évolution chronique. On observe des augmentations de MMP, en particulier de MMP-1, dans les plaies chroniques telles que les escarres et les ulcères<sup>165</sup>. Les MMP-1 dégradent le collagène de la MEC et les facteurs de croissance inhibant ainsi le processus de cicatrisation. Il a d'ailleurs été confirmé qu'au sein des lésions chroniques d'HS, les niveaux de MMPs étaient élevés<sup>166</sup>.



**Illustration 6.** Mécanismes physiopathologiques de l'hidradénite suppurée d'après Bertolotti et al., 2021<sup>39</sup>

L'origine de l'HS est complexe et multifactorielle, elle implique une prédisposition génétique, une dysfonction kératinocytaire, une dysbiose cutanée, une dysrégulation immunitaire, des facteurs aggravants (tabac, obésité) et une participation hormonale dans le développement de la maladie<sup>117</sup> (**Illustration 7**). Sur le plan physiopathologique, les données issues de la littérature montrent que l'HS

semble être une anomalie primaire de l'unité pilo-sébacée, avec la présence d'une hyperkératose de l'infundibulum avec hyperplasie folliculaire et une activation du système immunitaire entraînant une péri folliculite (inflammation autour des follicules pileux terminaux)<sup>39,92,140,167</sup>. Les lésions se situent dans les zones de plis cutanés, qui correspondent aux zones de friction, d'humidité et de colonisation microbienne. L'occlusion des follicules pileux entraîne la formation de kystes épidermiques, favorisant la prolifération bactérienne, en particulier les bactéries anaérobies<sup>168</sup> avec formation de biofilms (**Illustration 6**). Lors de la rupture des follicules pileux, il y a une libération de KRT, de bactéries et de DAMPs dans le derme, responsable d'une importante réponse inflammatoire aiguë visible sous la forme de nodule/abcès. Chez les patients atteints d'HS, cette réponse inflammatoire ne s'atténue pas mais au contraire s'intensifie créant un véritable cercle vicieux de l'inflammation. L'inflammation chronique va alors être responsable d'une destruction tissulaire à l'origine de la formation de sinus/fistules profonds<sup>95,117</sup> et de fibrose dermique. La dysrégulation immunitaire joue un rôle primordial dans l'évolution chronique de la maladie.



**Illustration 7.** Image modifiée représentant les facteurs physiopathologiques identifiés dans l'HS d'après Zouboulis et al., 2020<sup>117</sup>

A partir de biopsies cutanées issues de patients atteints d'HS, il a été montré que les cellules souches du bulbe folliculaire présentaient une diminution du nombre de cellules souches en quiescence. L'augmentation de la prolifération des cellules souches serait liée à la présence d'une inflammation péri-pilaire ce qui participerait à l'obstruction folliculaire initiale<sup>169</sup>. L'HS est d'ailleurs associée à d'autres troubles de

l'occlusion folliculaire tels que le kyste pilonidal, l'acné conglobata et la cellulite disséquante du cuir chevelu. A l'heure actuelle, la cause primaire de l'obstruction folliculaire n'a toujours pas été identifiée. Il a été proposé que l'HS serait une maladie auto-inflammatoire du fait d'une dysrégulation de la  $\gamma$ -sécrétase. Ce complexe enzymatique pourrait avoir un impact sur la voie de signalisation Notch qui elle joue un rôle majeur dans le maintien de la gaine épithéliale externe et interne du follicule pileux et des annexes cutanées qui sont touchées dans l'HS<sup>135</sup>.

Le psoriasis est une autre dermatose inflammatoire qui se caractérise également par une hyperprolifération des KCs et possède des traitements communs avec l'HS. Cependant, la pathogénèse initiale de l'HS est focalisée sur les follicules pileux où l'hyperprolifération de l'épithélium conduit à la formation de sinus profond et à de la fibrose dermique contrairement au psoriasis où l'hyperprolifération kératinocytaire se localise à l'épiderme, et donc les lésions restent superficielles au niveau de la peau.

## **C2. Rôle du système immunitaire et implication dans l'HS**

Le rôle principal du système immunitaire est de reconnaître et d'éliminer tous les éléments étrangers au « soi » afin notamment d'éviter une infection par des micro-organismes. Il est composé de cellules immunitaires, d'organes lymphoïdes, de cytokines et de chemokines qui se répartissent en 2 réseaux : le système immunitaire inné, présent depuis la naissance, et le système immunitaire adaptatif qui évolue suivant les différentes expositions à des pathogènes.

### **C2.1) Rôle du système immunitaire inné dans l'HS**

La peau est l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur. L'épiderme, la couche la plus superficielle de la peau, assure essentiellement une fonction de protection. Elle joue le rôle de barrière photo-protectrice ; immunitaire ; physique et chimique grâce à la couche cornée. Cependant, en cas d'altérations de cette barrière, il existe un risque d'introduction d'agents infectieux dans l'organisme. Dans ce contexte, le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense afin de limiter la prolifération des pathogènes. Il est composé de plusieurs types cellulaires, en particulier, les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les DCs en particulier les cellules de Langerhans<sup>170</sup>. Les cellules de Langerhans sont localisées dans les couches supra basales de l'épiderme. Il s'agit de

cellules présentatrices d'antigène (APCs) qui internalisent par endocytose ou phagocytose les micro-organismes lors d'une infection. Ces cellules vont ensuite subir une phase de maturation par divers signaux : reconnaissance des pathogènes via leurs *Toll-like receptors* (TLRs), cytokines pro-inflammatoires, molécule de co-stimulation. L'identification des agents infectieux par les cellules de l'immunité innée est rapide mais aspécifique par la reconnaissance de structures moléculaires soit microbiennes « *Pathogen Associated Molecular Patterns* » (PAMPs) ou soit de danger (DAMPs) grâce aux récepteurs PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Ils existent plusieurs types de PRRs, en particulier, les TLRs qui se situent à la surface cellulaire et reconnaissent certaines structures microbiennes conservées telles que les lipopolysaccharides (LPS) et les NOD 1 et 2 (nucleotide-binding domain) présents en intracellulaire qui détectent les peptidoglycane bactériens. À la suite de l'activation de ces récepteurs, cela entraîne la formation et l'activation d'un complexe protéique appelé inflammasome, induisant la production d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL1 $\beta$ , ainsi que la synthèse d'effecteurs de l'immunité innée comme les peptides antimicrobiens (PAMs), les cytokines ou les chimiokines (**Illustration 8**). Les cellules de Langerhans vont suivre ensuite une étape de migration, induit par des chimiokines, vers les ganglions lymphatiques. Les protéines phagocytosées par les cellules de Langerhans, vont alors être présentées sous forme de peptides antigéniques grâce au complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> initiant la réponse immunitaire adaptative. Dans l'HS, une des hypothèses est qu'il existerait une altération de la voie Notch qui entraînerait une perte de contrôle de la réponse inflammatoire induite par les APCs à la suite de l'activation de leurs PRRs. Cette réponse inflammatoire excessive provoquerait alors des dégâts tissulaires caractéristiques dans l'HS notamment la formation de fistules dermiques. Par ailleurs, les macrophages au sein des lésions d'HS produiraient de manière importante de l'IL-23 et l'IL-1 $\beta$ , ce qui induirait la différenciation de cellules T naïves en lymphocytes T<sub>H</sub>17. Ces derniers entretiendraient alors l'inflammation en générant de l'IL-17, permettant le recrutement des neutrophiles et créant une boucle de rétroaction positive de l'inflammation<sup>171,172</sup>.

Les kératinocytes sont de véritables cellules immunitaires sentinelles, en réponse à un signal de danger, elles sont capables de sécréter une large gamme de cytokines, qui peuvent amplifier les réponses inflammatoires, induire la prolifération des KCs et favoriser la migration des leucocytes dans la peau<sup>173,174</sup>. Les KCs sont capables de sécréter des cytokines, notamment l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-18, l'IL-23, l'IL-

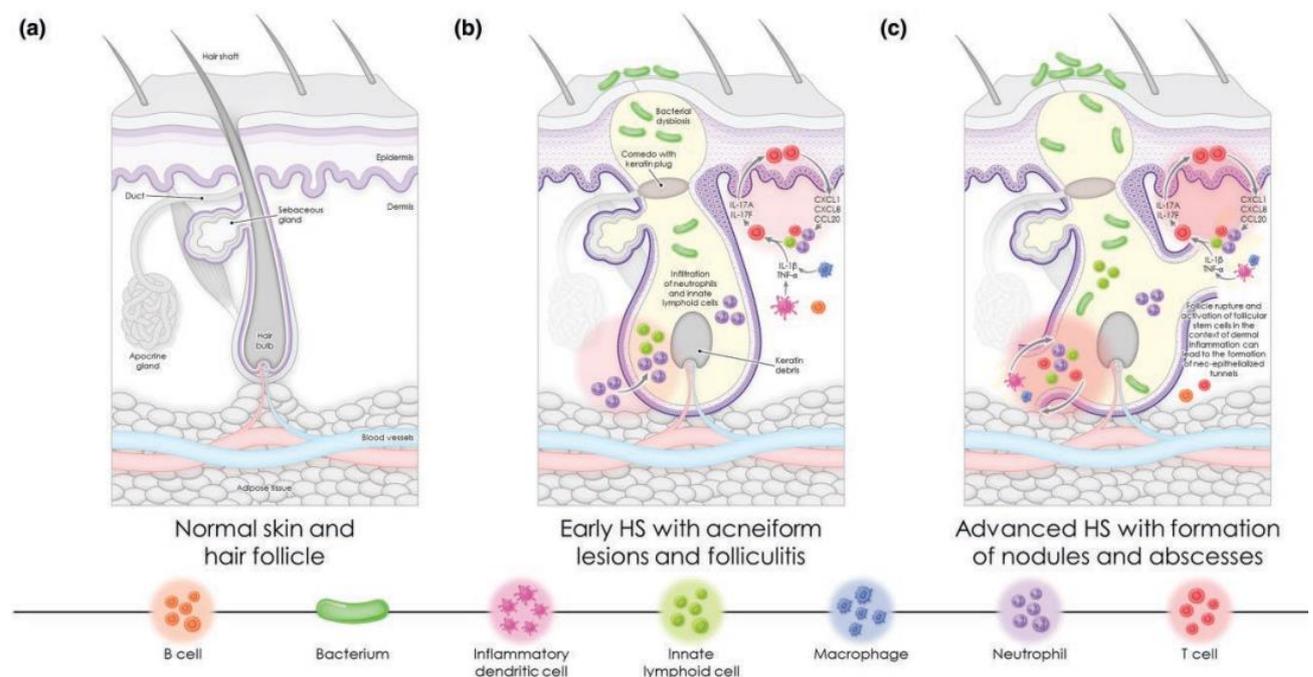
36 et le TNF- $\alpha$  ; ainsi que des chimiokines, telles que le CCL20 et CCL27<sup>174,175</sup>. Les KCs sont capables de détecter différents types de PAMPs<sup>176</sup>, tels que les LPS, les lipopeptides, les  $\beta$ -glucanes, l'ARN simple et double brin et l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), présents sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, les champignons et les espèces virales grâce à leurs PRRs. Parmi ces PRRs, les KCs expriment une variété de TLR dont le TLR4 qui se trouve sur la membrane cellulaire et reconnaît le LPS. La reconnaissance du ligand par les TLRs kératinocytaires déclenche en réponse la production de chimiokines, de cytokines et de PAMPs. Lors de la stimulation des PRRs, les KCs libèrent l'IL-1 pour déclencher une réponse immunitaire rapide, entraînant l'expression d'autres cytokines, notamment l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ <sup>174</sup>. L'IL-6 est exprimée par les KCs humains et serait sur-exprimée dans de nombreuses maladies inflammatoires de la peau, telles que le psoriasis et le lupus<sup>174,177</sup>. L'expression de l'IL-6 est induite par de multiples stimuli, notamment le rayonnement UVB, la stimulation des TLRs et diverses cytokines pro-inflammatoires<sup>178</sup>. Le TNF- $\alpha$  a également de multiples effets, notamment sur la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et l'inflammation. Les KCs sécrètent et répondent au TNF- $\alpha$  par l'intermédiaire du TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*)<sup>174,179</sup>. La signalisation du TNFR1 entraîne l'activation de plusieurs facteurs de transcription en aval et l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion, telles que l'IL-1, l'IL-6, CXCL8, CCL20 et ICAM-1<sup>180</sup>. En outre, le TNF- $\alpha$  agit en synergie avec d'autres cytokines, telles que l'IL-17A et l'IL-17C pour amplifier les réponses immunitaires kératinocytaires<sup>174</sup>. Les kératinocytes peuvent également produire de l'IFN- $\gamma$  (Interféron- $\gamma$ ), ce qui explique en partie la rapidité de réaction lors de la dermatite allergique de contact<sup>181</sup>. Par ailleurs, lors de l'exposition à l'IFN- $\gamma$ , il a été démontré que les KCs expriment les molécules du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité) à leur surface et agissent en tant que APCs pour les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, induisant ainsi des réponses immunitaires effectrices<sup>182</sup>. Une étude récente a montré que l'expression du CMH de classe II intrinsèque aux KCs contrôle les réponses T<sub>H</sub>1 induites par les commensaux, mais pas les réponses T<sub>H</sub>17, ce qui reflète le rôle important des KCs dans l'homéostasie du microbiote cutané<sup>183</sup>.

Dans ce contexte d'altération de la réponse immunitaire innée dans l'HS, il a été très récemment mis en évidence le potentiel rôle d'une population cellulaire appelée cellules lymphoïdes innées (ILCs). Il s'agit de cellules hématopoïétiques de la lignée lymphoïde, qui résident principalement dans les tissus, en particulier la peau et

les muqueuses. Elles sont dépourvues de récepteur spécifique à l'antigène que l'on trouve généralement sur les cellules T et B. Elles jouent un rôle dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes et les micro-organismes, maintiennent l'homéostasie des tissus et favorisent le remodelage et la réparation des tissus<sup>184,185</sup>. Les ILCs peuvent répondre directement aux signaux de la réponse immunitaire innée et aux cytokines<sup>186</sup>. Elles se divisent en sous-populations selon leur profil d'expression des cytokines et correspondent à l'équivalent inné des sous-ensembles de T auxiliaires. Les ILCs du groupe 1 (ILC1) produisent des cytokines T<sub>H</sub>1 [IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ], tandis que les ILCs du groupe 2 (ILC2) sécrètent des cytokines T<sub>H</sub> 2 [IL-13 et IL-5] et les ILCs du groupe 3 (ILC3) produisent des cytokines T<sub>H</sub> 17 [IL-17 et IL-22]<sup>187</sup>. Les sous-ensembles d'ILCs peuvent être identifiés grâce à l'expression de marqueurs à la surface cellulaire. Elles n'expriment pas les marqueurs caractéristiques des cellules T, des cellules B, des DCs, des macrophages et des granulocytes ce qui permet de réaliser une première sélection négative (*lineage cocktail*). Les ILCs expriment l'IL7R $\alpha$  (CD127<sup>+</sup>) et CD45<sup>+</sup>. Les ILC2 sont caractérisées par l'expression du récepteur 2 de la prostaglandine D2 (CRTH2 -*Chemoattractant Receptor T<sub>H</sub>2 cells*), également exprimé sur les cellules T<sub>H</sub> 2. Les ILC3 expriment le CD117<sup>+</sup> (c-Kit) et peuvent être subdivisés selon l'expression du NKp46<sup>+</sup>. Les ILC1 humains n'expriment pas le CD117 ni le NKp46<sup>188</sup>.

Plusieurs études ont montré que les ILCs, par leur fonction, pouvaient contribuer à l'altération de la réponse immunitaire et au dysfonctionnement des barrières épithéliales dans plusieurs maladies cutanées telles que la dermatite atopique<sup>189</sup> ou le psoriasis<sup>190</sup> ainsi que dans d'autres maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn<sup>185</sup> ou les rhumatismes inflammatoires<sup>191</sup>. Des études ont identifié des niveaux élevés d'ILC3 produisant de l'IL-22 dans le sang et la peau de patients atteints de psoriasis<sup>192,193</sup>, tandis que l'ILC2 a été trouvé en augmentation dans la peau et le sang de patients atteints de dermatite atopique<sup>194</sup>. Nous nous intéressons dans le cadre de l'HS, aux ILCs du groupe 3 puisqu'elles s'activent par la présence de pathogènes extracellulaires tels que les bactéries et sécrètent alors de l'IL-17, de l'IL-22 et du GM-CSF dans le but de promouvoir la phagocytose et la sécrétion de PAMs<sup>185</sup> eux même jouant un rôle dans la régulation du microbiote cutané (**Illustration 8**). Elles ont également la capacité de sécréter de l'IL-22 et de l'IL-17, jouant ainsi un rôle dans la réponse T<sub>H</sub> 17, dans la réponse immunitaire antibactérienne et peuvent également participer à la chronicisation de l'inflammation<sup>185</sup>. Ces cellules semblent donc intéressantes à étudier dans l'HS au vu

de leurs fonctions.



**Illustration 8.** Représentation des différents acteurs du système immunitaire dans la physiopathologie de l'HS, d'après James G. Krueger, *Br J Dermatol*, 2023<sup>195</sup>.

## C2.2) Perte de contrôle du système immunitaire adaptatif dans l'HS

L'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs requièrent trois signaux :

- (i) L'interaction entre le TCR des lymphocytes T et le CMH de classe II des CPA [**signal 1**],
- (ii) L'interaction entre les molécules de costimulation exprimées à la surface des DCs matures (CD80, CD86, CD40) et les lymphocytes T (CD28, CD40L) [**signal 2**],
- (iii) La stimulation par les cytokines pro-inflammatoires [**signal 3**]

L'induction de la réponse immunitaire adaptative est moins rapide mais elle est spécifique à l'antigène. La fonction des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est d'éliminer l'agent étranger lorsque celui-ci a échappé au système immunitaire inné, tandis que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> participent à l'activation des CD8<sup>+</sup> ainsi que des lymphocytes B. Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves vont pouvoir, après activation, se polariser en divers sous-ensembles de cellules T auxiliaires (T<sub>H</sub>) effectrices, qui se caractérisent par la production de différentes cytokines et fonctions via l'activation de facteurs de transcription spécifiques<sup>196</sup>. Il a été montré que les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves peuvent se

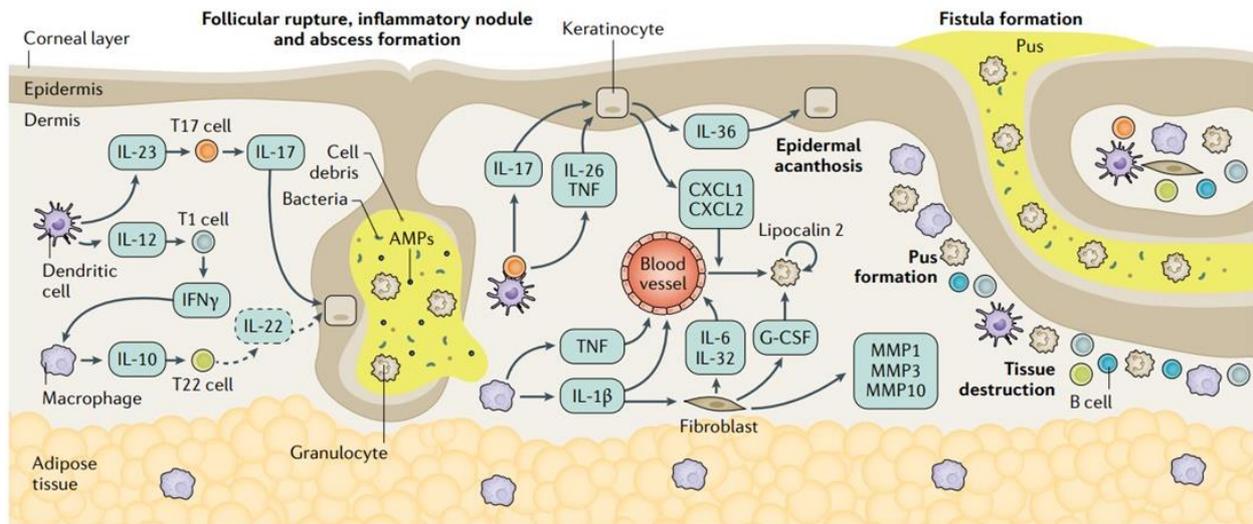
différencier en cellules T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H9</sub>, T<sub>H17</sub>, T<sub>H22</sub>, T régulateurs (T-regs) et T auxiliaires folliculaires (T<sub>fh</sub>) en fonction de leurs facteurs de transcription respectifs, des signaux environnementaux, notamment les cytokines et les interactions ligand-récepteur par contact cellule-cellule<sup>134</sup>. En effet, l'activation des facteurs de transcription T-bet et GATA3 induisent respectivement des cellules T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub>, qui produiront pour les T<sub>H1</sub> de l'IFN- $\gamma$  et pour les T<sub>H2</sub> de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13<sup>197</sup>. Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves peuvent également se différencier en cellules T<sub>H17</sub> lorsqu'elles sont en contact avec l'IL-6, le TGF- $\beta$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 par l'intermédiaire du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (*retinoid related orphan receptor  $\gamma$ t*), et libérer l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22, qui sont retrouvées impliquées dans diverses maladies auto-immunes/auto-inflammatoires<sup>198</sup>. En outre, les T CD4<sup>+</sup> naïves en contact avec le TGF- $\beta$  peuvent via l'activation de Foxp3 devenir des T-regs et ainsi produire de l'IL-10 dans le but de limiter l'inflammation<sup>199</sup>. Alors que l'exposition des T CD4<sup>+</sup> naïves, à l'IL-6 et au TNF- $\alpha$  induisent les cellules T<sub>H22</sub> par l'activation du facteur de transcription AHR (*aryl hydrocarbon receptor*)<sup>134,200</sup>. Les cellules T<sub>H22</sub> sécrètent l'IL-22, qui joue un rôle crucial dans le maintien de l'immunité cutanée<sup>201</sup>, la défense antimicrobienne des muqueuses et les maladies auto-immunes<sup>200</sup>. Outre les cytokines classiques qui induisent les T CD4<sup>+</sup> naïves en différents sous-ensembles T<sub>H</sub>, d'autres facteurs interviennent tels que la signalisation NOTCH<sup>134,138</sup>. Plusieurs études soutiennent l'hypothèse que les différents ligands de Notch pourraient avoir des effets différents sur la différenciation des lymphocytes.

Plusieurs études observationnelles ont mis en évidence une élévation du nombre de cellules T<sub>H1</sub>, T<sub>H17</sub> mais également une augmentation du nombre de lymphocytes B au sein des lésions d'HS chez les patients<sup>114,202,203</sup> (**Illustration 9**). Les études transcriptomiques sur l'HS ont également montré une surexpression des gènes associés aux lymphocytes B<sup>117</sup>. Il a d'ailleurs été décrit la présence d'auto-anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (anti-CCP) et les protéines de la matrice extracellulaire chez les patients atteints d'HS<sup>204</sup>. Cependant il reste encore à déterminer la pathogénicité potentielle de ces lymphocytes B dans l'HS.

Initialement, lorsque le follicule pileux siège d'une inflammation dans le cadre de l'HS se rompt, cela entraîne une libération de DAMPs au sein du derme. Ces motifs vont alors activer les TLRs des macrophages et des DCs. L'activation de ces cellules vont alors entraîner une sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  suractivant les DCs. Ces dernières vont synthétiser de l'IL-23 permettant la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en cellules T<sub>H17</sub> produisant de

l'IL-17. Dans l'HS, il a été suggéré une altération de la voie Notch, qui peut être d'origine génétique et/ou environnementale, ce qui pourrait alors réduire l'inhibition rétroactive de la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)<sup>135</sup>. Cette perte d'inhibition empêche la signalisation via les TLR des macrophages et des DCs de prendre fin. Ainsi, cela pourrait induire une sécrétion dysrégulée d'IL23, impliquée dans la polarisation des cellules T<sub>H</sub>17, causant une perte de contrôle de l'inflammation à l'origine d'une destruction tissulaire progressive et d'une chimio attraction des PNN pérennisant l'inflammation locale<sup>135</sup>. Les T<sub>H</sub>17 ont également été retrouvés dans la peau saine chez des patients HS, suggérant un rôle dans le développement initial des lésions inflammatoires. Les principaux médiateurs de la réponse inflammatoire, au sein des lésions d'HS sont représentés par les T<sub>H</sub>17 et par les T<sub>H</sub>1, induits par l'IL-23, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-12 respectivement. Ces dernières sont sur-exprimées dans les tissus lésionnels d'HS comparés à la peau saine ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, l'IL-11, l'IL-17A/F<sup>84,92</sup>. L'IL-1 $\beta$  est également une des cytokines prédominantes retrouvées dans la peau lésionnelle de patients HS<sup>205</sup> mais également dans le cadre du PASH syndrome, la principale forme syndromique de l'HS<sup>206</sup>. Il a également été mis en évidence des mutations activatrices de l'inflammasome qui peuvent expliquer une libération incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires citées ci-dessus, par les neutrophiles et macrophages, participant à l'auto-inflammation dans l'HS<sup>117,205</sup>.

Par ailleurs, les cytokines pro-inflammatoires sont de puissants inducteurs de métalloprotéinases matricielles qui vont alors dégrader la MEC et amincir la membrane basale de l'unité du follicule pileux. Ce processus peut ainsi favoriser la rupture du follicule pileux lors de la réponse inflammatoire et maintenir l'inflammation au long cours<sup>92</sup> (**Illustration 9**).



**Illustration 9.** Représentation des acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative dans l'évolution des lésions d'HS d'après Sabat R et al., 2020<sup>84</sup>

### C2.3) Altération de l'homéostasie immunitaire dans l'HS

La réponse immunitaire est essentielle pour assurer la protection de l'organisme contre les pathogènes extérieurs. Cependant, cette réponse immunitaire doit être régulée afin d'éviter de générer une réponse inappropriée et d'induire des lésions tissulaires pouvant ainsi générer des maladies auto-inflammatoires ou auto-immunes. Les cellules immunitaires, que ce soit le système immunitaire adaptatif ou le système immunitaire inné, sont capables de différencier les cellules du soi des cellules du non-soi dans le but d'induire une réponse dirigée exclusivement contre l'agression qu'elle soit interne (signaux de danger) ou externe (organismes microbiologiques). Lorsqu'il existe une dysrégulation du système immunitaire, l'homéostasie immunitaire est alors compromise. Concernant le système immunitaire adaptatif, les anticorps générés vont alors s'attaquer aux constituants du soi, il s'agit d'auto-anticorps, qui provoquent des maladies dites auto-immunes. Dans d'autres situations, on n'identifie pas d'auto-anticorps, car cela concerne les cellules immunitaires innées (neutrophiles, macrophages, monocytes...) qui sont responsables de l'induction d'une inflammation chronique provoquant une destruction tissulaire, on parle alors de maladies auto-inflammatoires. Dans les 2 cas, cette dysrégulation immunitaire provoque une inflammation accrue, de la fièvre ainsi que des dommages d'organes<sup>207</sup>.

Dans le cas des maladies auto-inflammatoires, il peut exister une mutation ou une délétion d'un gène régulant la fonction du système immunitaire inné. Dans l'HS, il existe une activation accrue de l'inflammasome d'une part en réponse au relargage dans le derme du contenu folliculaire (fibres de KRT, flore commensale, PAMPs et

DAMPs), et d'autre part du fait de mutations de gènes impliqués dans l'immunité innée (NOTCH, PSTPIP1, NLRP). Cela entraîne une surexpression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  qui induisent la polarisation de la réponse immunitaire en T<sub>H</sub>17 et altèrent la fonction des T-regs. Il a été montré dans un modèle murin, lors d'un contexte inflammatoire, que la synthèse d'IL-6 inhibe complètement la formation de T-regs Foxp3<sup>+</sup> induits par le TGF- $\beta$ <sup>208</sup>. Ainsi les voies qui induisent la formation de cellules T<sub>H</sub>17 favorisant ainsi l'auto-immunité, inhibent en parallèle la génération de cellules T régulatrices (Foxp3<sup>+</sup>) dont le rôle est de limiter les lésions tissulaires auto-inflammatoires<sup>92</sup>. Une étude a permis de mettre en lumière un déséquilibre entre les populations T<sub>H</sub>17 et T-regs en faveur des cellules T<sub>H</sub>17 au sein des lésions d'HS, provoquant une altération de l'homéostasie immunitaire et pouvant expliquer la pérennisation de l'inflammation<sup>209</sup>.

#### C2.4) La dysrégulation immunitaire favorise la dysbiose cutanée

Tandis que les cellules T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17 et leurs principaux médiateurs sont majoritaires au sein des lésions d'HS, les cellules T<sub>H</sub>22 et l'IL-22 ne sont pas retrouvées augmentées<sup>92,210</sup>. En effet, les atteintes lésionnelles d'HS sont caractérisées par une infiltration réduite de cellules sécrétrices d'IL-22 et une altération de synthèse d'IL-22 par ces cellules<sup>203,211</sup> (**Illustration 9**). De plus, la synthèse d'IL-22 est amplifiée par la signalisation Notch, qui est suspectée être déficiente en lien avec des mutations perte de fonction ou du fait de l'environnement (tabac, obésité) chez certains patients atteints d'HS<sup>203,212</sup>.

Par ailleurs, l'IL-10 pourrait être impliquée dans le contrôle de la synthèse d'IL-22. Au sein des lésions d'HS, il a été montré une augmentation de l'expression de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire<sup>92,210</sup>. IL-10 agit exclusivement sur les cellules immunitaires. Elle favorise la phagocytose des bactéries et limite la synthèse des cytokines pro inflammatoires par les macrophages, elle limite également l'activation des cellules T. Cependant, il a été montré *in vitro* que l'IL-10 inhibait la production d'IL-22 par les lymphocytes, et qu'il existait une corrélation négative du taux d'IL-22 et d'IL-10 au sein des lésions d'HS<sup>213</sup>.

Sur le plan cutané, l'IL-22 agit sur les KCs et induit, directement ou *via* l'IL-20, l'expression des gènes codant pour les PAMs<sup>92,214,215</sup>. Ainsi, l'action limitée de l'IL-22 était corrélée à une perturbation de l'expression cutanée des PAMs dans des modèles *in vitro* et des modèles murins d'HS<sup>213</sup>. Dans les tissus lésionnels d'HS, il a été montré une dysrégulation marquée de l'expression de PAMs, en particulier, une diminution de

hBD-3, DCD, S100A7, S100A9 et de la RNase 7<sup>210,216,217</sup>. Il a été montré à partir de KCs issus de follicule pileux de patients atteints d'HS, en réponse à une stimulation du TLR-2 ou de la protéine NOD-2, une diminution d'expression de la psoriasine (S100A7) et de hBD-1 (*human-β Defensin*) et une absence de modification de la S100A8 alors que chez les donneurs sains on notait une augmentation de l'expression de ces 3 PAMS en comparaison à l'état non stimulé<sup>210</sup>. Une autre étude a montré également une diminution transcriptomique de la DCD dans l'HS<sup>218</sup>.

Tandis qu'une étude de cohorte gréco-allemande a mise en évidence une augmentation du nombre de copies du gène de la hBD-2, situé sur le chromosome 8, et cette augmentation était liée à un risque plus élevé de développer une HS (odds ratio 6,72), le phénotype de ces patients semblaient cependant moins sévère en ce qui concerne les épisodes de suppuration et le nombre de sites affectés<sup>219</sup>. D'autres études ont montré une élévation de l'expression d'autres PAMs tels que la ribonucléase 7 (RNase7)<sup>210,218</sup> et la cathélicidine (LL-37)<sup>220</sup> à partir d'explant cutané lésionnel de patient HS par rapport à de la peau issue de donneurs sains. Le LL-37, en plus de son rôle antimicrobien, possède une activité immunomodulatrice, avec une fonction chimiotactique sur les neutrophiles, monocytes, mastocytes et cellules T qui libèrent sur le site atteint des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-12. La LL-37 joue également un rôle sur la maturation des cellules T<sub>H1</sub>/T<sub>H17</sub><sup>221</sup>. La cathélicidine favorise aussi la prolifération des KCs par une action anti-apoptotique<sup>222</sup>, ce qui peut entraîner une hyperplasie épidermique retrouvée dans les lésions d'HS.

L'expression inappropriée de PAMs suggère un dysfonctionnement de l'immunité innée expliquant l'altération de l'équilibre entre l'hôte et le microbiote et l'installation d'une inflammation chronique. Les PAMs sont donc des acteurs capitaux de la réponse immunitaire innée et jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des microorganismes du microbiote cutané, dans la lutte contre l'invasion d'agents pathogènes et sont des médiateurs endogènes de la cicatrisation ce qui en font des cibles thérapeutiques prometteurs dans l'HS.

### C2.5) Dysbiose cutanée

La dysbiose cutanée est définie par un déséquilibre au sein de la flore commensale avec l'augmentation de la présence de bactéries pathogènes pouvant alors provoquer une infection cutanée et altérant la fonction barrière de la peau. Dans l'HS, les lésions de type fistule offrent des conditions locales favorables (humidité, chaleur) à la prolifération bactérienne. Les zones des plis cutanés touchées

préférentiellement par l'HS sont soumises à des frottements mécaniques répétés pouvant entraîner une abrasion cutanée, ce qui peut activer le système immunitaire inné et favoriser la pénétration des micro-organismes dans les follicules pileux et au sein du derme<sup>84,95,218</sup>.

Il a été mis en évidence que le microbiote des patients HS était significativement différent par rapport aux témoins que cela concerne les explants cutanés lésés ou périlésionnels<sup>168</sup>. Le *Staphylococcus* à coagulase négative, les bactéries anaérobies telles que le *porphyromonas* et *prevotella*, les Streptocoques, le *Staphylococcus aureus* et les corynébactéries sont les bactéries les plus fréquemment identifiées au sein des lésions d'HS<sup>223,224</sup>. Ces bactéries, notamment les anaérobies, interviendraient dans l'évolution de la maladie mais ne seraient pas à son origine, l'HS n'étant pas une maladie infectieuse en tant que telle<sup>225</sup>. L'équipe d'Aude Nassif a utilisé le terme d'autoinfection, par le fait que la présence d'une flore commensale opportuniste pourrait jouer le rôle de déclencheur et prédisposer les patients HS aux différentes poussées inflammatoires<sup>226</sup>. En effet, les bactéries peuvent déclencher l'inflammation notamment par la présence de PAMPs qui sont reconnus par les TLRs et NOD récepteurs des cellules de l'immunité innée<sup>227</sup>. L'intérêt des antibiotiques dans la prise en charge thérapeutique de l'HS appuie cette idée<sup>228</sup>. Cependant l'efficacité de ces traitements est suspensive, en effet, de nombreuses rechutes se produisent dès l'arrêt des antibiotiques, suggérant la présence éventuelle de biofilms bactériens, facteur de résistance aux antibiotiques<sup>226,229</sup>.

Selon le stade de sévérité de l'HS, la microbiologie au sein des lésions diffère : présence en majorité de *Staphylococcus lugdunensis*, *Cutibacterium spp* et de germes anaérobies pour les lésions de grade Hurley 1, et en majorité des flores anaérobies complexes pour les lésions de grade 2 et 3 de Hurley<sup>39,226</sup>. Les études portant sur la bactériologie dans l'HS sont divisés sur la question de leur implication, il est difficile de savoir si les bactéries commensales retrouvées au sein des lésions inflammatoires d'HS sont seulement présentes au sein de la flore sans rôle spécifique, ou si elles induisent la réaction inflammatoire du fait d'un défaut de l'immunité innée ou alors si elles ont une qualification de pathobionte, c'est-à-dire la capacité à devenir pathogène dans un contexte de dysbiose, soit par réduction de la densité et/ou de la diversité microbienne habituelle.

Il a également été montré, à partir de prélèvements cutanés issus de patients atteints d'HS, qu'il existait des biofilms bactériens dans 67% des lésions chroniques et dans 75% des prélèvements périlésionnels<sup>26</sup>. Un biofilm est une matrice extracellulaire

composée d'une communauté microbienne caractérisée par une agglutination de microorganismes liés à un substrat ou une interface. Il s'agit d'une organisation structurale permettant de protéger les bactéries contre les antibiotiques et les défenses de l'hôte. Les maladies liées à la présence de biofilms présentent comme caractéristiques une inflammation prolongée, une résistance aux traitements par antibiothérapie et un défaut de cicatrisation des plaies. Les lésions chroniques de l'HS, en particulier les fistules, ainsi que les infundibulums des unités pilo-sébacées, contiennent des débris de KRT et de follicule pileux, qui peuvent servir d'aire d'ancrage pour les pathogènes anaérobies et permettre la croissance de biofilms<sup>26</sup>. Ces derniers permettent aux bactéries d'échapper aux composants du système immunitaire inné, en particulier les PAMs<sup>218,230</sup>. Ainsi, la présence de biofilms bactériens peut être responsable d'une réponse immunitaire inappropriée de l'hôte expliquant les poussées inflammatoires répétées au cours de la maladie, en plus d'entraîner une résistance aux traitements par antibiothérapie<sup>26,218</sup>.

## **D. La thérapie photodynamique : un traitement prometteur ?**

### **D1. Histoire et indications de la thérapie photodynamique**

La PDT est une technique courante utilisée en médecine avec un recul certain puisque la première publication sur la PDT date de 1900<sup>231,232</sup>. Oscar Raab, étudiant en médecine Allemand, a été le premier à décrire que des micro-organismes en contact avec des colorants, avaient une réduction de leur viabilité lorsqu'ils étaient exposés à la lumière, et non lorsqu'ils étaient conservés dans l'obscurité<sup>232</sup>. Mais il faudra attendre plus de 60 ans, après les deux guerres mondiales, pour que la PDT soit explorée dans le domaine médical, en particulier en cancérologie, grâce notamment à l'essor de l'industrie pharmaceutique. C'est l'équipe du Dr Dougherty, à Buffalo, dans l'État de New York qui teste le premier photosensibilisateur (PS), le dérivé d'hématoporphyrine (HpD). Le Photofrin®, molécule purifiée d'HpD a ensuite été approuvé dans le cancer de vessie mais au prix d'effets secondaires marqués en particulier d'induction de photosensibilité cutanée<sup>233</sup>. La PDT est ainsi largement appliquée en cancérologie, initialement dans le traitement de diverses tumeurs cutanées superficielles : kératose/chéilite actinique, les carcinomes basocellulaires superficiels, les maladies de Bowen<sup>234</sup>. L'utilisation dans le cadre des kératoses actiniques a l'avantage, du fait de traiter de large zone, de réaliser dans le même temps

le traitement de ce qu'on appelle le « champ de cancérisation » dans l'intérêt de limiter l'apparition de nouvelles lésions précancéreuses/cancéreuses.

De manière plus récente, beaucoup de publications sont basées sur l'efficacité de la PDT, notamment comme traitement adjuvant de différentes tumeurs comme par exemple le glioblastome<sup>235,236</sup>, l'adénocarcinome pancréatique<sup>237</sup>, le carcinome hépatocellulaire<sup>238,239</sup>, la carcinose péritonéale ovarienne<sup>240</sup> et le cancer de la vessie<sup>241</sup>.

## **D2. Modalités de la thérapie photodynamique**

Cette technique a l'avantage d'être locale, peu invasive, simple, accessible et déjà appliquée en pratique clinique. Elle comporte 3 composants essentiels : l'application soit par voie topique, voie orale ou voie injectable d'un photosensibilisateur inactif à l'obscurité (PS) ; une lumière utilisée à la longueur d'onde spécifique du PS choisi ; et la présence d'oxygène en intracellulaire. Si on prend pour exemple les PS les plus utilisés en dermatologie, qui sont l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) et l'aminolévulinate de méthyle (MAL), il s'agit de "pro-médicaments", car ils doivent être métaboliquement convertis en protoporphyrine IX (Pp-IX) pour devenir des PS actifs. Il s'agit de précurseurs de porphyrines, dont le bas poids moléculaire facilite la pénétration de l'épiderme. Ces PS s'accumulent préférentiellement dans les cellules à métabolisme élevé, en particulier les cellules cancéreuses, dont le déficit intracellulaire en fer augmente l'absorption de précurseurs de l'hème et donc du PS, qui est alors transformé en Pp-IX. La photo-activation de la Pp-IX est induite par l'application d'une lumière. Ainsi, en présence d'oxygène, cela génère la formation de dérivés oxygénés et de radicaux libres provoquant alors des dommages cellulaires. En l'absence d'excitation lumineuse, la Pp-IX est alors dégradée en 24-48 heures<sup>242</sup>. La réaction photochimique créée induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène provoque alors une mort cellulaire post-PDT soit par apoptose et/ou nécrose cellulaire et/ou associée à l'autophagie<sup>243,244</sup>. La localisation intracellulaire du PS, dans différents organites telles que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et membrane plasmique, doit jouer un rôle dans le mécanisme de mort cellulaire induit. D'autres facteurs sont également déterminant comme la concentration du PS, la fluence lumineuse utilisée, la concentration en oxygène du tissu traité ou l'intervalle entre l'application du PS et l'illumination<sup>233</sup>.

Dans l'ensemble, il est admis que l'apoptose photo-induite est la principale modalité de mort cellulaire après PDT. L'apoptose induit la fragmentation de la cellule

en corps apoptotiques qui seront alors phagocytés, il s'agit d'une mort cellulaire programmée et qui ne génère pas de réponse inflammatoire. Tandis que la nécrose va induire une altération de la membrane cellulaire ainsi qu'une vacuolisation irréversible du cytoplasme, entraînant la destruction de la cellule et la libération de son contenu dans la MEC. Il s'agit d'une mort cellulaire non programmée déclenchant une forte réaction inflammatoire. L'autophagie fait suite à un stress cellulaire, formant alors des vésicules autophagiques dans le cytoplasme, afin de renouveler les composants cellulaires. Lors de la PDT, ce mécanisme peut être soit cytoprotecteur soit induire la mort cellulaire<sup>245</sup>.

Les effets de la PDT en cancérologie sont liés, soit à un effet direct en raison des dommages cytotoxiques sur les cellules tumorales et/ou à des effets indirects par induction de lésions vasculaires<sup>246</sup> et d'une réaction inflammatoire<sup>247</sup>. Il est important que l'intervalle entre l'administration du PS et l'irradiation, appelé intervalle drogue-lumière (IDL), soit de quelques minutes à quelques heures, afin d'obtenir la meilleure réponse tumorale. En effet, plus l'intervalle est court, plus le PS est encore présent au sein des vaisseaux sanguins, entraînant alors d'importantes lésions vasculaires et provoquant ainsi plus de dommages sur la cible d'intérêt<sup>248</sup>. Par ailleurs, la mort des cellules par nécrose, résultant de la PDT, entraîne une réponse inflammatoire avec le recrutement des cellules immunitaires sur la zone traitée, ainsi qu'une libération d'antigènes issus des cellules cancéreuses stimulant ainsi la réponse immunitaire antitumorale. Cependant, dans certaines indications, il n'est pas souhaitable d'initier une réponse inflammatoire marquée, comme les tumeurs cérébrales où l'œdème peut générer des hypertensions intracrâniennes. Ainsi, en modulant les paramètres de PDT, afin d'obtenir plus de mort cellulaire par apoptose, cela limite alors la réponse inflammatoire tout en générant une réponse immunogène<sup>249</sup>.

### **D3. Les photosensibilisateurs**

Un photosensibilisateur est une molécule, qui après illumination, provoque des dommages physico-chimiques mais dont la toxicité à l'obscurité est nulle. Les PS de première génération avaient leurs limites et généraient des effets secondaires ce qui a permis de déterminer les éléments essentiels pour obtenir un bon PS. Les critères nécessaires à un PS sont : être un composé pur, avoir une synthèse simple, provoquer une faible photosensibilité cutanée, avoir une forte sélectivité, être stable et avoir une forte absorption à des longueurs d'onde élevées (650 – 800 nm)<sup>250</sup>. En effet, les PS

ayant une absorption à des longueurs d'onde élevées (rouge/rouge profond) permettent que l'irradiation lumineuse pénètre plus profondément au sein des tissus traités<sup>251</sup>. Les précurseurs de la PP-IX, PS endogène, dits de 2<sup>ème</sup> génération, ont été élaborés afin de répondre au mieux à ces critères de PS idéal comme le 5-ALA (Levulan®) et le 5-ALA-methylester (Metvixia®).

Récemment les PS de 3<sup>ème</sup> génération ont vu le jour afin toujours d'améliorer la sélectivité de la molécule dans le but de préserver le tissu sain et donc de diminuer les effets secondaires. Il s'agit en fait de PS de 2<sup>ème</sup> génération vectorisés à différents systèmes tels que les liposomes, les micelles, les lipoprotéines, les nanoparticules, les polymères ou encore les anticorps monoclonaux<sup>252,253</sup>. Cet assemblage permet de cibler soit de manière passive ou active la zone à traiter<sup>254</sup>. Le choix du PS, sa concentration intracellulaire, la source et la dose de lumière appliquée sont importantes à déterminer car influençant les effets de la PDT.

#### **D4. Intérêt de la PDT dans les maladies inflammatoires**

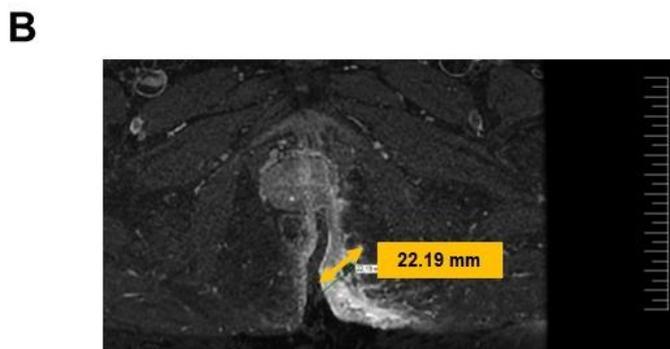
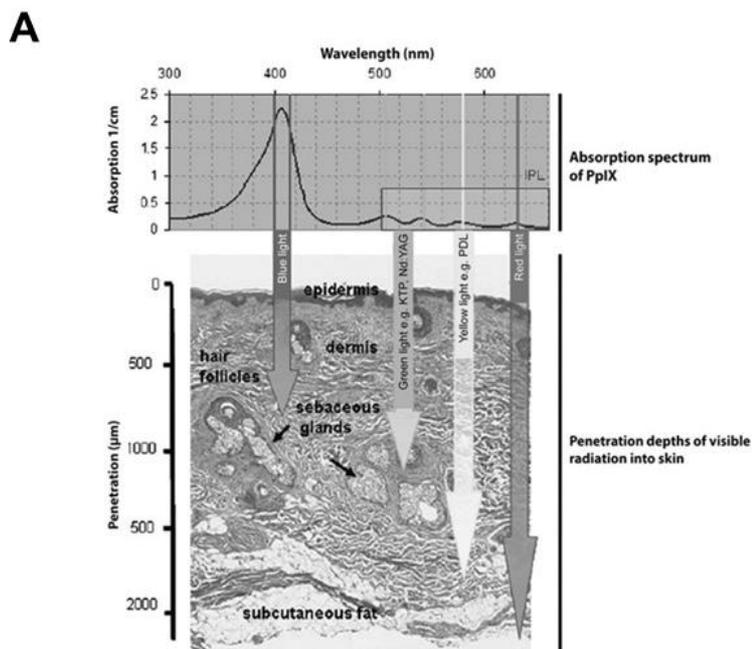
Grâce à la modulation des paramètres de PDT, il est possible de réaliser de la PDT à forte dose (HDPDT- *High-Dose PDT*) et à faible dose (LDPDT -*Low-Dose PDT*). La HDPDT est plutôt à visée antitumorale, dans le but de produire des ROS, afin de détruire les cellules tumorales ou les structures vasculaires et ainsi induire une réponse immunitaire antitumorale, tandis que la LDPDT a montré pouvoir induire des effets immunomodulateurs<sup>255</sup> ainsi que de réguler le microbiote<sup>256</sup> notamment dans des modèles de MICI<sup>256,257</sup>. Des résultats intéressants ont également été observés dans d'autres pathologies inflammatoires comme : l'acné, le psoriasis et l'arthrite<sup>234,258,259</sup>. L'un des effets immunomodulateurs de la PDT passe par l'induction de l'apoptose des cellules immunitaires<sup>256</sup>. Il a également été décrit que la PDT peut diminuer l'expression des molécules de CMH altérant alors l'interaction entre les APCs et les cellules T, ainsi que l'expression des molécules de costimulation limitant ainsi l'activation des cellules T, et par conséquent altérant le fonctionnement de la réponse immunitaire<sup>256,257</sup>. Dans des modèles murins d'arthrite, il a été observé que la LDPDT pouvait supprimer la production de cytokines pro-inflammatoires tout en favorisant la synthèse de cytokines anti-inflammatoires<sup>256</sup>. En effet, dans plusieurs modèles murins de MICI, l'utilisation du 5-ALA à faible dose provoquait une diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-17, l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12, ainsi que le nombre de cellules T tout en induisant de l'IL-10, cytokine immunosuppressive<sup>257,260,261</sup>. Il a d'ailleurs été montré que la PDT, en régulant le

déséquilibre des cytokines, a un effet préventif sur le développement des cancers, fait majeur dans le cas des MICI mais également dans l'HS où des carcinomes épidermoïdes peuvent se développer<sup>256</sup>. Dans l'acné, il a été décrit que la PDT pouvait diminuer l'obstruction folliculaire et l'hyperkératose et induire une immunosuppression locale et un effet anti-inflammatoire<sup>258</sup>. Il a également été observé une efficacité de la PDT dans d'autres dermatoses ayant un trouble de la kératinisation telles que le psoriasis ou la porokératose<sup>262-264</sup>. La PDT peut ainsi moduler la réponse inflammatoire en modifiant la sécrétion de cytokines ou l'expression de récepteurs de surface des cellules immunitaires<sup>265</sup>.

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'un des nouveaux axes d'intérêts de la PDT est le motif de sa découverte, il y a plus de 100 ans, avec son rôle contre les microorganismes pathogènes et en particulier les bactéries. Il a été montré dans des plaies cutanées que la PDT pouvait favoriser la cicatrisation en stimulant la synthèse de facteurs de croissance et en inactivant plusieurs souches microbiennes<sup>265,266</sup>. Dans l'acné, il a été montré que la PDT pouvait avoir un effet « antibiotique » en contrôlant la prolifération microbienne<sup>258</sup>. Fait pertinent, il a été montré que la LDPDT pourrait moduler l'homéostasie du microbiote dans un modèle murin de MICI<sup>265</sup>.

Ainsi, la PDT semble être un traitement intéressant car ayant montré des résultats attrayants dans les MICI, qui présentent une pathogenèse similaire sur plusieurs points avec celle de l'HS. L'action de la PDT sur l'immunomodulation du système immunitaire, l'atténuation de la dysbiose et l'amélioration des capacités de cicatrisation en font une thérapeutique prometteuse pour les patients HS. Plusieurs études ont évalué l'effet de la PDT au 5-ALA chez des patients présentant une HS et ont obtenu de bons résultats<sup>267-270</sup>. Néanmoins, ces études démontrent une action limitée de la PDT due à la faible absorption du PS choisi dans les protocoles classiques, ce qui ne permet pas de traiter l'ensemble des lésions dermohypodermiques d'HS. En effet, il a été montré que la PDT au 5-ALA, réalisée sur la peau, pouvait avoir un effet en profondeur qui ne dépasse pas les 2 millimètres<sup>271</sup> (**Illustration 10A**). Alors que les lésions d'HS peuvent être profondes, notamment l'atteinte inflammatoire de la région glutéale, où les lésions sous-cutanées peuvent atteindre plusieurs centimètres d'après les clichés d'évaluation par IRM (**Illustration 10B**). C'est pourquoi, des techniques de PDT intra-lésionnelles ont été mises en place, par exemple l'équipe du Dr. Suárez Valladares MJ qui a testé l'efficacité de la PDT

intra-lésionnelle sur des patients atteints d'HS grâce à une sonde à fibres optiques permettant de traiter les parois des zones de fistulisation/abcès et a obtenu 29 rémissions complètes sur 38 patients traités<sup>269</sup>.



**Illustration 10. Limites de la PDT dans le traitement des lésions d'HS**

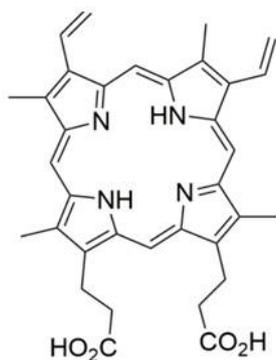
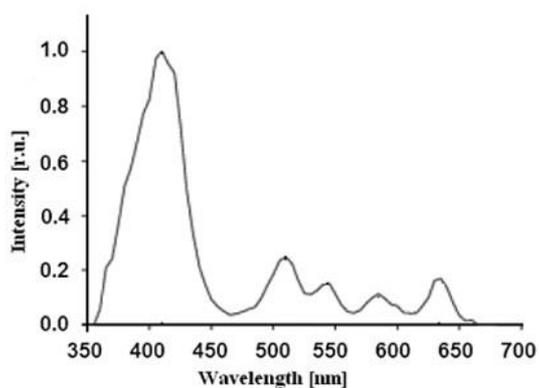
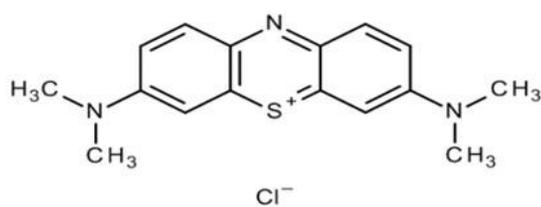
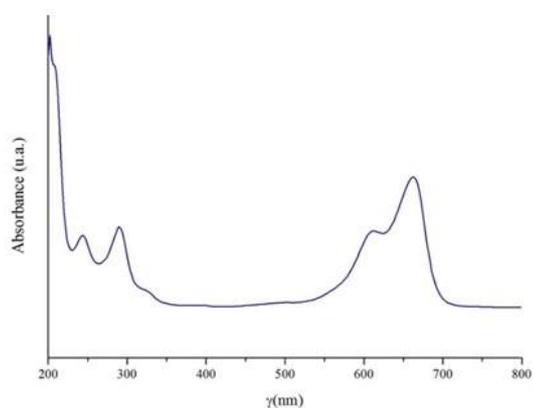
**A.** Schéma représentatif de la longueur de pénétration de la lumière selon les bandes d'absorption de la Pp-IX tiré de la publication d'Ibbotson et al.<sup>271</sup>. **B.** Cliché d'IRM d'un patient présentant une HS sévère (grade Hurley III) de la région glutéale.

Actuellement peu de traitements médicaux sont efficaces et durables dans l'HS, c'est pourquoi notre équipe s'est intéressée à tester la PDT, traitement peu invasif, ayant montré des effets immunomodulateur<sup>272,273</sup> et antimicrobien<sup>265,274</sup> tout à fait intéressants dans notre indication. Nous étudierons deux PS : le 5-ALA et le bleu de méthylène (BdM).

L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), est notre contrôle et goldstandard, car il est effectivement utilisé en pratique clinique courante, notamment en dermatologie, dans le traitement des lésions précancéreuses/cancéreuses (kératoses actiniques, carcinome basocellulaire superficiel...)<sup>258,275</sup>. Il peut également être utilisé, à moindre

fréquence, dans le traitement de certaines dermatoses inflammatoires (acné, folliculite décalvante, nécrobiose lipoïdique...)<sup>258,265,276</sup>. Le 5-ALA va être métabolisé principalement dans les cellules inflammatoires et va se transformer par réaction enzymatique en Pp-IX qui est photosensible (**Illustration 11AB**).

Nous voulons également tester un colorant ayant la caractéristique d'être photosensible qui est le BdM, du fait de sa structure cationique il a une action bactéricide<sup>277-279</sup> et il possède un délai d'incubation plus court par rapport au 5-ALA<sup>270</sup> (**Illustration 11CD**). Ce colorant est utilisé en pratique clinique dans le traitement des méthémoglobinémies<sup>280</sup> et en chirurgie pour le repérage des fistules digestives<sup>281</sup>. Il est facilement accessible, peu coûteux et non toxique. Son atout majeur est qu'il s'agit d'un dérivé de la phénothiazine possédant ainsi une action antimicrobienne par photo-inactivation des bactéries Gram-positives et Gram-négatives et pourrait donc avoir un impact sur la formation de biofilms bactériens résistants aux antibiothérapies aux seins des lésions fistulisées d'HS<sup>233,277-279,282</sup>. Des études ont rapporté une réduction de la viabilité bactérienne par le BdM<sup>283</sup>. *In vivo*, l'utilisation du BdM en PDT a montré une efficacité sur une infection cutanée d'une plaie par brûlure<sup>283</sup>. Son utilisation en PDT, à de fortes concentrations, a également montré des résultats encourageants sur l'altération de la formation de biofilms bactériens<sup>284</sup>. Par ailleurs, il existe des résultats préliminaires de l'utilisation de la PDT au BdM dans l'HS tout à fait intéressant<sup>270</sup>. Une équipe a montré sur une petite série de 7 patients, un taux de rémission de 71% à 5 mois après une à deux séances de PDT au BdM injecté au sein des lésions d'HS<sup>285</sup>. D'après ces données, l'utilisation du BdM comme PS pour la PDT dans l'HS pourrait s'avérer pertinente.

**A****B****C****D**

**Illustration 11. Structure chimique et spectre d'absorption des photosensibilisateurs utilisés.**

**A.** Structure chimique de la PP-IX. **B.** Spectre d'absorption de la PP-IX d'après Hernandez Quintanar et al., 2012<sup>286</sup>. **C.** Structure chimique du bleu de méthylène. **D.** Spectre d'absorption du bleu de méthylène d'après la thèse d'Amira Didj<sup>287</sup>.

## **OBJECTIFS & HYPOTHESES DE TRAVAIL**

Mon travail de thèse a été, tout d'abord, de caractériser notre modèle *in vitro* mimant l'HS, à partir de lignées cellulaires de KCs humains HacaT KO pour la *NCSTN*, obtenu grâce à une collaboration. Nous avons d'abord validé le modèle HaCaT KO obtenu en validant l'altération de l'expression des transcrits et de la protéine *NCSTN*. Ensuite, nous avons analysé le modèle kératinocytaire muté versus le modèle sauvage, en condition indifférenciée qui représente la couche basale épidermique et en condition différenciée correspondant aux couches suprabasales de l'épiderme. Ces caractéristiques sont importantes à prendre en compte pour analyser, dans un second temps, l'effet de la thérapie photodynamique sur ces couches kératinocytaires différentes tant sur le plan morphologique que fonctionnel. Nous avons également caractérisé notre modèle d'HS *in vitro* en condition inflammatoire, par l'ajout du LPS, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , dans le but de reproduire les conditions physiopathologiques de la maladie. Les objectifs étaient d'évaluer l'impact de l'inflammation sur la différenciation cellulaire, les voies de signalisation, l'expression de PAMs et les capacités de cicatrisation des kératinocytes dans le modèle HS (lignée *NCSTN*<sup>-/-</sup>) en comparaison au modèle sain (lignée sauvage).

En parallèle, afin d'obtenir les explants cutanés et les prélèvements sanguins de patients HS versus de donneurs sains, nous avons rédigé les documents réglementaires afin d'obtenir la validation du comité de protection des personnes (CPP) pour débiter l'étude clinique ImoHS. Il a été nécessaire dans le cadre de la future mise en place de l'étude ImoHS, de mettre au point au sein du laboratoire, la culture tissulaire d'explants cutanés. Nous avons donc testé 2 milieux de culture décrit dans la littérature sur nos explants cutanés tests, nous avons réalisé des analyses histologiques à différents temps de culture afin de nous assurer de la viabilité tissulaire, dans le but de ne pas induire de biais lors de la réalisation et de l'analyse du traitement par thérapie photodynamique sur nos modèles *ex vivo*. Nous avons également mise en place une stratégie d'enrichissement en ILCs, à partir de prélèvements sanguins de donneurs sains, afin de pouvoir les identifier et les caractériser par analyse en cytométrie de flux.

Enfin, nous avons réalisé l'étude de la thérapie photodynamique sur nos modèles *in vitro*, grâce à des dispositifs d'illumination spécifiques, applicables sur des plaques 96 puits, grâce à la collaboration avec l'équipe physico-PDT de l'unité OncoThAI. Nous avons fait le choix d'étudier deux photosensibilisateurs le 5-ALA et le BdM et

d'observer les effets sur les KCs du modèle HS en comparaison avec le modèle sain. Dans un second temps, nous avons développé et testé un nouveau dispositif d'illumination, afin de pouvoir illuminer les explants cutanés issus de patients HS (modèle *ex vivo*), exclusivement à travers la couche épidermique (système lumineux étanche). Nous avons pu illuminer des explants cutanés sains *via* l'utilisation de la technologie Genoskin© et évaluer par analyse histologique l'absence d'effet thermique (brûlure).



# **MATERIELS ET METHODES**



## A) Culture cellulaire

Les HaCaT sont des lignées cellulaires spontanément immortalisées de kératinocytes humains (mutation de p53 et perte de p16ink4a par hyperméthylation du promoteur de p16)<sup>288</sup>. Les deux lignées cellulaires de HaCaT sauvage (*wild type* WT) et mutée NCSTN<sup>-/-</sup> ont été obtenues à la suite d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Boniotto de l'Université Paris-Est Créteil (UPEC) et ont fait l'objet de publications scientifiques<sup>289,290</sup>. Le modèle HaCaT rendu *knock-out* sur le gène de la NCSTN a été obtenu grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Les ARN guides ciblant l'exon 8 du gène de la NCSTN ont été conçus à l'aide de l'outil de conception CRISPR et clonés dans le vecteur lentiCRISPR v2. Les cellules HaCaT ont ensuite été infectées puis sélectionnées à la puromycine<sup>289,291</sup>.

Les cellules ont été incubées à 37°C dans un incubateur 150i HERAcCell® (ThermoScientific®) à 95% d'humidité et à 5% de CO<sub>2</sub> et maintenues dans des conditions stériles. Les cellules HaCaT WT et HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup> ont été maintenues dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, ThermoFisher®, France) contenant 10% de SVF (sérum de veau foetal), 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et 1% de L-Glutamine. Le repiquage des cellules a été effectué de manière à ne pas dépasser une densité cellulaire de 80% pour ne pas perturber l'état de différenciation des HaCaT.

Initialement, afin de caractériser le modèle cellulaire, nous avons déterminé la concentration en calcium du milieu de culture, afin d'analyser les deux lignées de kératinocytes WT et KO, en condition indifférenciée à 0,03 mM de calcium (correspondant à la couche basale épidermique) et en condition différenciée à 2,8 mM de calcium (correspondant aux couches suprabasales épidermiques). Pour cela, nous avons utilisé un chélateur de Calcium pour éliminer le calcium présent dans le DMEM (Chelex® 100 resin, BIORAD, Etats-Unis). Nous ajoutons 5 g de résine pour 100 ml de milieu de culture sous agitation pendant 1 heure. Les tubes sont ensuite centrifugés afin de récupérer le milieu de culture dépourvu de chélateur et de calcium. Nous ajoutons ensuite le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> masse molaire 100,13 g/mol) (ProLabo, Merck Eurolab, France) afin d'obtenir les concentrations voulues nécessaire à la différenciation des cellules HaCaT.

Puis dans un second temps, pour le reste des analyses, nous avons cultivé de manière standard les 2 lignées kératinocytaires dans du milieu de culture DMEM à 1,7 mM de calcium (condition différenciée).

## **B) Analyse transcriptomique**

- **Extraction d'ARN**

L'ARN total est extrait à partir de  $2 \times 10^6$  cellules HaCaT WT et NCSTN<sup>-/-</sup> par séparation de phase en utilisant du Trizol® (Invitrogen, Waltham, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Après décongélation des échantillons, 200 µL de chloroforme (ProLabo, Merck Eurolab, France) sont ajoutés par 1 mL de Trizol®. Après 2 minutes d'incubation à TA, les tubes sont centrifugés à 12000 g (15 min, 4°C). La phase aqueuse contenant les ARN est récupérée, 500 µL d'isopropanolol (ACROS® Organics, USA) sont ajoutés et une incubation de 10 min à - 80°C est respectée. À la suite de cette incubation, les tubes sont centrifugés à 12 000 g (15 min, 4°C). Le culot d'ARN total est lavé à deux reprises avec de l'éthanol 75% (CARLO ERBA, France). Suivant les lavages, les culots d'ARN sont mis en suspension dans 30 µL d'eau RNase/DNase Free (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). L'ARN est quantifié par spectrométrie (absorbance à 260 nm) au NanoDrop® 2000c (Thermo FisherScientific, Waltham, Etats-Unis). Les ARN sont aliquotés et stockés à - 80°C.

- **Rétro-transcription (RT) des ARN en ADNc**

Le kit de Transcriptase Reverse Superscript™ II Rnase H est utilisé pour la RT (Life Technologies, GB). L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir de 2 µg/µL d'ARN total, dans un volume de 15 µL d'eau RNase-Free (RF). Puis, 5 µL de mélange composé de 1 µL d'oligo dT [8 nmol] (Roche Diagnostics, Allemagne), 0,1µL de RNAsin [40U/µL] (PROMEGA, USA) et 4 µL d'eau sans RNase (Life Technologies, GB) sont ajoutés à chaque échantillon. Après une incubation de 10 minutes à 70°C puis 5 min à TA, 10 µL d'un second mélange réactionnel contenant : 6 µL de Tampon 5X (Tris\_HCL, KCl, MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen, GB), 1 µL de DTT (DiThioThrétol) [0,1M] (Life Technologies, GB), 2 µL de dNTPs [10mM] (Amersham Biosciences, GB), 0,1 µL de RNAsin [40U/µL] (Promega, USA), 1 µL de Transcriptase Reverse Superscript™ II [200U/µL] (Life Technologies, GB), sont ajoutés. Les échantillons sont incubés 1 h à 45°C puis 5 min à 95°C. La concentration finale d'ADN complémentaire (ADNc) est ramenée à 10ng/µL dans de l'eau RNase/DNase free (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). Les ADNc sont stockés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

- **PCR quantitative en temps réel (qPCR)**

Il s'agit de la mesure de l'incorporation du SYBR Green (MesaGreen SYBR assay and Agilent Mx3005p, fluorochrome intercalant l'ADN) permettant de suivre la néosynthèse du double brin d'ADN. Cette réaction est réalisée à partir d'ADNc à une concentration de 10 ng d'ARN/μL et de mix réactionnel. Les amorces ont été construites et synthétisées spécifiquement pour la Q-PCR (Eurogentec, Seraing, Belgique). Nous avons analysé l'expression de 5 gènes de différenciation kératinocytaire, de 11 gènes de PAMs, de 11 gènes de voies de signalisation, de 11 gènes de cytokines/chemokines ainsi que 4 gènes de ménages (**Tableau 3**).

**Tableau 3.** *Tableau regroupant les séquences sens et anti-sens des primers utilisés pour l'analyse de 38 gènes d'intérêts et des 4 gènes de ménages retenus pour la PCR.*

	Gène	Sens	Anti-sens
<b>Gènes de ménage</b>	B-Actine	TAATGTCACGCACGATTTCCC	TCACCGAGCGCGGCT
	GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTG	CTCTTGTGCTCTTGCTGGG
	HPRT	CCCTGGCGTCGTGATTAG	ATGGCCTCCCATCTCCTT
	18S	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	CTGGTCATGTTTTTAGCCTCTTGT
<b>Gènes de différenciation kératinocytaire</b>	KRT 1	ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGA	CTTGGCATCCTTGAGGGCATT
	KRT 10	TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC	GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA
	KRT 14	TGGACGTGAAGACGCGGCTGG	GATTTGGCGGCTGGAGGAGGTC
	IVL	CTGCCTCAGCCTTACTGTGA	GGAGGAGGAACAGTCTTGAGG
	Filaggrine	CTGGACACTCAGTTCCCAT	TTTCGTGTTTGTCTGCTTGC
<b>Gènes de PAMs</b>	hBD1	AGATGGCCTCAGGTGGTAACT	GGGCAGGCAGAATAGAGACATT
	hBD2	TGATGCCTCTCCAGGTGTTT	GGATGACATATGGCTCCACTCTT
	hBD3	TCCATTATCTTCTGTTTGCTTT	TTCTGTAATGTGTTTATGATTCCTCCA
	S100A7	TGCTGACGATGATGAAGGA	GCAGAAACTCTTTTCTGTTCT
	S100A8	GTCCTCAGTTTGTGCAGAATA	CACCATCGCAAGGAAGCTC
	S100A9	TTTAGCTTGAAGAGCAAGAAG	TGTCCTTCCTTCTAGAGTATTG
	DCD	AGCATGAGGTTTCATGACTCTC	CACGCTTCTAGATCTTCGAC
	LL37	GGGCTCCTTTGACATCAGTTGT	GCCAATCTTCTTTAGATTTCCG
	RNAse7	GAAGACCAAGCGCAAAGC	CAGCAGAAGCAGCAGAAGG
	Élafine	TCTTGATCGTGGTGGTGTTCCTCA	TTTGACTGGCTCTTGCGCTTTGAC
	Chémérine	GAAGAAACCCGAGTGCAAAG	CTTGGAGAAGGCCAACTGTC
<b>Gènes voie de</b>	NCSTN	CTGTATGAGCTTGACAGGAGGA	GCAGGCGGGTAACCGTTT

<b>signalisation</b>	FOXP3	CACCTGGCTGGGAAAATGG	GGAGCCCTTGTCGGATGA
	NOTCH1	CCGTAGATGACCTGGGCAAGT	GGTGTCTCCTCCCTGTTGTTCT
	NOTCH2	CAACTGCCTTCCAGGTTTTGA	AGTGTGACCCCATCCACACA
	NOTCH3	CAGGGTGTCTTCCAGATTCTCATC	CCAGGATCAGTGCCGTTGA
	AKT3	TCAACAACTTTTCAGTGGCAAAA	ATTCTTCCCTTTCTCTGGAGTATC
	GATA3	TCATTAAGCCCAAGCGAAGG	GTCCCCATTGGCATTCTCTC
	RORyt	GCAGCGCTCCAACATCTTCT	ACGTAAGTGAATGGCCTCGGT
	Tbet	CGGCTGCATATCGTTGAGGT	GTCCCCATTGGCATTCTCTC
	PIK3R3	TCTTGCTCAGTACAATCCCAAAT	TCTCCTGATACTGAGAGTGGTATTCTTG
	MMP1	CATATATGGACGTTCCCAAATCC	TAAAGACAGATTCTACATGCGCAC
<b>Gènes de cytokines/ chemokines</b>	CCL20	CTGCTTTGATGTCAGTGCTGC	TCACCCAAGTCTGTTTTGG
	TGFβ	CTGCTGAGGCTCAAGTTAAAAGTG	TGAGGTATCGCCAGGAATTGT
	TNFα	CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	CATGTTGTAGCAAACCCTCAAGC
	IL-1β	GATGGCTTATTACAGTGCCAATGA	CAGAGGTCCAGGTCTCTGGAA
	IL-4	ACTTTGAACAGCCTCACAGAG	TTGGAGGCAGCAAAGATGTC
	IL-5	AAGAGACCTTGGCACTGCTTTC	GGAACAGGAATCCTCAGAGTCTCA
	IL-6	CCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA	GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC
	IL-8	TGTGTGTAACATGACTTCCAAGCT	GCAAAACTGCACCTTACACAG
	IL-9	GCAACATCAGTTCTGGCCAC	TGCTTCCAGGCTCCCCAGA
	IL-13	CCACGGTCATTGCTCTCACTTGCC	CCTTGTGCGGGCAGAATCCGCTCA
IL-22	TGGCAAAGAAGGGCTGTGTCAG	GCGGTGACCCTGGCATAGT	

Dans le cadre de l'étude des gènes des PAMs, de différenciation kératinocytaire et des voies de signalisation, les analyses ont été faites sur les lignées HaCaT WT et KO, en condition inflammatoire et condition contrôle. L'inflammation a été induite par l'ajout de TNF-α (TNF-α 20ng/mL), IL-6 (10 ng/ml) et de lipopolysaccharide (LPS) (500 ng/mL) pendant 48 heures. Nous avons ainsi pu analyser les variations d'expression des transcrits des différents gènes en condition standard versus inflammatoire.

Nous utilisons pour quantifier les transcrits le thermocycleur AriaMx (Agilent Technologie, Californie, Etats-Unis). Nous déposons 10 µL d'un couple d'amorces spécifiques pour 1 µL d'échantillon d'ADNc dans des plaques optiques 96 puits (Eurogentec, France). Après vortex et centrifugation rapide des plaques, nous utilisons le profil thermal recommandé par le fournisseur pour l'enzyme Meteor Taq comprise dans le Mesagreen®. Une première dénaturation à 95°C pendant 5 min est

réalisée (activation de l'enzyme), puis 45 cycles d'amplification de 15 secondes à 95°C puis de 1 min à 60°C (amplification de l'ADNc) et enfin un cycle de 1 min à 95°C, puis 30 secondes à 55°C suivi de 30 secondes à 95°C afin d'obtenir les courbes de fusion.

#### • Résultats des transcrits

L'expression des gènes est donnée en « CT » (Cycle Threshold) et normalisée sur la moyenne des 4 gènes de ménages ( $\Delta$ CT). L'expression quantitative relative d'un gène est interprétée en utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta$ CT<sup>292</sup> et les résultats sont représentés après normalisation de chaque résultat à celui concernant la condition des HaCaT WT non inflammatoire.

### C) Analyse protéique par Western Blot

Les cellules HaCaT en culture ( $2.10^6$  cellules) ont été récupérées et centrifugées à 300 g (5 min, TA) puis réalisation de 2 lavages au PBS<sup>-/-</sup> (tampon Phosphate Salin). Les culots cellulaires ont été lysés (15-20 min sur glace) dans un tampon de lyse (composé de 20 mM de Tris-HCL, 50 mM de NaCl, 5mM d'EDTA, 1% de Triton X-100 et 0,02% d'acide de sodium) (Novagen, EMD Chemicals, USA) complété par 1,25  $\mu$ L d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, USA). Après centrifugation à 14 000 g, 30 min à 4°C, les débris cellulaires ont été éliminés et les surnageants ont été recueillis puis conservés à -20°C. Les concentrations en protéines ont été mesurées à l'aide du test Bio-Rad Protein Assay selon les instructions du fabricant (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Les concentrations en protéines ont été mesurées par dosage colorimétrique de Bradford (BIO-RAD Laboratories GmbH, München). La gamme a été établie en préparant 400  $\mu$ L de dilutions en série de BSA (20  $\mu$ g/mL) (Fluka, Sigma, USA) dans de l'eau stérile. 100  $\mu$ L de réactif biorad ont été ajoutés dans chaque tube contenant 400  $\mu$ L de solution (lysate de protéine dilué au 1/2000ème dans l'eau). Puis 150  $\mu$ L de solution ont été déposés par puits en triplicata sur une plaque 96 puits à fond plat (Maxisorp<sup>TM</sup>, NUNC, Danemark) et l'ensemble a été conservé à l'obscurité pendant 10 min. L'absorbance à 595 nm a été lue au spectromètre (Multiskan, ThermoLabsystems France) et exprimée en  $\mu$ g/mL.

- **Electrophorèse et transfert**

Pour la préparation des échantillons, 11,25  $\mu\text{L}$  de bleu de charge 1X (NuPAGE LDS Sample buffer 4X, Invitrogen, USA) ont été mélangés à 4,5  $\mu\text{L}$  d'agent réducteur (NuPAGE LDS Sample reducing agent 10X, Invitrogen, USA). 10  $\mu\text{g}$  de protéines ont été rajoutés au mélange et le volume final a été ramené à 45  $\mu\text{L}$  avec du tampon de lyse. Les protéines ont été chauffées 10 min à 70°C puis centrifugées (300 g, 30 sec, TA), et déposées sur un gel dénaturant de poly-acrylamide (NuPAGE®NOVEX 4-12% Bis-Tris Gel, Life Technologies, USA). La migration a été réalisée dans un tampon MOPS 1X (tampon 20X, MOPS SDS Running Buffer, Euromedex, France), à 200 Volts, 1 h à TA. 14  $\mu\text{L}$  de marqueurs (7  $\mu\text{L}$  de Magic Mark XP western blot et 7  $\mu\text{L}$  de SeeBlue®plus2 Prestained standard 1X, Invitrogen, USA) ont été utilisés comme indicateur de taille. Après la migration, le gel a été récupéré et les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham, Biosciences, GB). Le transfert a été réalisé en tampon Tris-Gly (TrisGly 10X, pH 8,5, Euromedex, France) ; Méthanol (AnalaR NORMAPUR, VWR PROLABO, France) et eau dé-ionisée, à 65 Volts pendant 2h30 à 4°C. La qualité du transfert et l'équicharge ont été vérifiés par coloration au rouge ponceau de la membrane (Sigma, USA) pendant 5 min. La membrane a ensuite été décolorée par des bains d'eau dé-ionisée.

Après transfert, la membrane a été placée dans une solution de saturation contenant du PBS 1X (PBS 10X, Euromedex, France), du Tween 0,1% (Tween®20, BioSolve BV, France) et 5% de lait (Régilait, France) sous agitation à TA pendant 2 h. La membrane a ensuite été immergée dans une solution d'anticorps primaires pendant une nuit à 4°C sous agitation (**Tableau 4**). Nous avons utilisé la cyclophiline B comme protéine de contrôle présente dans les KCs basaux et différenciés.

Les membranes ont été lavées avec un tampon de blocage, puis incubées pendant 1 h sous agitation à TA avec une solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (anti-souris ou anti-lapin). Elles sont lavées à nouveau avec un tampon de blocage. La révélation des protéines a été faite à l'aide du kit Western Lightning Plus-ECL® Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer, Boston, USA) et la détection du signal luminescent est réalisée par l'appareil BioRad ChemiDoc XRS+ à l'aide du logiciel ImageLab.

**Tableau 4.** Tableau regroupant les anticorps primaires et secondaires utilisées lors de la quantification protéique par Western Blot.

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Anticorps secondaires</b>
<b>Mouse anti-NCSTN</b> (1/1000 <sup>ème</sup> ) (ADI-SPA-850-F, Enzo Life Sciences)	<b>Anti-mouse</b> (1/1000 <sup>ème</sup> ) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA)
<b>Mouse anti-IVL</b> (1/1000 <sup>ème</sup> ) (ab59479, Abcam, UK)	<b>Anti-mouse</b> (1/1000 <sup>ème</sup> ) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA)
<b>Rabbit anti-cytokératine 1</b> (1/5000 <sup>ème</sup> ) (NSJ Bioreagents, USA)	<b>Anti-rabbit</b> (1/1000 <sup>ème</sup> ) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA)
<b>Rabbit anti-Cyclophiline B</b> (1/100 <sup>ème</sup> ) (Galpharma, Japan)	<b>Anti-Rabbit</b> (1/1000 <sup>ème</sup> ) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA)

#### **D) Dosage de cytokines par multiplex**

Nous avons mis en culture nos modèles *in vitro* HaCaT WT et KO, en condition contrôle et en condition inflammatoire, après ajout de TNF- $\alpha$  (20 ng/mL), d'IL-6 (10 ng/ml) et du LPS (500 ng/mL). Les surnageants ont été recueillis à 24 et 48 h du traitement et analysés par immunodosage multiplex grâce au Magpix® (Luminex Corporation, Texas, USA) à l'aide de deux kits (Merck Millipore®, Darmstadt, Allemagne) : HCYTA-60K-01 (pour l'IL-22) et HCYTA-60K-07 (l'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 IL-10, IL-17, IL-20, IL-22, IL-23 et TNF- $\alpha$ ).

L'ensemble des cytokines citées a été couplé à des billes magnétiques et fluorescentes selon les instructions du fabricant (Merck Millipore®, Darmstadt, Allemagne). Ce dosage multi-antigénique comprend des étapes similaires à la technique ELISA standard. Une première étape de pré-lavage de la plaque par dépôt de 200  $\mu$ L de tampon de lavage est réalisée. Après le couplage des billes aux cytokines d'intérêts, 25  $\mu$ L du mélange a été distribué dans les puits d'une plaque opaque de microtitrage à fond plat (Fisher Scientific, Illkirch, Allemagne). Afin d'obtenir les concentrations des cytokines d'intérêt, les résultats ont été extrapolés à partir de la réalisation de 7 points de gamme standardisés déposés en parallèle. D'après le kit, nous avons également réalisé un duplicate de deux contrôles qualité. Un volume de 100  $\mu$ L de milieu conditionné non dilué et dilué au 1/2 et 1/5 dans du PBS Tween 0,01 % de BSA 1 % a été ajouté dans les puits en duplicate, puis homogénéisé et incubé avec les billes sur un agitateur de microplaque à l'abri de la lumière à 4°C durant la

nuit. A la suite de cela, trois lavages avec 200  $\mu\text{L}$  de tampon sont réalisés à l'aide d'un support aimanté afin de maintenir les billes au fond de la plaque. Ensuite, nous ajoutons 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps de détection biotinylé à chaque puits et l'ensemble est incubé à l'obscurité sous agitation à TA pendant 1 h. Puis nous ajoutons directement 50  $\mu\text{L}$  de streptavidine couplée à la phycoérythrine (protéine fluorescente) avec un temps d'incubation 30 min, sous agitation, à TA. Après trois lavages avec 200  $\mu\text{L}$  de tampon par puits à l'aide d'un support aimanté, nous remettons les billes en suspension dans 150  $\mu\text{L}$  de liquide de transmission par puit.

Nous réalisons l'analyse grâce au système Multiplex MAGPIX® (Millipore, USA) en utilisant le logiciel xPONENT® pour la détection des réponses d'anticorps. Les résultats représentent les concentrations de chaque cytokine dans le surnageant en pg/mL. Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs normalisées pour chaque puit d'un duplicate par rapport à ceux de la lignée HaCaT WT en condition non inflammatoire.

### **E) Test de cicatrisation de blessure (*ScratchWound Healing Assay*)**

Les lignées HaCaT WT et KO, en condition indifférenciée (0,03 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) et différenciée (1,7 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) ont étéensemencées ( $1,5 \times 10^5$  cellules/puits) en monocouche, dans une plaque à 96 puits, pour une durée totale de 72 h afin d'obtenir un tapis cellulaire à confluence avant la réalisation de la blessure. Nous avons réalisé notre analyse en condition inflammatoire par l'ajout d'IL-6 (10 ng/ml), du LPS (500 ng/ml) et du TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) dans chaque puit et une condition contrôle dans du milieu de culture habituel (non inflammatoire) 48 h avant la réalisation de la blessure. Ensuite, nous avons réalisé la blessure sur le tapis monocellulaire de chaque puit, de manière automatisée, à partir d'une plaque 96 puits, largeur de la blessure de 700 à 800  $\mu\text{m}$ , effectuée par l'outil *Incucyte® WoundMaker* (Essen BioScience). Un lavage au PBS a été réalisé à la suite de la blessure. Nous avons donc réexposé les cellules selon leurs conditions respectives (inflammatoire ou non), puis nous les avons incubés à 37 °C dans l'incucyte à 95% d'humidité et à 5% de  $\text{CO}_2$ . L'expérience de migration cellulaire a été menée sur 24 h avec une collecte des données toutes les 2 h. Nous avons quantifié la confluence des cellules, représentant la cinétique de la cicatrisation cellulaire, et nous avons exprimé nos résultats en pourcentage de fermeture de la blessure à l'aide de l'instrument *Incucyte® ZOOM System* par microscopie optique au grossissement x10 (Essen BioScience).

## F) Cytométrie en flux

Nous avons réalisé notre stratégie d'analyse des ILCs, à partir d'une poche de sang de donneurs sains par la collaboration avec l'Établissement Français du sang (EFS). Le sang a été dilué de moitié dans du PBS, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , (PBS<sup>-/-</sup>) (Gibco, Life Technologies, France) puis séparé grâce à un gradient par l'utilisation de milieu de séparation lymphocytaire (Eurobio, France) par centrifugation à température ambiante (RT) et sans frein. L'anneau de PBMCs (Cellules mononuclées du sang périphérique) a ensuite été récupéré et lavé deux fois dans du PBS avant un comptage cellulaire manuel sur cellules Thoma sous un microscope inversé (Eclipse TS100, Nikon). Nous avons ensuite utilisé des kits d'enrichissement pan-ILCs humain, selon les instructions du fabricant (EasySep®, Stemcell) conçu pour sélectionner et donc enrichir le prélèvement en ILC1, 2 et 3 par sélection immunomagnétique négative. Les cellules non désirées sont ciblées par des complexes d'anticorps associés à des particules magnétiques. Ainsi à l'aide d'un aimant, les cellules indésirables restent dans le tube et les ILCs peuvent être récupérés enrichissant ainsi le prélèvement. La suspension cellulaire a été incubée pendant 10 min à TA, à l'abri de la lumière, avec le réactif de blocage du FcR humain (Miltenyi Biotec, France).

Les ILCs ont ensuite été incubées pendant 15 min à TA et colorées avec des anticorps monoclonaux anti-humains conjugués à un fluorochrome (Miltenyi Biotec, Berlin, Allemagne), divisés en 2 panels, le cocktail des lignées cellulaires (sélection négative) et les marqueurs de différenciation des ILCs (**tableau 5**). La viabilité cellulaire est évaluée grâce à l'utilisation du marqueur viability 405/452 permettant de marquer les cellules mortes et ainsi de les discriminer des cellules vivantes. Pour la compensation, l'isotype contrôle des différents anticorps monoclonaux a été utilisé. L'analyse est réalisée au cytomètre de flux Attunes (BD Biosciences, France) et les données sont analysées à l'aide du logiciel FlowJo (plateforme d'imagerie Cellulaire BICEL).

**Tableau 5.** Panels d'anticorps pour immunophénotypage des ILCs par cytométrie de flux.

Panel ILC	Antigène Cible	ILC1	ILC2	ILC3 NCR+	ILC3 NCR-	Fluorochrome
Sélection négative	CD3					PE vio 615
	CD14					
	CD33					
	CD34					
	CD203c					
	FceRI	—	—	—	—	
	CD11c					PerCP vio 700
	CD16					
	CD19					
Marqueurs de différenciation des ILC	CD45	+	+	+	+	Viogreen
	CD127	+	+	+	+	PE vio 770
	CD117	-	+/-	+	+	PE
	CD56	-	-	+	-	APC vio 770
	NKp46	-	-	+	-	Viobright 515
	CRTH2	-	+	-	-	APC

### G) Mise en culture d'explants cutanés

Nous avons recueilli des explants cutanés de 1 cm<sup>3</sup>, issus d'abdominoplastie de patients (tissu sain), considérés comme des déchets opératoires, grâce à la collaboration avec le chirurgien le Docteur A.Dabrowski, Hôpital Saint Philibert de Lomme, GHICL (Groupements des Hôpitaux Catholiques de Lille) et après obtention de l'autorisation du CPP. Les explants cutanés ont été disposés sur des inserts de culture Transwell® 0,4 µm, afin que le derme soit en contact avec le milieu de culture et que la surface de l'épiderme ne soit pas en contact avec le milieu reproduisant au mieux les conditions physiologiques. Ils ont été maintenus dans un incubateur humidifié à 37 °C et avec présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Ces explants ont été cultivés, pendant 24 jours, dans deux milieux de culture différents par :

- Milieu DMEM + 10% de SVF + 1% L-Glutamine + 1% pénicilline et streptomycine
- 3 volumes de milieu DMEM pour 1 volume de F12-K + 10% SVF + 1% L-glutamine

### H) Protocole d'histochemie

Nous avons initialement évalué la viabilité des tissus cutanés, à J1, J3, J7, J10, J14, J17, J21 et J24 de temps de culture, nous avons réalisé une technique d'histochemie. Les explants cutanés ont été fixés dans du formaldéhyde tamponné à 4% pour assurer leur conservation. Les tissus ont ensuite été déshydratés par passage

dans différents bains d'une durée d'une heure par bain : 2 bains d'éthanol 70%, 2 bains d'éthanol 100%, 2 bains de toluène, un bain de paraffine, puis enfin un dernier bain de paraffine sur la nuit. Les échantillons sont ensuite insérés dans des blocs de paraffine, et sont conservés à 4°C. Nous avons ensuite réalisé des microcoupes de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome qui ont été appliquées sur des lames SuperFrost® (Menzel-Glaser, Braunschweig, Allemagne).

Les échantillons ont été réhydratés avec deux bains de xylène (3 min chacun), deux bains d'éthanol 100% (2 min), un bain d'éthanol 95% (2 min), un bain d'éthanol 70% (2 min) et un bain d'eau distillée (1 min). Ensuite, les échantillons ont été colorés avec un bain d'hématoxyline pendant 5 min, suivi d'un bain d'eau (3 min), puis d'un bain d'éthanol 70% (30 sec), un bain d'éosine (5 min), un bain d'éthanol 70% (30 sec), un bain d'éthanol 95% (1min), un bain d'éthanol 100% (1min) et enfin un bain de safran (10 sec). La coloration des coupes à l'Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) et l'analyse histologique ont été réalisées avec l'aide de l'équipe du Docteur Quinchon, anatomopathologiste, à l'hôpital Saint Vincent de Paul de Lille.

Après coloration, les échantillons ont été déshydratés avec un bain d'éthanol 70% (30 sec), un bain d'éthanol 95% (1 min), deux bains d'éthanol 100% (1min) et deux bains de xylène (2 min et 3 min). Les tissus cutanés ont été analysés au microscope (Leica DM 2500). Les lames ont ensuite été scannées avec l'Axioscan Z1 de BICeLL Platform de Lille.

Nous avons réalisé la même méthode d'histochimie concernant les explants cutanés Genoskin©, modèle *ex vivo*, après illumination seule, à différentes fluences, pour évaluer l'impact sur la viabilité tissulaire.

## **1) Test de fluorométrie**

### **Analyse de l'incorporation intracellulaire du bleu de méthylène**

Les cellules HaCaT ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10000 cellules/puits). Après 48 h, les cellules sont incubées avec le photosensibilisateur le BdM à différentes concentrations : 0 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM et 150 µM pendant 30 sec, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h ou 24 h. Après incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite illuminées à la longueur d'onde d'excitation du PS (653±15nm), la longueur d'onde d'émission (693±15nm) réémise est mesurée par le spectromètre (CLARIOstarplus, BMG Labtech) afin d'évaluer le taux d'incorporation du PS en intra-cellulaire.

## **Analyse de l'incorporation intracellulaire du 5-ALA**

Les cellules HaCaT ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10000 cellules/puits). Après 48 h, les cellules sont incubées avec le photosensibilisateur le 5-ALA à différentes concentrations : 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM et 4 mM pendant 30 sec, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, ou 6 h. Après incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite illuminées à la longueur d'onde d'excitation du PS (635±15nm), la longueur d'onde d'émission (650±15nm) réémise est mesurée par le spectromètre (CLARIOstarplus, BMG Labtech) afin d'évaluer le taux d'incorporation du PS en intra-cellulaire.

### **J) Protocole de thérapie photodynamique (PDT)**

#### **PDT *in vitro* au bleu de méthylène**

Les cellules HaCaT ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10000 cellules/puits). Après 48 h, les cellules ont été incubées pendant deux heures avec le BdM, à 0 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM 8 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM et 150 µM. Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (GIBCO BRL TM, Invitrogen, GB). Les cellules sont ensuite illuminées à la longueur d'onde spécifique de 668nm, en continue pendant 1h30, à 3 mW (5,2 J/cm<sup>2</sup>).

#### **PDT *in vitro* au 5-ALA**

Les cellules HaCaT ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10000 cellules/puits). Après 48 h, les cellules ont été incubées pendant 2 h avec le 5-ALA, à 0 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 6 mM, 8 mM et 10 mM. Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (GIBCO BRL TM, Invitrogen, GB). Les cellules sont ensuite illuminées à la longueur d'onde spécifique de 635nm, en continue pendant 1 h, à 3 mW (3,6 J/cm<sup>2</sup>).

Pour les 2 types de PDT, l'illumination *in vitro* a été réalisée avec un dispositif spécifique développé par OncoThAI<sup>293</sup>. Pendant toute la durée de l'illumination, les cellules sont incubées à 37°C dans un incubateur 150i HERAcell® (ThermoScientific®) à 95% d'humidité et à 5% de CO<sub>2</sub> et maintenues dans des conditions stériles. L'analyse de la viabilité cellulaire est réalisée avec le kit CellTiter Glo® (Promega) à 10 min, 24 h, 48 h et 72 h après le traitement par PDT. Le surnageant est récupéré, centrifugé puis congelé à moins 20°C. Afin d'analyser les

résultats du traitement par PDT, 4 conditions/contrôles ont été réalisés : cellules non traitées, cellules au contact du PS mais sans illumination, cellules illuminées uniquement et les cellules soumises à la PDT.

### **Etude ex vivo**

Pour la mise en place des paramètres de PDT, nous avons utilisé un modèle de peau NativeSkin® (Genoskin, Toulouse, France), il s'agit d'un modèle *ex vivo* standardisé de peau humaine. Grâce à l'incorporation des explants cutanés dans des inserts de culture tissulaire, il est possible de maintenir la biologie et la physiologie de la peau, la fonction de barrière cutanée et le métabolisme pendant 7 jours de culture. Les explants cutanés provenaient d'un même donneur sain, de phototype 2-3, issus de pièces d'exérèses d'abdominoplastie. Ces explants cutanés sont illuminés en continu, pendant 5 min, à différentes irradiances : 100 mW/cm<sup>2</sup>, 150 mW/cm<sup>2</sup>, 200 mW/cm<sup>2</sup>, 250 mW/cm<sup>2</sup>. Nous avons ensuite réalisé une analyse histochimique des explants cutanés aux différentes conditions.

### **K) Analyses statistiques**

Le traitement des données ainsi que les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism® (Graphpad, San Diego, Californie, États-Unis). Nous avons réalisé un t-test pour l'analyse de l'expression génique et protéique de la NCSTN, un multiple t-test pour l'expression des transcrits des cytokines, un test ANOVA à 2 facteurs (two-way) pour l'analyse des taux de cytokines au multiplex ainsi que l'expression génique des marqueurs de différenciation et des PAMs, l'analyse de l'incorporation du PS en fluorométrie et les tests de viabilité cellulaire après PDT. La signification des valeurs p est la suivante :  $p > 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) et  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $p < 0,05$  étant considéré comme statistiquement significatif et les valeurs p inférieures comme hautement significatives.



# **RESULTATS**



## **A. Caractérisation de la réponse inflammatoire de l'HS à partir d'un modèle *in vitro* de lignée kératinocytaire humaine**

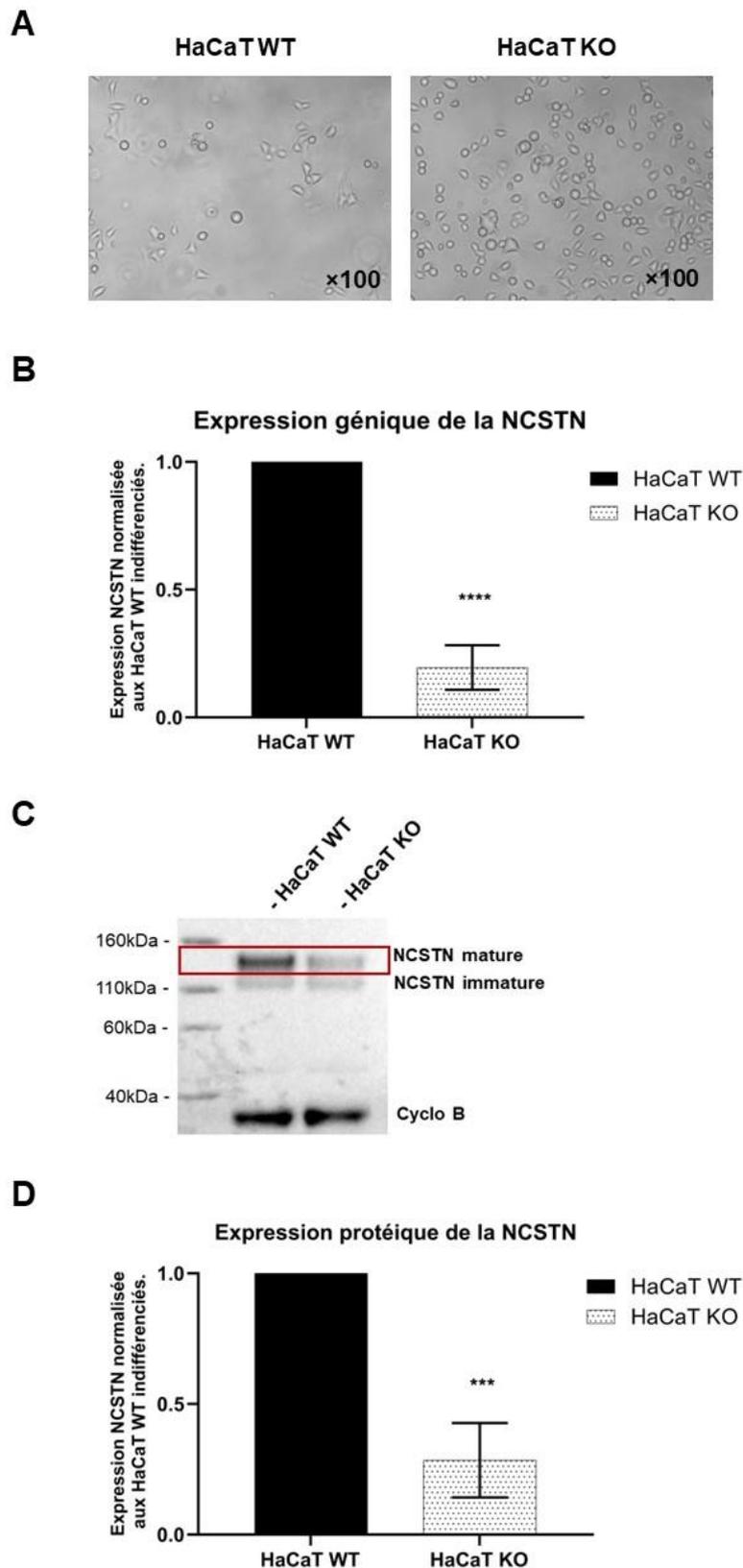
### **A1) Caractérisation du modèle *in vitro* HaCaT KO (modèle HS)**

Nous avons mis en place une collaboration avec le Docteur Boniotto, rattaché à l'unité INSERM U955 à l'université Paris Est Créteil, qui nous a fourni les lignées cellulaires de KCs humains immortalisés HaCaT sauvage (WT) et *knock-out* (KO) pour le gène de la Nicastrine (*NCSTN*<sup>-/-</sup>) par technique Crispr-Cas9. Cette dernière lignée a été décrite et publiée par plusieurs équipes afin de mimer, de manière expérimentale, le modèle d'HS<sup>126,126,289</sup>. Nous avons ensuite caractérisé sur le plan morphologique, transcriptomique et protéique nos lignées HaCaT. La culture cellulaire a été réalisée dans des milieux à concentration calcique contrôlée afin d'observer respectivement les états indifférenciés (0,03mM de Ca<sup>2+</sup>) et différenciés (2,8mM de Ca<sup>2+</sup>) des deux lignées kératinocytaires HaCaT.

Dans un premier temps, en condition indifférenciée, nous avons pu observer une concordance morphologique des lignées HaCaT WT et KO. Les cellules HaCaT indifférenciées représentant la couche basale de l'épiderme, nous avons observé en microscopie optique, qu'elles ont une forme fusiforme et peu compacte entre elles que ce soit pour la lignée HaCaT WT et KO (**Fig.1A**).

Nous avons également vérifié l'expression transcriptomique et protéique de la *NCSTN* chez nos deux lignées. Nous avons utilisé pour contrôle endogène la *Beta-Actine* et la *GAPDH* (*GlycerAldehyde-3-Phosphate DesHydrogenase*) en RT-qPCR et la Cyclophiline-B en Western Blot, toutes trois constitutivement exprimées par les KCs basaux et différenciés. Les valeurs issues de la RT-qPCR ont été normalisées par rapport au HaCaT WT. Nous observons une baisse significative d'environ 80% ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,195$ , DS=0,087;  $p < 0,0001$ ) du taux normalisé de transcrits pour le gène de la *NCSTN* chez nos lignées HaCaT KO par rapport aux HaCaT WT (**Fig.1B**). Ces résultats ont été confirmés par Western Blot avec une diminution en moyenne de 72% ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,284$ , DS=0,142;  $p < 0,001$ ) de l'expression normalisée de la protéine *NCSTN* mature chez nos HaCaT KO *versus* HaCaT WT (**Fig.1CD**).

Ainsi, en condition indifférenciée, le modèle HaCaT KO montre des caractéristiques morphologiques similaires aux HaCaT WT. Néanmoins, nous observons bien une diminution de l'expression génique et protéique de la *NCSTN* dans le modèle expérimental mimant l'HS.



**Figure 1 : Caractérisation du modèle *in vitro* HaCaT WT et KO indifférenciés.**

**A.** Étude par microscopie optique (x100) des lignées HaCaT WT et KO en condition indifférenciée (0,03 mM de  $Ca^{2+}$ ). **B.** Evaluation du taux de transcrit du gène de la NCSTN par RT-qPCR chez nos lignées WT et KO, en condition indifférenciée, quantification relative aux HaCaT WT; n=3, T- test, \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ . **C.** Analyse par Western Blot du taux de la protéine NCSTN chez nos lignées WT et KO en condition indifférenciée. **D.** Quantification relative aux HaCaT WT indifférenciés de la protéine NCSTN mature par Western Blot ; n=3, T- test, \*\*\* =  $P < 0,001$ .

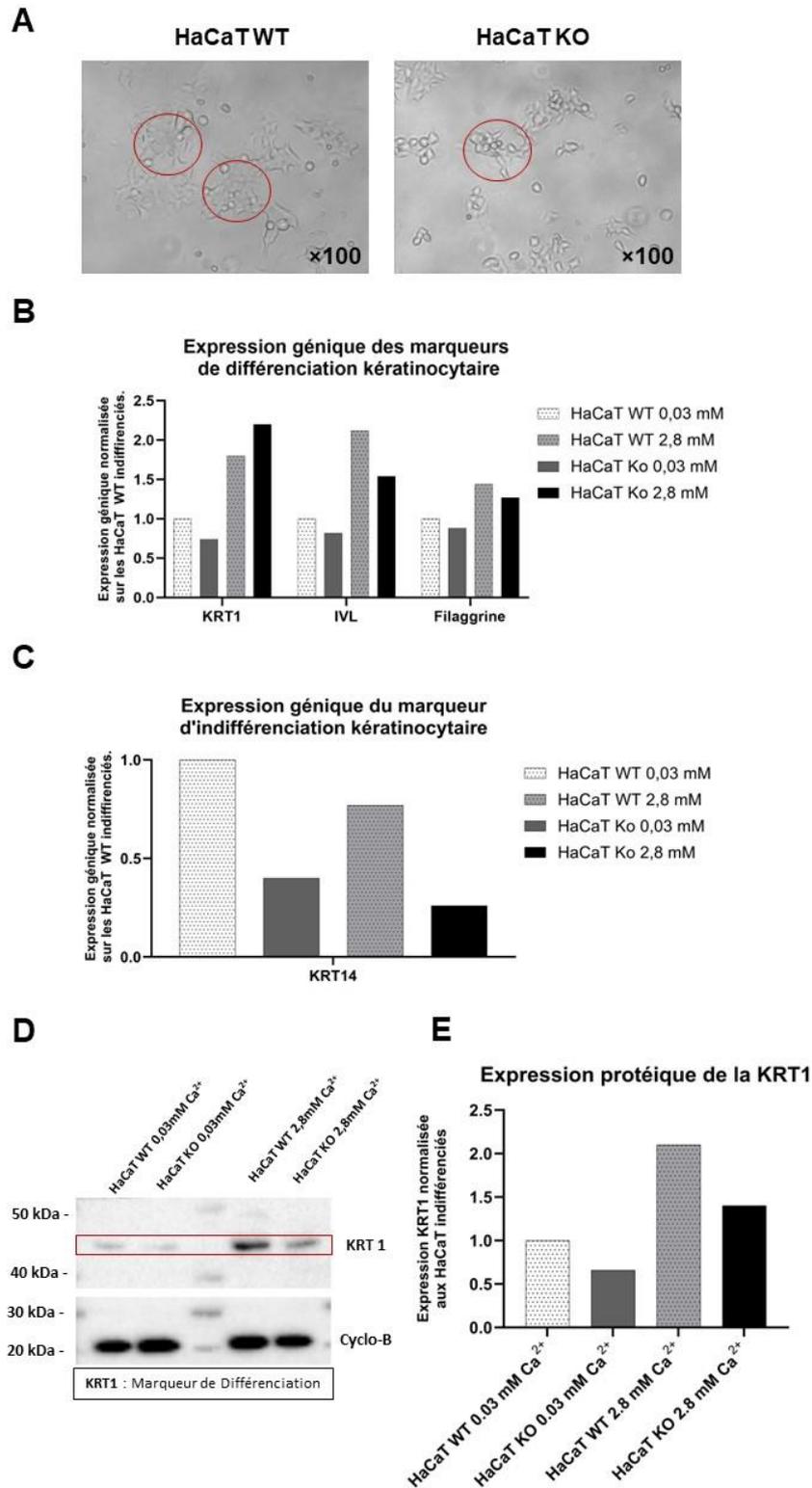
## A2) Caractérisation des états de différenciation des lignées kératinocytaires HaCaT WT et KO

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la différenciation de nos lignées. D'après les données de la littérature, l'augmentation de la concentration calcique du milieu de culture des cellules HaCaT de 0,03mM à 2,8mM pendant 7 jours permet d'induire la différenciation<sup>294</sup>. Il a été décrit dans la littérature une altération de la kératinisation ainsi qu'une hyperprolifération des KCs<sup>123,295,296</sup>. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à caractériser un trouble de différenciation entre nos deux lignées qui pourrait expliquer ces anomalies décrites.

Nous montrons que les KCs différenciés, qui représentent la couche suprabasale de l'épiderme, sont plus denses et prennent une forme cuboïdale chez les HaCaT WT ce qui correspond à l'aspect stratifié de la barrière cutanée (**Fig.2A**). Dans le modèle HaCaT KO, nous notons également un changement morphologique en condition différenciée, mais différent du modèle WT, avec des KCs ayant une forme spiculée/étoilée et restant bien individualisées (**Fig.2A**).

Nous avons, en plus des considérations morphologiques, contrôlé l'expression de marqueurs de différenciation : kératine 1 (KRT 1), IVL et filaggrine et un marqueur d'indifférenciation : kératine 14 (KRT 14). Nous avons normalisé nos résultats sur la moyenne de nos contrôles endogènes qui sont la *Beta-Actine* et la *GAPDH* et nous exprimons les résultats en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  après normalisation sur la valeur obtenue pour les HaCaT WT indifférenciés. Nous observons, comme attendue, une augmentation de l'expression génique des marqueurs de différenciation KRT 1 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=1,8$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=2,2$ ], IVL [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=2,12$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,54$ ], filaggrine [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=1,44$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,27$ ], d'un facteur allant de 1,4 à 2,2 chez les HaCaT WT et KO respectivement en condition différenciée par rapport à la condition WT indifférenciée. Cependant le taux d'expression génique des marqueurs de différenciation des HaCaT KO, en condition indifférenciée et différenciée, semble être moins important par rapport aux HaCaT WT de la même condition sauf pour la KRT1 (**Fig.2B**). Nous observons une diminution du taux de transcrits du gène de la KRT 14 chez notre lignée HaCaT WT différenciés [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,77$ ] par rapport aux HaCaT WT indifférenciés ce qui était également attendu. Dans la lignée HaCaT KO, le taux d'expression génique de la KRT14 est diminué dans les conditions indifférenciées [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,40$ ] et différenciées [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,26$ ], par rapport aux WT dans les mêmes conditions de différenciation (**Fig.2C**).

Lorsque nous regardons l'expression protéique de la KRT1, en Western Blot (bande à 45 KDa), il existe bien une augmentation chez nos 2 lignées HaCaT en condition différenciée [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=2,1$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,40$ ], comparé à la condition indifférenciée [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=0,66$ ] (**Fig.2DE**). Après quantification protéique, nous montrons cependant une diminution d'un facteur de 1,5 de la présence de la protéine KRT 1 chez les HaCaT KO par rapport aux HaCaT WT différenciés (**Fig.2E**). En ce qui concerne l'expression protéique de l'IVL, il existe une diminution de son expression chez les HaCaT KO différenciés [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,92$ ] comparé aux HaCaT WT différenciés [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=2,00$ ] (**Fig.S1**). Nos données suggèrent que la lignée HaCaT KO, à l'état différencié, présente une diminution d'expression des marqueurs de différenciation (KRT1 et IVL) et d'indifférenciation kératinocytaire (KRT14) par rapport à la lignée HaCaT WT du même statut de différenciation. Ces résultats restent à confirmer sur des analyses répétées. La lignée HaCaT KO montre des altérations de sa capacité de différenciation cellulaire, tant sur le plan morphologique, transcriptomique et protéique, par rapport à la lignée HaCaT WT.



**Figure 2 : Caractérisation de l'état de différenciation du modèle *in vitro* HaCaT WT et KO.**

**A.** Étude en microscopie optique (x100) des lignées HaCaT WT et KO en condition différenciée à 2,8 mM de Ca<sup>2+</sup>. **B.** Evaluation du taux de transcrite des gènes de différenciation (KRT 1, IVL, Filaggrine) par RT-qPCR chez nos lignées WT et KO, quantification relative aux HaCaT WT indifférenciés ; n=1. **C.** Evaluation du taux de transcrite du gène d'indifférenciation (KRT14) par RT-qPCR chez nos lignées WT et KO, quantification relative aux HaCaT WT indifférenciés, n=1. **D.** Analyse de l'expression protéique de la KRT 1 par Western Blot chez nos lignées WT et KO. **E.** Quantification relative de la protéine KRT 1 chez nos lignées WT et KO par rapport aux HaCaT WT indifférenciés par Western Blot, n=1.

### A3) Evaluation de la réponse inflammatoire à partir du modèle *in vitro* d'HS.

Il a été montré que l'auto-inflammation dans l'HS jouait un rôle majeur notamment dans la pérennisation des lésions. Il a été décrit que les KCs participaient à cette inflammation, notamment par la sécrétion de cytokines et chémokines. Il s'agit de cellules sentinelles, faisant partie du système immunitaire cutané<sup>211,288,295,296</sup>. Nous avons donc voulu analyser l'expression génique des cytokines/chemokines de la réponse inflammatoire dans nos 2 lignées kératinocytaires, en condition de culture standard (contrôle) et après induction d'une inflammation par l'ajout de LPS+TNF- $\alpha$ +IL-6 pendant 48 heures. Ces résultats ont été normalisés sur la moyenne des contrôles endogènes (*GAPDH*, *B-Actine*, *HPRT* et *18S*). Les résultats sont exprimés en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  par rapport à la valeur obtenue pour les HaCaT WT contrôle. Dans un second temps, nous avons réalisé un dosage des cytokines sécrétées dans le milieu de culture de nos 2 lignées, dans les mêmes conditions standard/inflammatoire afin d'identifier des différences dans la réponse inflammatoire entre les HaCaT WT et KO.

En ce qui concerne les transcrits des cytokines de la voie T<sub>H</sub>2, nous observons pour les transcrits de l'IL-4, un taux indétectable dans la lignée HaCaT KO en condition contrôle et une diminution pour les HaCaT KO en condition inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,06$ -SD=0,02] par rapport à la lignée WT contrôle (**Fig.3A**). Nous notons une légère augmentation d'un facteur 1,5 de l'IL-5 pour les HaCaT KO contrôle [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,49$ -SD=0,6] mais une diminution de plus de la moitié de l'expression de cette cytokine pour les HaCaT KO inflammatoires [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,37$ -SD=0,16] comparé aux WT contrôle (**Fig.3A**). Il est mis en évidence une augmentation d'un facteur de 2 à 2,5 de l'expression de l'IL-13 pour la lignée KO, respectivement en condition contrôle [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=2,58$ -SD=1,16] et en condition inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,98$ -SD=0,15], comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3A**). Nous décrivons également une élévation du TGF- $\beta$  pour les 2 lignées en condition inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=1,43$ -SD=0,04 ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,19$ -SD=0,06] ainsi que pour les HaCaT KO contrôle [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,26$ -SD=0,01] comparé aux WT contrôle (**Fig.3A**). L'expression génique de la chemokine CCL20 est significativement augmentée dans les HaCaT WT en condition inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=2,07$ -SD=0,17 ;  $p<0,001$ ] comparé aux HaCaT KO inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,45$ -SD=0,09] (**Fig.3A**). Nous remarquons une nette élévation de l'expression du TNF- $\alpha$ , chez les HaCaT KO inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=5,75$ -SD=0,3] versus les HaCaT WT contrôle. Nous observons également une élévation chez les HaCaT KO contrôle [ $2^{-$

$\Delta\Delta Ct=2,33-SD=0,2]$  et les HaCaT WT inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=3,03-SD=0,75]$  par rapport aux HaCaT WT contrôle. Nous remarquons également une élévation de l'expression d'IL-1 $\beta$  [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=2,31-SD=0,05$ ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,21-SD=0,19]$  et de l'IL-8 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=4,39-SD=0,19$ ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,64-SD=0,39]$ , dans les 2 lignées WT et KO respectivement, en condition inflammatoire, par rapport à la lignée WT contrôle (**Fig.3A**). Nous remarquons une diminution nette de l'expression du transcrite de l'IL-22 que ce soit pour les WT [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,15]$  ou les KO [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,42-SD=0,05]$ , en condition inflammatoire par rapport aux HaCaT WT contrôle et l'absence de transcrite retrouvé pour les HaCaT KO en condition standard (**Fig.3A**).

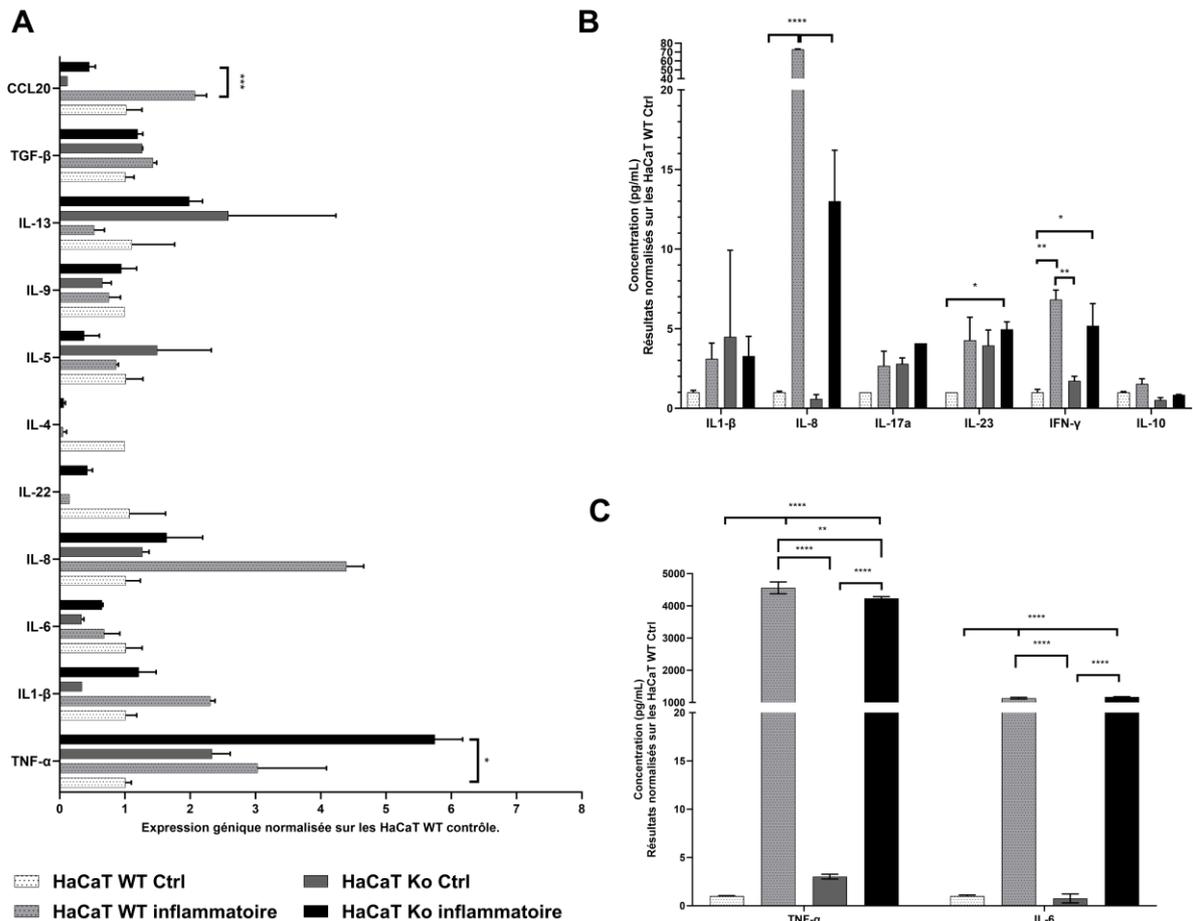
Ces données ont été confirmées par analyse multiplexe, nos résultats ont été normalisés sur les valeurs de concentrations obtenues chez les HaCaT WT non inflammatoires. Nous remarquons une élévation significative de concentration d'IL-8 chez les HaCaT WT ( $C_{WT}= 73,12$  pg/mL [ $SD=0,26$  pg/mL];  $p<0,0001$ ) et chez les HaCaT KO ( $C_{KO}= 13,01$  pg/mL [ $SD=2,25$  pg/mL];  $p<0,0001$ ) en condition inflammatoire comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3B**). Nous observons également une élévation pour l'IL23 concernant les HaCaT KO ( $C_{KO}=4,96$  pg/mL [ $SD=0,33$  pg/mL];  $p<0,1$ ) et pour les HaCaT WT ( $C_{WT}= 4,27$  pg/mL [ $SD=1,01$  pg/mL]) en condition inflammatoire comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3B**). Il existe également une augmentation significative d'IFN- $\gamma$  pour les HaCaT WT ( $C_{WT}=6,82$  pg/mL [ $SD=0,42$  pg/mL];  $p<0,01$ ) et également pour les HaCaT KO ( $C_{KO}= 5,18$  pg/mL [ $SD=0,98$  pg/mL];  $p<0,1$ ), en condition inflammatoire, comparativement aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3B**). Nous décrivons également une élévation non significative de l'IL-1 $\beta$  ( $C_{WT}= 3,11$  pg/mL [ $SD=0,7$  pg/mL];  $C_{KO}=3,28$  pg/mL [ $SD=0,87$  pg/mL]) et de l'IL-17A ( $C_{WT}= 2,66$  pg/mL [ $SD=0,64$  pg/mL];  $C_{KO}=4,08$ pg/mL [ $SD=0,02$ pg/mL]), chez les HaCaT WT et KO respectivement, comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3B**).

En condition non inflammatoire, chez les HaCaT KO, nous avons décrit une augmentation non significative de concentration d'IL-1 $\beta$  ( $C_{KO}=4,48$  pg/mL [ $SD=3,83$  pg/mL]), d'IL-17A ( $C_{KO}=2,79$  pg/mL [ $SD=0,26$  pg/mL]), d'IL-23( $C_{KO}=3,94$ pg/mL [ $SD=0,68$  pg/mL]) et d'IFN- $\gamma$  ( $C_{KO}=1,72$  pg/mL [ $SD=0,19$  pg/mL]) comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3B**). Nous observons une diminution de l'IL-10 dans notre lignée HaCaT KO en condition contrôle et inflammatoire ( $C_c= 0,51$  pg/mL [ $SD=0,10$  pg/mL];  $C_{INF}=0,84$  pg/mL [ $SD=0,03$  pg/mL]) comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.3B**). Le taux d'IL-22 était indétectable dans nos 2 lignées pour les conditions contrôle et inflammatoire.

Nous avons représenté sur un graphique isolé, le dosage du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6

obtenu par analyse multiplexe, du fait que ces cytokines étaient ajoutées initialement aux milieux de culture cellulaire pour induire une réponse inflammatoire, à la concentration respective de 20 ng/mL et 10 ng/ml.

Nous remarquons, comme attendu, des élévations de concentration significatives de TNF- $\alpha$  ( $C_{WT}=4558,71$  pg/mL [SD=131,16 pg/mL];  $C_{KO}=4233,84$  pg/mL [SD=37,81 pg/mL]) et d'IL-6 ( $C_{WT}=1132,52$  pg/mL [SD=18,15 pg/mL];  $C_{KO}=1175,09$  pg/mL [SD=4,93 pg/mL]) des HaCaT WT et KO respectivement, en conditions inflammatoires par rapport aux conditions non inflammatoires (**Fig.3C**). Il est intéressant de noter qu'il existe une augmentation de concentration non significative, d'un facteur 3 du TNF- $\alpha$ , chez les HaCaT KO contrôle ( $C_{KO}=3,02$  pg/mL [SD=0,17 pg/mL]), comparé aux WT contrôle, alors que le taux d'IL-6 est identique dans les 2 lignées en condition non inflammatoire ( $C_{KO}=0,76$  pg/mL [SD=0,32 pg/mL]) (**Fig.3C**). Ainsi, l'analyse des transcrits et le dosage des cytokines montrent une élévation des cytokines pro-inflammatoires de la voie T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17 que ce soit pour les HaCaT WT et KO en condition inflammatoire. Fait très intéressant, à l'état basal, le modèle HaCaT KO semble produire des cytokines pro-inflammatoires, avec une augmentation de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17A, l'IL-23, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , ainsi qu'une diminution de sécrétion d'IL-10, cytokine immunosuppressive, par rapport au modèle HaCaT sauvage. Les kératinocytes HaCaT KO semblent être activés à l'état basal, avec un profil inflammatoire, comparativement aux kératinocytes HaCaT sauvage.



**Figure 3 : Caractérisation de la réponse inflammatoire du modèle *in vitro* HaCaT WT et KO.**

**A.** Evaluation du taux de transcrite des gènes de cytokines/chemokines de la réponse inflammatoire, par RT-qPCR, chez nos lignées WT et KO, en condition non inflammatoire (contrôle) et en condition inflammatoire (LPS + IL-6 + TNF- $\alpha$ ), quantification relative aux HaCaT WT contrôle ; n=2, multiple t-test, \* = P < 0,1, \*\*\* = P < 0,001. **B.** Dosage des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17A, IL-23, IFN- $\gamma$  et IL-10) par analyse multiplexe, des milieux conditionnés des lignées HaCaT WT et KO, en condition non inflammatoire et inflammatoire (LPS + IL-6 + TNF- $\alpha$ ) ; n=1, 2 way ANOVA, \* = P < 0,1, \*\* = P < 0,01, \*\*\*\* = P < 0,0001. **C.** Dosage des cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-6) par analyse multiplexe, des milieux conditionnés des lignées HaCaT WT et KO, en condition non inflammatoire et inflammatoire (LPS + IL-6 + TNF- $\alpha$ ) ; n=1. Test ANOVA à 2 facteurs (two-way), \*\* = P < 0,01, \*\*\*\* = P < 0,0001.

#### **A4) Analyse de l'impact de l'inflammation sur les voies de signalisation et différenciation kératinocytaire.**

Actuellement, il est encore difficile d'identifier les causes et conséquences dans la pathogenèse de l'HS, surtout que se met en place une boucle d'amplification de l'inflammation pérennisant l'atteinte lésionnelle de la maladie<sup>203,215</sup>. Nous avons donc voulu analyser l'impact de l'inflammation sur l'expression génique des transcrits de voies de signalisation et de marqueurs de différenciation kératinocytaire dans nos 2 lignées HaCaT WT et KO, afin d'identifier l'impact de l'inflammation notamment dans le modèle *in vitro* d'HS. Ces résultats ont été normalisés sur la moyenne des contrôles endogènes (*GAPDH*, *B-Actine*, *HPRT* et *18S*). Les résultats sont exprimés en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

par rapport à la valeur obtenue pour les HaCaT WT contrôle. Tout d'abord, en ce qui concerne l'analyse des voies de signalisation, nous observons une diminution au minimum de 40% des transcrits de MMP-1, GATA3 et AKT3 dans la lignée HaCaT KO, que ce soit en condition non-inflammatoire ou inflammatoire, pour MMP-1 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=0,24$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=0,62$ ], pour GATA3 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=0,40$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=0,16$ ] et pour AKT3 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=0,23$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=0,09$ ] comparativement à la lignée HaCaT WT contrôle (**Fig.4A**). Nous observons une élévation des transcrits de Tbet [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=4,44$ ] et ROR $\gamma$ t [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=3,51$ ] dans notre lignée HaCaT KO inflammatoire versus HaCaT WT contrôle. A noter que l'élévation du transcrit Tbet est déjà présente dans la lignée HaCaT KO contrôle [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=1,92$ ] alors qu'elle est induite par l'inflammation pour ROR $\gamma$ t [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=0,24$ ] (**Fig.4A**). Nous mettons en évidence une nette augmentation, dans la lignée HaCaT KO, en condition non-inflammatoire (ctrl) et inflammatoire (inf), des transcrits de PIK3R3 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=4,48$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=1,83$ ] ainsi que NOTCH 1 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=1,81$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=5,71$ ] , NOTCH 2 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=3,16$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=2,60$ ] et NOTCH 3 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=2,12$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{inf})=5,90$ ] comparé aux WT contrôle (**Fig.4A**). Il existe également une augmentation de l'expression de FOXP3, chez les HaCaT WT et KO en condition inflammatoire respectivement [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{WT})=2,77$  ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{KO})=2,33$ ], comparé à la lignée HaCaT WT contrôle (**Fig.4A**). Afin de confirmer ces premiers résultats, les expériences doivent être répétées.

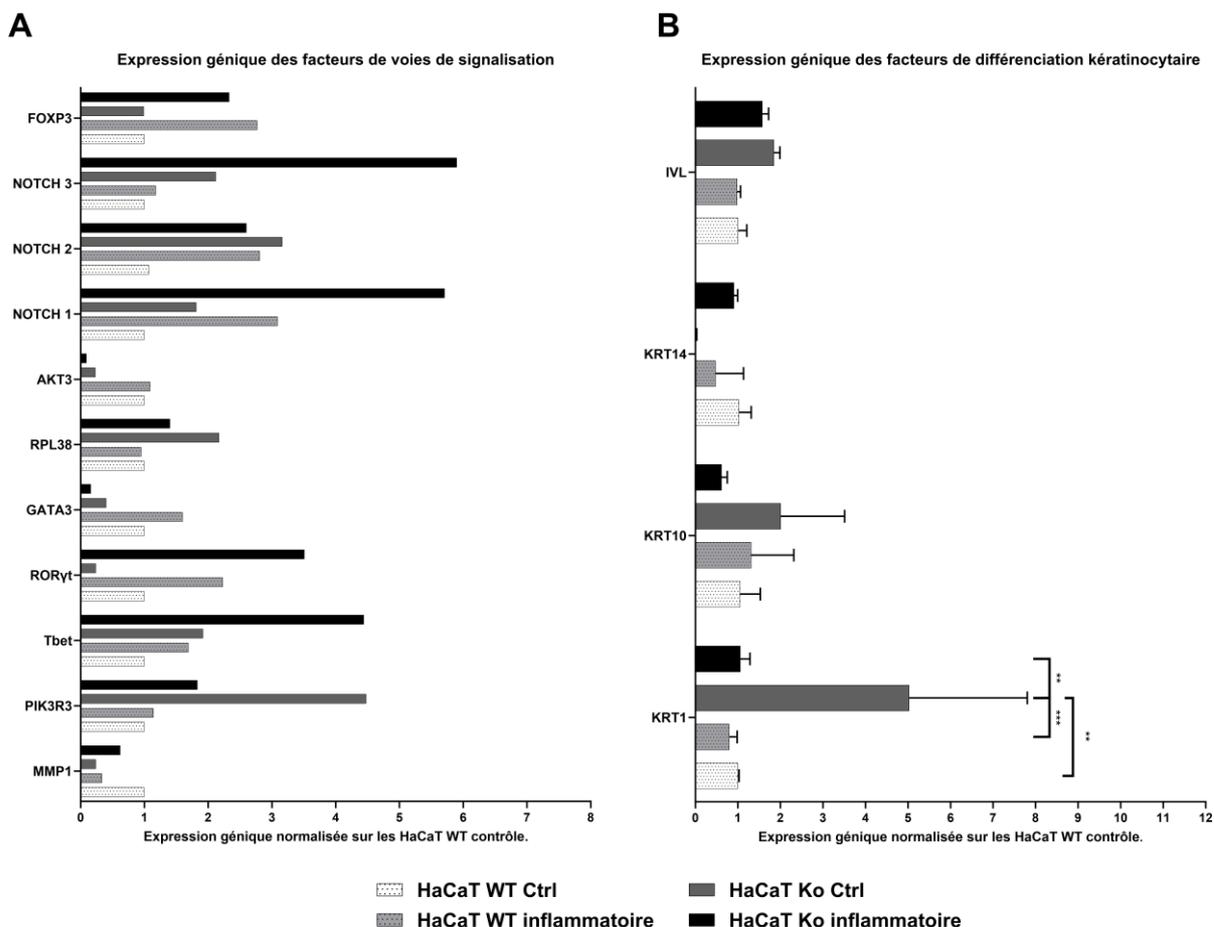
Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de la réponse inflammatoire sur l'expression des ARNm (ARN messenger) de différents marqueurs de différenciation, dans nos lignées HaCaT WT et KO. Nous avons étudié l'expression de l'ARNm de la KRT14, gène exprimé dans la couche basale, marqueurs d'indifférenciation de l'épiderme et ceux de la KRT1, KRT10, gènes exprimés dans les couches suprabasales, en particulier au niveau de la couche épineuse de l'épiderme, marqueurs de différenciation. Nous avons étudié également l'expression de l'IVL, marqueur plus tardif de la différenciation kératinocytaire.

Nous retrouvons, à l'état différencié, une augmentation significative d'expression de la KRT1 dans la lignée HaCaT KO contrôle [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{KO})=5,02$ -SD=1,96,  $p<0,01$ ], par rapport aux HaCaT WT contrôle (**Fig.4B**). Cependant, l'induction d'une inflammation a diminué significativement l'expression de l'ARNm de la KRT1 dans la lignée HaCaT KO [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=1,06$ -SD=0,16,  $p<0,01$ ] par rapport à la condition contrôle de cette même lignée (**Fig.4B**). De même, pour l'expression de la KRT10, qui a doublé dans la lignée HaCaT KO contrôle [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{ctrl})=2,01$ -SD=1,06] comparé aux HaCaT WT contrôle, mais dont l'ajout de facteurs inflammatoires, a diminué de plus

de la moitié l'expression de la KRT10 dans la lignée HaCaT KO [ $2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{inf})=0,61$ -SD=0,09] (**Fig.4B**). Tandis que nous observons une légère augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IVL, pour les HaCaT KO contrôle [ $2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{ctrl})=1,85$ -SD=0,10] et les HaCaT KO inflammatoires [ $2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{inf})=1,58$ -SD=0,15], comparé aux HaCaT WT contrôle (**Fig.4B**). L'expression des marqueurs de différenciations kératinocytaires (KRT1, KRT10 et IVL) ne semble pas ou peu modifiée, après ajout de facteurs de l'inflammation dans la lignée HaCaT WT (**Fig.4B**).

Lorsque nous observons l'expression de la KRT14, marqueur d'indifférenciation, on décrit une diminution d'expression chez les HaCaT WT inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{inf})=0,47$ -SD=0,37] comparé aux WT contrôle. Chez les HaCaT KO, l'expression de la KRT14 est presque nulle pour la condition contrôle [ $2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{ctrl})=0,02$ -SD=0,01] tandis qu'elle est similaire aux HaCaT WT contrôle pour la condition inflammatoire [ $2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{inf})=0,90$ -SD=0,06] (**Fig.4B**).

Il semblerait que la lignée HaCaT KO présente un trouble de différenciation kératinocytaire, en conditions inflammatoires, avec plutôt une diminution de ces marqueurs de différenciation et une augmentation de l'expression du marqueur d'indifférenciation KRT14 par rapport aux HaCaT KO contrôle. Tandis que dans la lignée HaCaT WT, l'induction de l'inflammation ne semble pas ou peu modifier l'expression de marqueurs de différenciation et on note une diminution de l'expression de la KRT14, marqueur d'indifférenciation. Il semblerait que l'inflammation est inversée les troubles de différenciation observés dans la lignée KO avec un phénotype se rapprochant de celui des KCs basaux qui pourrait s'apparenter à une activation kératinocytaire comme ce qui peut être observée lors de l'induction d'une EMT partielle. Ces données sont très intéressantes mais doivent être validées par la répétition de l'expérience.



**Figure 4 : Impact de l'inflammation sur les voies de signalisation et les marqueurs de la différenciation kératinocytaire à partir du modèle *in vitro* HaCaT WT et KO.**

**A.** Evaluation du taux de transcrite des gènes de voie de signalisation, par RT-qPCR, chez nos lignées WT et KO, en condition non inflammatoire (contrôle) et en condition inflammatoire (LPS/TLR4 + IL-6 + TNF- $\alpha$ ), quantification relative aux HaCaT WT contrôle. **B.** Evaluation du taux de transcrite des gènes de marqueurs de différenciation kératinocytaire, par RT-qPCR, chez nos lignées WT et KO, en condition non inflammatoire (contrôle) et en condition inflammatoire (LPS/TLR4 + IL-6 + TNF- $\alpha$ ), quantification relative aux HaCaT WT contrôle.

Test ANOVA à 2 facteurs (two-way),  $n=1$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ .

#### **A5) Evaluation des capacités de cicatrisation de nos lignées HaCaT.**

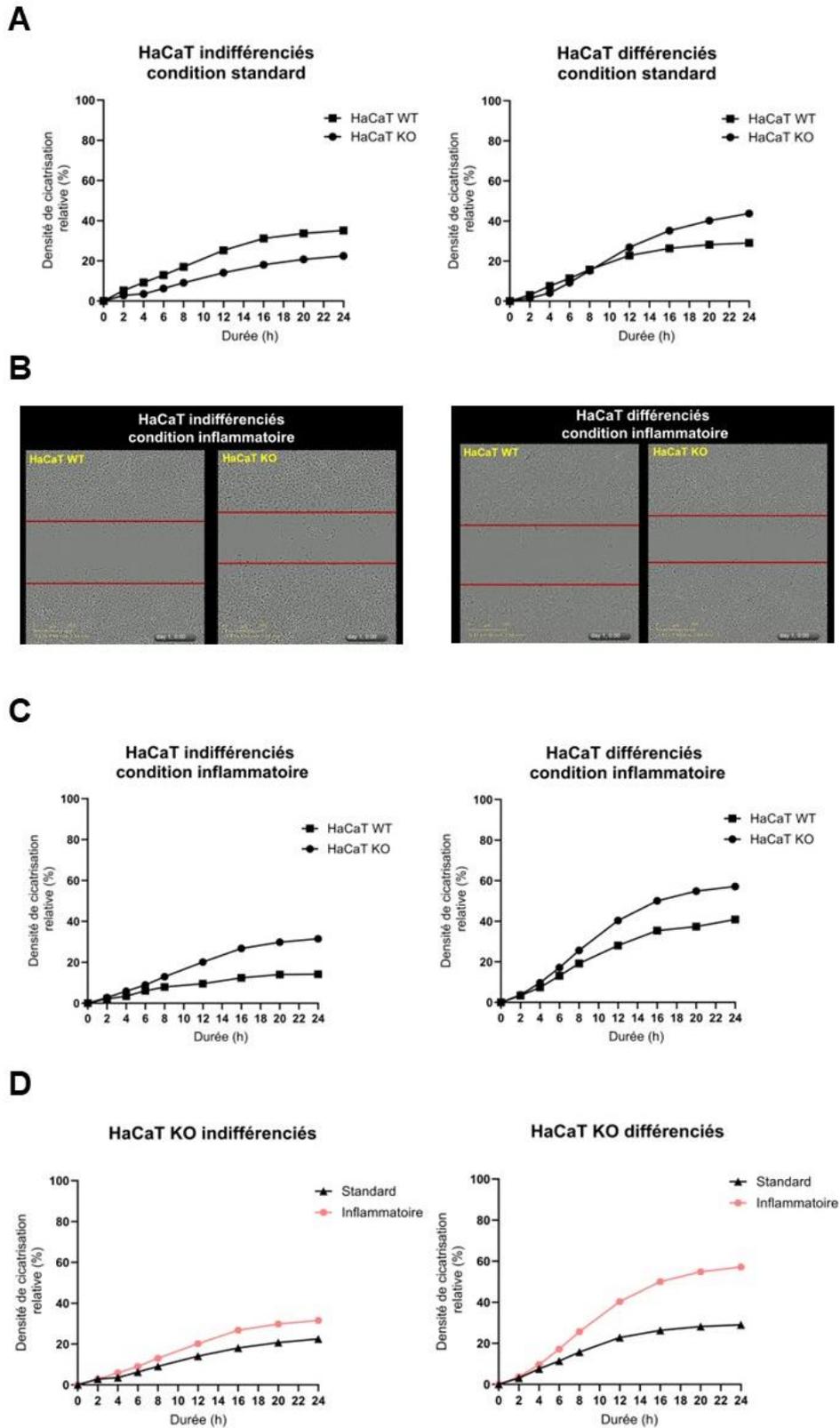
Dans l'HS, la plupart des auteurs sont d'accord sur le fait que l'origine lésionnelle de l'HS proviendrait de l'unité pilo-sébacée. Il est retrouvé initialement, en histologie, une obstruction de l'infundibulum pileaire ainsi qu'une inflammation péripilaire, avant la formation des kystes/nodules et des sinus dermiques<sup>39,92,117,167</sup>. D'après ces données, nous avons voulu évaluer les capacités de cicatrisation à l'aide de tests de blessure, dans nos 2 lignées HaCaT WT et KO, au stade indifférencié ( $Ca^{2+}$  à 0,03 mM) et différencié ( $Ca^{2+}$  à 2,8 mM), en condition de culture standard (contrôle) et en condition inflammatoire (après 48 h d'ajout de LPS+TNF- $\alpha$ +IL-6), afin d'identifier si dans le modèle *in vitro* d'HS, nous observons une augmentation des capacités de

fermeture par rapport au modèle sain et si, en modifiant le statut de différenciation kératinocytaire ou si en induisant une inflammation, cela modifie les capacités de cicatrisation de nos modèles cellulaires.

Dans un premier temps, en condition standard de culture, à l'état indifférencié, nous observons que les HaCaT WT présentent une capacité de fermeture de blessure plus importante et rapide, dès la 4<sup>ème</sup> heure, par rapport aux HaCaT KO. La différence de pourcentage de fermeture, à 24 h, est de 13% en faveur des HaCaT WT (**Fig.5A**). Lorsque l'on passe à l'état différencié, nous observons à partir de la 10<sup>ème</sup> heure, une inversion des capacités de migration en faveur des HaCaT KO, avec un gain de fermeture de 14,7% à 24 h par rapport aux HaCaT WT (**Fig.5A**). En conditions non-inflammatoires, il semblerait que l'induction *in vitro* de la différenciation kératinocytaire favorise les capacités de migration de 21% chez les lignées HaCaT KO par rapport à l'état indifférencié tandis que l'état de différenciation diminue les capacités de migration de 6% dans la lignée WT (**Fig.5A**).

Dans un second temps, nous avons évalué les capacités de fermeture de blessure, en conditions inflammatoires (LPS+IL-6+TNF- $\alpha$ ), la lignée HacaT KO présente une meilleure capacité de fermeture de blessure d'environ 17% à 24 heures, que ce soit pour la condition indifférenciée ou différenciée, par rapport à la lignée HaCaT WT du même statut de différenciation (**Fig.5BC**). Nous avons voulu également évaluer l'impact de l'induction *in vitro* de l'inflammation sur la lignée HaCaT KO. En condition indifférenciée, le contexte inflammatoire améliore de 9% la capacité de fermeture de la lignée HaCaT KO (**Fig.5D**). Tandis que pour la condition différenciée, l'inflammation a un réel impact sur l'amélioration des capacités de fermeture, avec un gain de 28 % par rapport à la condition non inflammatoire de notre lignée HaCaT KO (**Fig.5D**). De façon intéressante, nous observons que l'induction de la différenciation, dans la lignée HacaT WT, en condition standard, diminue les capacités de fermeture. Alors que l'induction de la différenciation en condition inflammatoire améliore nettement les capacités de fermeture de 26,8% chez les HaCaT WT, l'inflammation a donc un réel impact sur les capacités de fermeture des HaCaT WT. Pour la lignée HaCaT KO, l'inflammation a permis d'observer une amélioration des capacités de fermeture des HaCaT KO indifférenciés et différenciés, de 9% et de 13,5% respectivement à la condition standard. Notre hypothèse est que l'inflammation induite *in vitro* semble mimer la phase aiguë et précoce de l'HS, au cours de laquelle ils se forment des lésions rétentionnelles par obstruction kératinocytaire de l'infundibulum de l'unité pilosébacée. En caractérisant notre modèle *in vitro* HacaT KO, nous

observons effectivement des troubles concernant la différenciation kératinocytaire qui est décrite dans le cadre de l'HS. Il est également observé des modifications de réponse au test de blessure, qui reste à valider, mais qui pourrait s'apparenter à des troubles de la prolifération kératinocytaire pouvant rentrer dans le cadre de l'obstruction folliculaire observée au cours de la maladie.



**Figure 5 : Caractérisation des capacités de migration des lignées HaCaT.**

Nous avons évalué à 24 h des tests de blessures, nos lignées HaCaT WT et KO, au stade indifférencié ( $Ca^{2+}$  à 0,03 mM) et différencié ( $Ca^{2+}$  à 2,8 mM), en condition non inflammatoire et inflammatoire (après ajout de LPS+TNF- $\alpha$ +IL-6), n=2. **A.** Quantification du pourcentage de fermeture des blessures en condition non inflammatoire dans nos lignées HaCaT. **B.** Photographies de l'évolution du test de blessure à 24 h et quantification du pourcentage de fermeture des blessures, en condition inflammatoire, chez les HaCaT. **C.** Quantification du pourcentage de fermeture des blessures en condition inflammatoire, chez les HaCaT. **D.** Quantification du pourcentage de fermeture des blessures, chez les HaCaT KO, indifférenciés et différenciés, en condition standard versus en condition inflammatoire.

## A6) Analyse de l'expression des transcrits de PAMs à partir du modèle *in vitro* d'HS

Il a été montré qu'il existait une dysbiose cutanée dans l'HS et que cette dernière participait à la physiopathologie de la maladie. En effet, il a été observé que le microbiote cutané différait selon la gravité de l'HS<sup>168,223,224</sup>. Il apparaît que les PAMs puissent jouer un rôle dans l'installation de cette dysbiose cutanée dans l'HS<sup>218,220</sup>. Par leurs fonctions antimicrobiennes, immunomodulatrices et de cicatrisation, les PAMs semblent être des acteurs intéressants dans l'HS. C'est pourquoi, nous avons évalué l'expression génique des PAMs, par RT-qPCR, à partir de notre modèle *in vitro* de lignée kératinocytaire HaCaT, après mise en culture standard (contrôle) et après 48 heures d'ajout de réactifs inflammatoires associant TNF- $\alpha$ , IL-6 et LPS (activant le TLR4)<sup>216</sup>. Ces résultats ont été normalisés sur la moyenne des contrôles endogènes (*GAPDH*, *B-Actine*, *HPRT* et *18S*). Les résultats sont exprimés en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  par rapport à la valeur obtenue pour les HaCaT WT contrôle.

En condition non inflammatoire, dans la lignée HaCaT KO, nous observons une augmentation de l'expression génique de hBD-2 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=3,55$ -SD=0,45], de S100A8 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=3,96$ ], de LL-37 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=4,07$ ], de S100A7 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,86$ -SD=0,35], de S100A9 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,44$ -SD=0,22] et de la chémérine [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,68$ -SD=0,44] comparativement à la lignée HaCaT WT (**Fig.6**). Tandis qu'on montre une diminution d'expression génique de DCD [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=1,06$ -SD=0,20], hBD-1 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,21$ ], h-BD3 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,77$ -SD=0,18] et Élafine [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=0,26$ ] dans les lignées HaCaT KO par rapport à la lignée WT. En condition non inflammatoire, l'altération de la NCSTN induit une perturbation de l'expression génique des PAMs dans la lignée HaCaT KO.

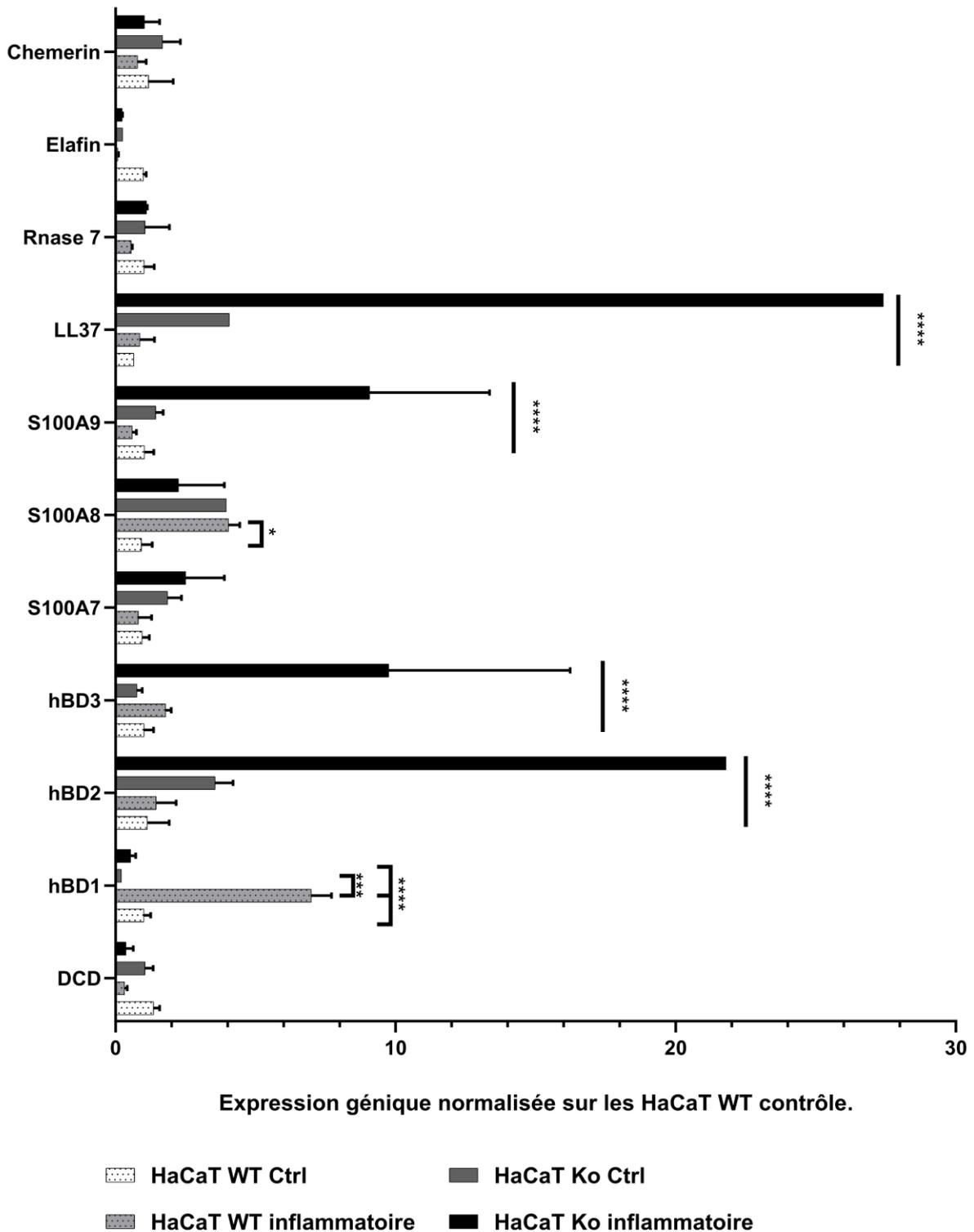
Lorsqu'on se place en condition inflammatoire, nous décrivons une élévation significative de l'expression des transcrits de hBD-2 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=21,80$  ;  $P < 0,0001$ ], hBD-3 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=9,75$ -SD=4,58 ;  $P < 0,0001$ ], S100A9 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=9,07$ -SD=3,02;  $P < 0,0001$ ] et LL-37 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=27,41$ ;  $P < 0,0001$ ] chez les HaCaT KO comparativement aux HaCaT WT (**Fig.6**). Nous observons une diminution d'expression pour la DCD [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,33$ -SD=0,08;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=0,37$ -SD=0,18], l'élafine [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,08$ -SD=0,02;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=0,24$ -SD=0,01] et la chémérine [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,79$ -SD=0,21;  $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=1,04$ -SD=0,38], pour la lignée HaCaT WT et/ou KO respectivement, en condition inflammatoire, sans différence marquée entre les 2 lignées (**Fig.6**). Concernant l'expression génique de S100A7 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,81$ -SD=0,33] et S100A9 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(WT)=0,60$ -SD=0,09], elle diminue lors de l'induction d'une inflammation dans la lignée WT tandis qu'elle augmente pour la lignée KO, S100A7 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}(KO)=2,51$ -

SD=0,97] et S100A9 [ $2^{-\Delta\Delta Ct}=9,07$ -SD=3,02;  $P < 0,0001$ ]. L'expression de hBD-1 augmente significativement pour les HaCat WT [ $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (WT)=6,99-SD=0,51 ;  $p < 0,0001$ ] alors qu'elle diminue significativement pour les HaCaT KO [ $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (KO)=0,55-SD=0,12,  $p < 0,0001$ ], en condition inflammatoire, comparativement aux HaCaT WT contrôle. L'expression génique de la Rnase 7 diminue lors de l'induction d'une inflammation dans la lignée WT [ $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (WT)=0,56-SD=0,02] et reste stable pour la lignée KO [ $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (KO)=1,11-SD=0,02] (**Fig.6**).

Ainsi, nous observons une augmentation des transcrits de hBD-2, S100A8, S100A9, LL-37 et chémérine et une diminution de hBD-1, dans notre modèle *in vitro* d'HS, que ce soit en condition de culture standard ou après induction d'une inflammation, par rapport aux HaCaT WT. Ces résultats montrent qu'il existe une dysrégulation de la sécrétion des PAMs dans notre lignée HaCaT KO et que l'induction d'une inflammation peut dans certains cas renforcer ces altérations.

En conclusion, nous avons observé que notre modèle *in vitro* d'HS présentait bien une altération de production de la NCSTN mature, protéine fonctionnelle, cette altération tente de reproduire les mutations décrites chez certains patients atteints d'HS. De plus, nous avons décrit dans le modèle HaCaT KO, des différences morphologiques ainsi que des troubles de leur capacité de différenciation comparativement au modèle HaCaT sauvage. Il apparaît également que le modèle *in vitro* d'HS produit des cytokines pro-inflammatoires à l'état basal comparativement au modèle sauvage. De plus, l'induction d'un état inflammatoire, dans le modèle HaCaT KO semble entraîner une dédifférenciation kératinocytaire notamment observé sur l'analyse des expressions des transcrits. Il apparaît également, qu'en condition inflammatoire, les capacités de cicatrisation du modèle KO semblent augmenter par rapport au modèle sauvage, pouvant être expliqué par un état prolifératif accru chez les kératinocytes HaCaT KO dédifférenciés (basaux).

## Expression génique des PAMs



**Figure 6 : Analyse de l'expression des gènes de PAMs des lignées HaCaT.**

Quantification des transcrits des PAMs en condition non inflammatoire et inflammatoire (LPS + IL-6 + TNF- $\alpha$ ), par RT-qPCR, des lignées HaCaT WT et KO, résultats normalisés sur les HaCaT WT contrôle ; Test ANOVA à 2 facteurs (two-way), n=2, \* =  $P < 0,1$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ , \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

## **B. Mise en place de l'étude clinique ImoHS**

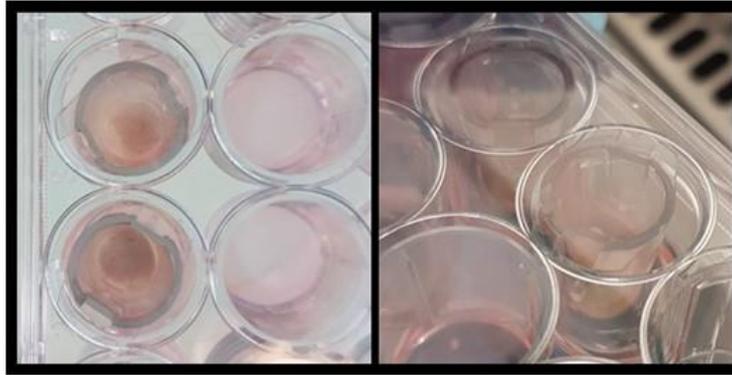
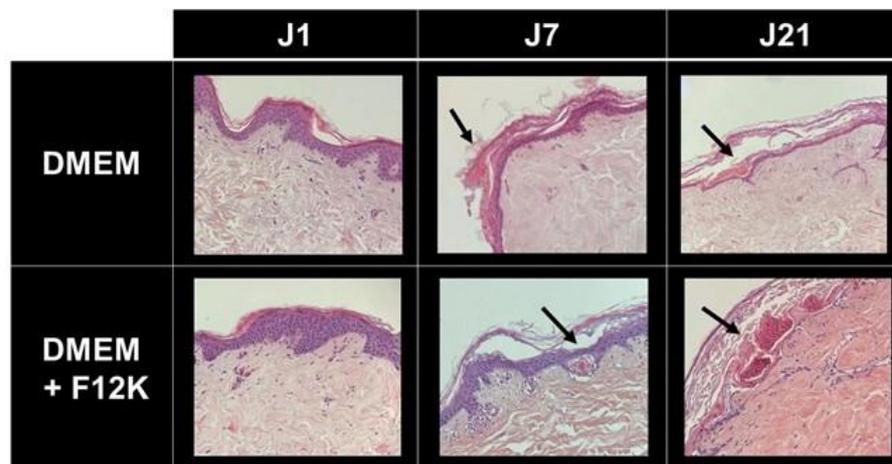
### **B1) Rédaction des documents réglementaires et évaluation du projet par le CPP**

Nous avons finalisé le protocole de recherche clinique de l'étude ImoHS en accord avec la Délégation à la Recherche Clinique et de l'Innovation du GHICL (**Annexe 3**). Nous avons obtenu l'avis favorable du CPP Ouest II le 12 novembre 2021 (CPP n°2021/70) (**Annexe 4**). Les formulaires de rapport de cas électronique (et sous format papier) anonymisés pour le groupe patients ainsi que pour le groupe témoins (**Annexe 5**), la notice d'information pour les patients et les témoins (**Annexe 6**) et un formulaire de recueil de non-opposition (**Annexe 7**) ont été créés et validés. Nous avons réalisé les réunions de mise en place avec les différents interlocuteurs et investigateurs des différents centres. Le début des inclusions pour l'étude clinique ImoHS a été suspendu du fait d'un changement de structure hospitalière de l'investigateur principal et de l'absence de personnel dédié pour la poursuite du projet.

### **B2) Mise en place d'une culture d'explants cutanés pour l'évaluation du modèle ex vivo d'HS**

Nous avons voulu, dans un premier temps, nous assurer de la bonne conservation des tissus cutanés lors de la mise en culture. Grâce à la collaboration avec le chirurgien le Docteur A.Dabrowski, Hôpital Saint Philibert de Lomme, nous avons recueilli des explants cutanés de 1 cm<sup>3</sup> issus d'abdominoplastie de patients (tissu sain). Les explants cutanés ont été disposés sur des inserts de culture afin que le derme exclusivement soit en contact avec le milieu de culture (**Fig.7A**). A partir des données de la littérature<sup>297-299</sup>, nous avons voulu étudier deux milieux de culture différents par milieu DMEM ou DMEM+F12-K. Nous avons ainsi réalisé une étude de viabilité tissulaire, à différents temps de culture, par technique d'histochimie avec coloration standard HES. Grâce à la collaboration avec l'anatomopathologiste, le Docteur J-F. Quinchon, nous avons évalué qualitativement l'intégrité et l'architecture des tissus et quantitativement le pourcentage de nécrose tissulaire. Nous avons observé une bonne préservation des explants cutanés jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de culture avec moins de 30% de nécrose cutanée dans l'épiderme et le derme (**Fig.7BC**). A noter qu'il existe une bonne conservation du derme, avec un pourcentage de nécrose n'ayant pas dépassé 30% jusqu'au 24<sup>ème</sup> jour de culture (**Fig.7C**). Il n'y a eu aucune différence significative concernant la conservation des explants cutanés entre les deux milieux de culture utilisés. Ainsi, ces résultats sont encourageants pour la mise en

place de l'étude clinique ImoHS. Le maintien de la survie tissulaire des explants cutanés, nous permettrons de réaliser des techniques de PDT afin d'analyser les effets sur la peau des patients HS versus des donneurs sains. Nous aurons également la possibilité de recueillir le milieu de culture, sur plusieurs jours après la réalisation de la PDT, afin d'analyser le sécrétome et d'identifier un rôle immunomodulateur de ce traitement.

**A****B****C**

		J1	J3	J7	J10	J14	J17	J21	J24
DMEM	<i>Epiderme</i>	0%	0%	30%	40%	50%	60%	70%	70%
	<i>Derme</i>	0%	0%	0%	0%	0%	30%	30%	30%
DMEM +F12K	<i>Epiderme</i>	0%	0%	30%	50%	50%	70%	80%	80%
	<i>Derme</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	30%	30%

**Figure 7 : Mise en place de la culture tissulaire et évaluation de la viabilité des explants cutanés.**

**A.** Dispositif par inserts perméables pour culture d'explants cutanés mis en contact avec deux milieux de culture différents (DMEM seul ou DMEM+F12K). **B.** Evaluation qualitative par le Dr Quinchon (anatomopathologiste) de la viabilité cutanée à partir des coupes histologiques colorées HES, les zones de nécroses cutanées sont marquées par une flèche (grossissement  $\times 100$ ). **C.** Evaluation quantitative du pourcentage de nécrose cutanée selon le milieu de culture et le temps de mise en culture.

### B3) Détermination et caractérisation des cellules lymphoïdes innées à partir de donneurs sains

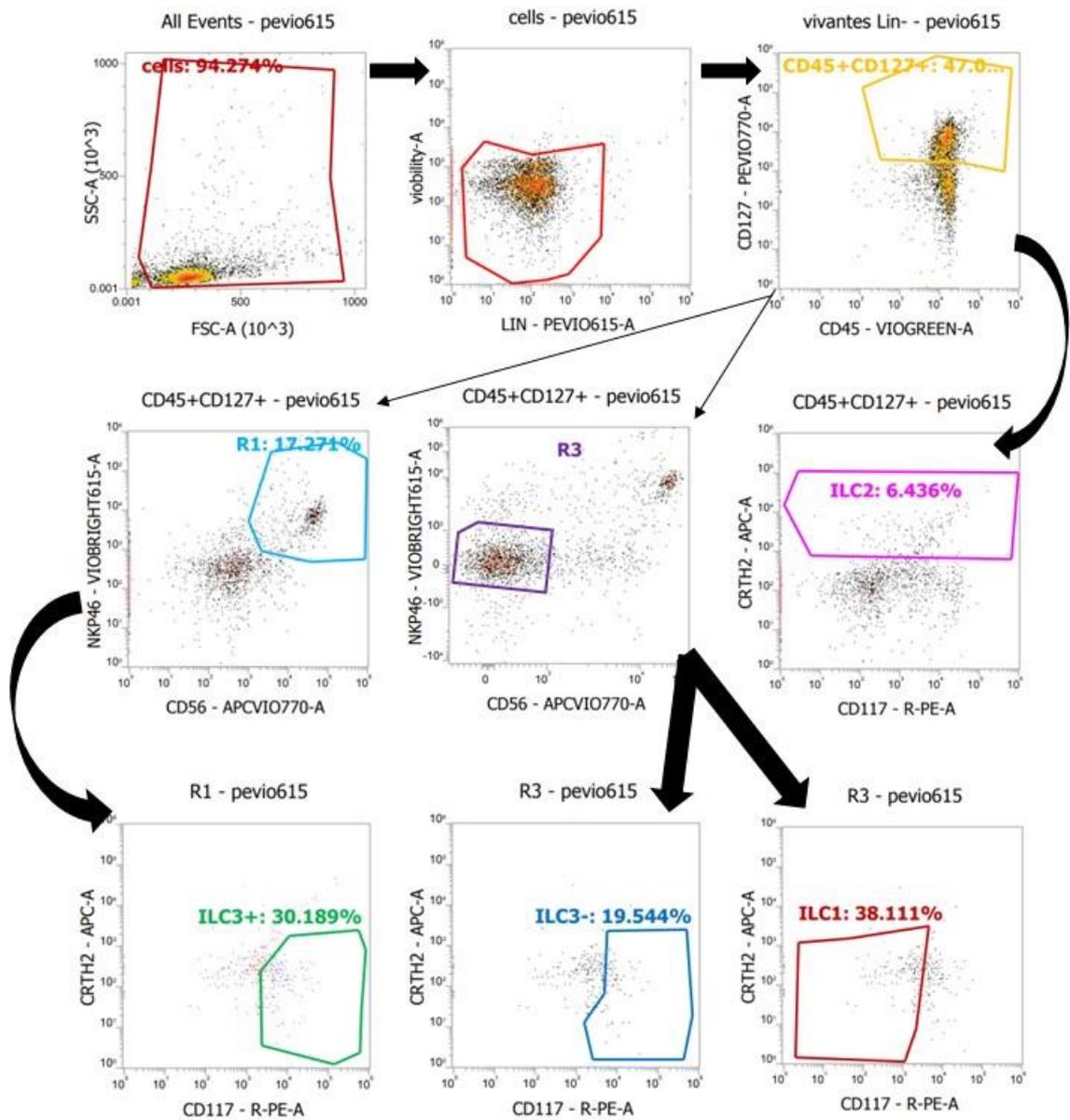
Les ILCs sont principalement des cellules résidentes tissulaires et sont rarement retrouvés dans le sang périphérique<sup>186</sup>. Cependant, il semblerait que lors de pathologies inflammatoires notamment cutanées, telles que le psoriasis, il existe un recrutement des ILCs dans le sang périphérique<sup>192,300</sup>. Nous avons donc réalisé un immunophénotypage par cytométrie en flux des ILCs, à partir de PBMCs de poche de sang issu de donneur sain de l'Établissement Français du sang. Cependant, les ILCs sont rares dans le compartiment périphérique en condition physiologique. Nous avons donc fait le choix d'utiliser des kits d'enrichissement pan-ILCs humain (EasySep®, Stemcell) conçu pour sélectionner et donc enrichir le prélèvement en ILC1, 2 et 3 par sélection immunomagnétique négative.

Nous avons travaillé notre stratégie de *gating* afin d'identifier les différents sous-groupes des ILCs pour lesquelles la mise en place d'un panel de lignées cellulaires pour sélection négative (*lineage cocktail*) est nécessaire. Tout d'abord, nous avons trié selon la taille et la granulosité, puis nous avons sélectionné les cellules qui étaient négatives pour notre « *lineage cocktail* » et qui étaient viables dans le but d'éliminer tous les autres types cellulaires (**Fig.8A**). Ensuite, nous avons ciblé les cellules qui étaient CD45<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>, et dans ce sous-groupe nous avons décomposé les cellules qui étaient :

- CRTH2<sup>+</sup>CD117<sup>+/-</sup> correspondant aux ILC2
- NKp46<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> identifiant la population intermédiaire R1
- NKp46-CD56- identifiant la population intermédiaire R3

A partir des populations intermédiaires, nous avons affiné grâce aux marqueurs CRTH2 et CD117. A partir de R1, la sélection CRTH2<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup> permet d'obtenir les ILC3<sup>+</sup> et à partir de R3, la sélection CRTH2<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup> identifie les ILC3<sup>-</sup> et le ciblage CRTH2<sup>-</sup>CD117<sup>-</sup> correspond aux ILC1 (**Fig.8A**). Ainsi, grâce à une double sélection et via notre stratégie d'analyse, nous avons pu identifier les 3 sous-groupes d'ILC à partir du sang périphérique d'un donneur sain. Nous avons ensuite analysé la fréquence des sous-groupes d'ILCs, les ILC1 représentent 1,08% (soit 117 cellules), les ILC2 1,46% (soit 158 cellules), les ILC3- 0,56% (soit 60 cellules) et les ILC3+ 1,18% (soit 128 cellules) sur les 10192 cellules analysées (**Fig.8B**).

**A**



**B**

	All events	Cells	Vivantes lin-	CD45+ CD127+	ILC1	ILC2	ILC3-	ILC3+
<b>Count</b>	10811	10192	5215	2455	117	158	60	128
<b>% Total</b>	100	94,27	48,24	27,71	1,08	1,46	0,56	1,18
<b>% Gated</b>	100	94,27	51,17	47,08	38,11	6,44	19,54	30,19

**Figure 8 : Analyse de la fréquence des sous-groupes d'ILCs par cytométrie en flux.**

**A.** Stratégie de gating des différents sous-groupes d'ILCs. **B.** Représentation en nombres de cellules et pourcentage de la fréquence des ILCs parmi les PBMCs issus d'une poche de sang de donneur sain.

Nous avons également fait une première sélection grâce aux kits d'enrichissement pan-ILCs. Nous avons réalisé cette analyse *via* une poche de sang d'un donneur sain, les ILCs sont rares au niveau du sang périphérique. Nous pensons que la fréquence des ILCs dans le sang périphérique de patients atteints d'HS sera plus importante, comme il a été montré dans le psoriasis, autre dermatose inflammatoire, où d'ailleurs la fréquence des ILC3 dans le sang périphérique semblait être corrélée à la sévérité de la maladie<sup>301</sup>.

Nous avons donc pu analyser la fréquence des sous-groupes d'ILCs en cytométrie de flux à partir du sang de donneur sain et mettre en place notre stratégie d'analyse. Nous avons validé notre protocole d'immunophénotypage afin de pouvoir prendre en charge les prélèvements sanguins de patients qui seront inclus dans l'étude clinique ImoHS.

## **C. Evaluation de la PDT dans le modèle *in vitro* d'HS et mise au point du dispositif de PDT pour le traitement d'explants cutanés *ex vivo***

### **C1) Evaluation de l'effet de la PDT au 5-ALA et au bleu de méthylène à partir de notre modèle *in vitro* d'HS**

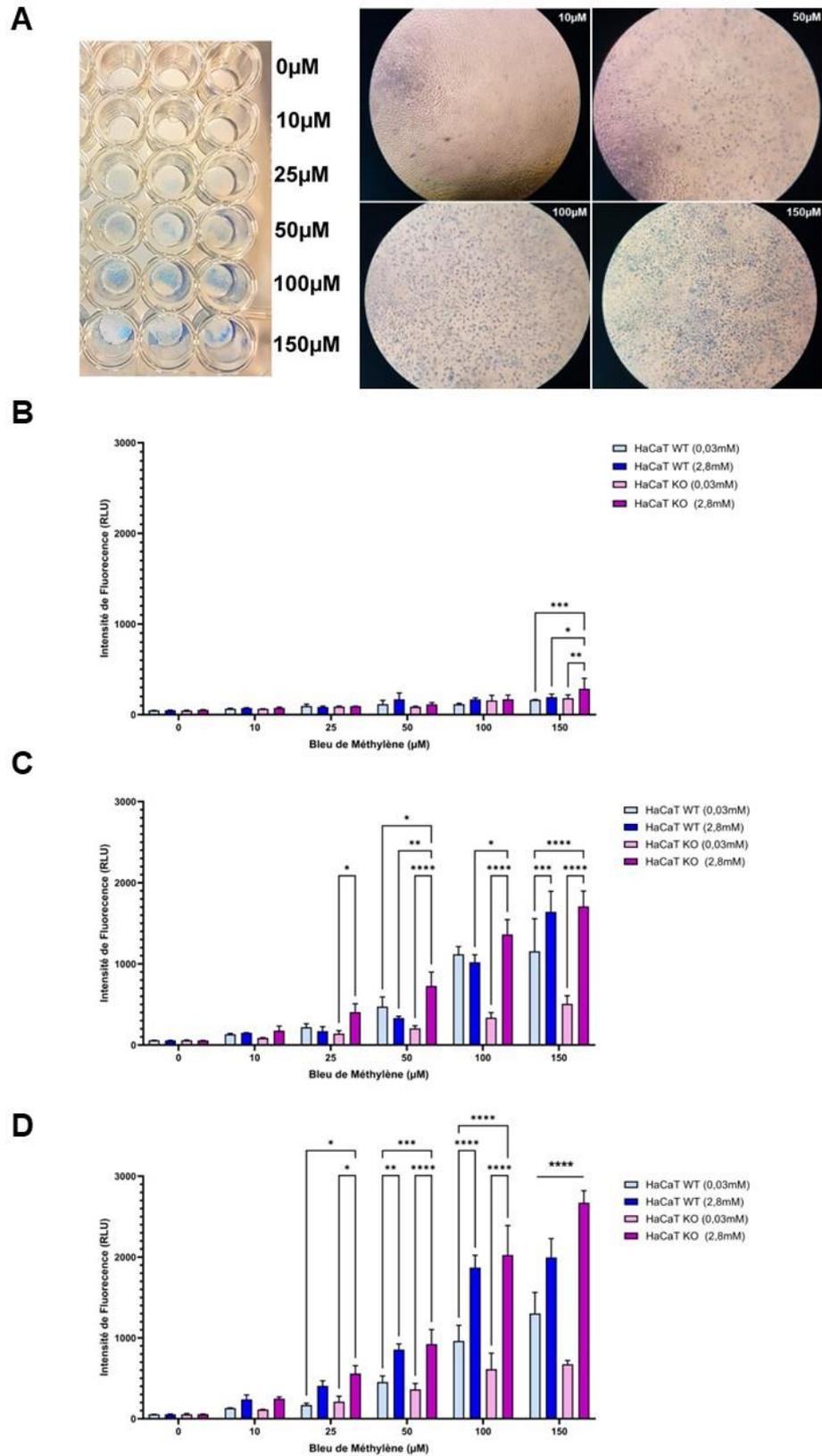
#### ***C1.1. Mise en place des paramètres de PDT : évaluation de l'incorporation intracellulaire du PS par test de fluorométrie***

Tout d'abord, nous avons voulu estimer le temps d'incubation et la concentration du PS afin d'optimiser nos paramètres de PDT grâce à des tests d'incorporation du PS sur nos lignées HaCaT. Nous nous sommes basés sur des données de la littérature afin de déterminer nos conditions initiales<sup>302-304</sup>. A notre connaissance, nous n'avons trouvé aucune donnée de paramètres de PDT réalisée sur la lignée HaCaT KO.

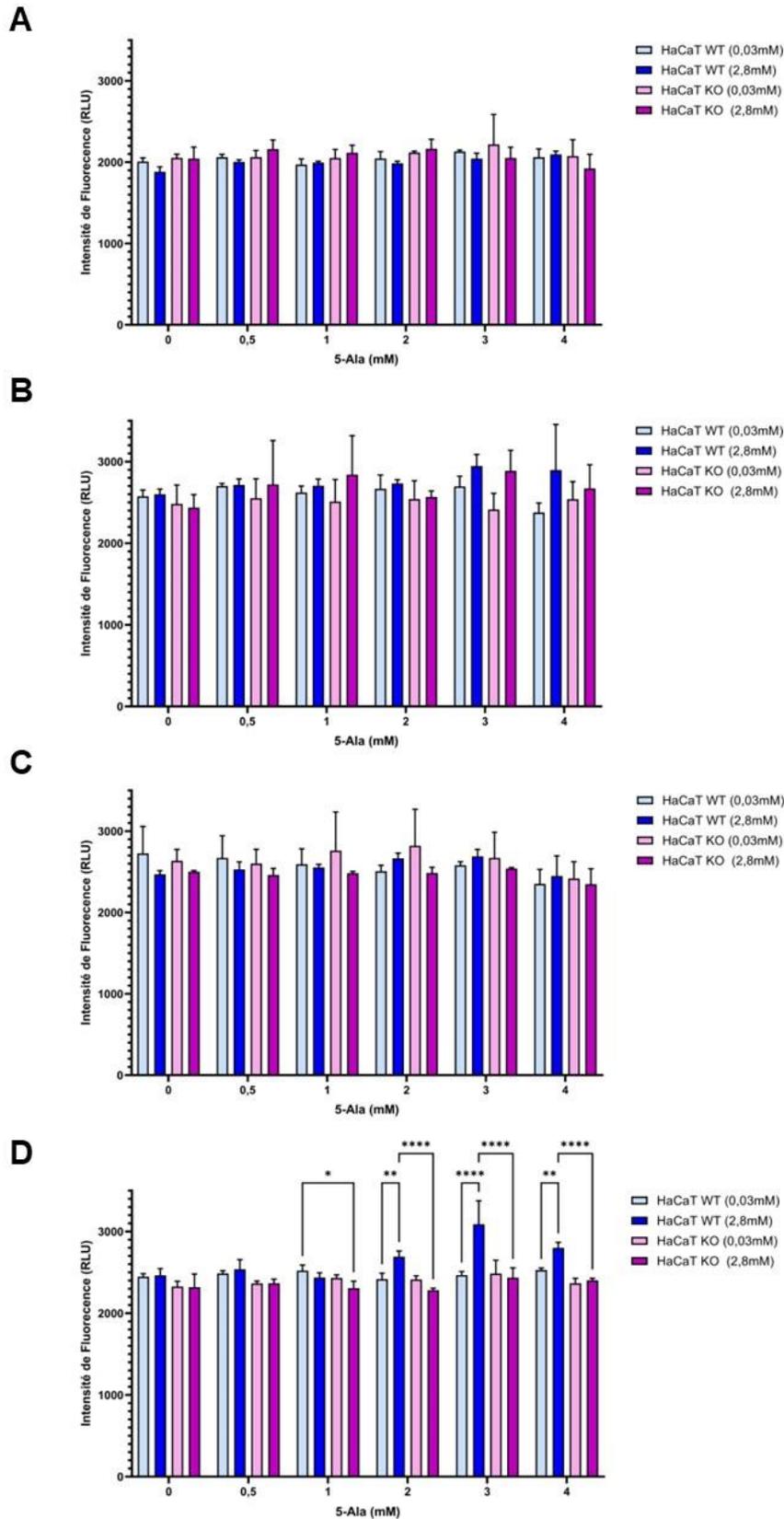
Pour le BdM, nous avons fait une gamme de concentration de 0 à 150  $\mu\text{M}$  avec des temps d'incubation compris entre 30 secondes et 24 heures. Comme il s'agit d'un colorant, l'incorporation peut être vérifiée qualitativement à l'œil nu au microscope optique (**Fig.9A**). A la suite de l'incubation du PS, les KCs sont illuminés en continu à une intensité lumineuse de 1  $\text{mW}/\text{cm}^2$  pendant 1 heure à la longueur d'excitation de 635 nm pour le 5-ALA (soit une dose reçue de 3,6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) et pendant 1h30 à la longueur d'onde d'excitation de 668 nm pour le BdM (soit une dose reçue de 5,4  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Le signal lumineux réémis est mesuré par test de fluorométrie permettant une évaluation

quantitative de la présence du PS en intracellulaire dans nos lignées HaCaT. Concernant le BdM, nous observons une bonne incorporation intracellulaire du PS dans les lignées HaCaT après 2 h d'incubation et pour des concentrations supérieures à 50  $\mu$ M (**Fig.9B-D**).

Pour le 5-ALA, nous avons fait varier la concentration de 0 mM à 4 mM avec des temps d'incubation de 0 min à 4 h. Le 5-ALA est une prodrogue, lors de son incorporation dans les KCs, elle est métabolisée en Pp-IX, molécule photosensibilisante. De la même façon que le BdM, nous illuminons après le temps d'incubation nécessaire les KCs, à la longueur d'onde d'excitation de la Pp-IX, le signal lumineux réémis est mesuré par test de fluorométrie afin d'évaluer quantitativement l'incorporation du PS dans nos lignées HaCaT. Après 6 h d'incubation et à partir d'une concentration de 2 mM de 5-ALA, nous observons une augmentation d'incorporation du PS chez les HaCaT WT différenciés par rapport aux HaCaT WT indifférenciés (**Fig.10A-D**).



**Figure 9 : Evaluation qualitative et quantitative de l'incorporation intracellulaire du bleu de méthylène dans les lignées HaCaT WT et KO.** **A.** Evaluation qualitative de l'incorporation du PS dans les HaCaT WT indifférenciés après 2 h d'incubation à différentes concentrations, photographie macroscopique et au grossissement X50. Evaluation quantitative par fluorométrie des lignées HaCaT WT et KO, au stade indifférencié (0,03 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) et au stade différencié (2,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) **B.** après 30 sec d'incubation **C.** après 2 heures d'incubation **D.** après 6 heures d'incubation. Test ANOVA à 2 facteurs (two-way),  $n=3$ , \* =  $P < 0,1$  ; \*\* =  $P < 0,01$  ; \*\*\* =  $P < 0,001$  ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .



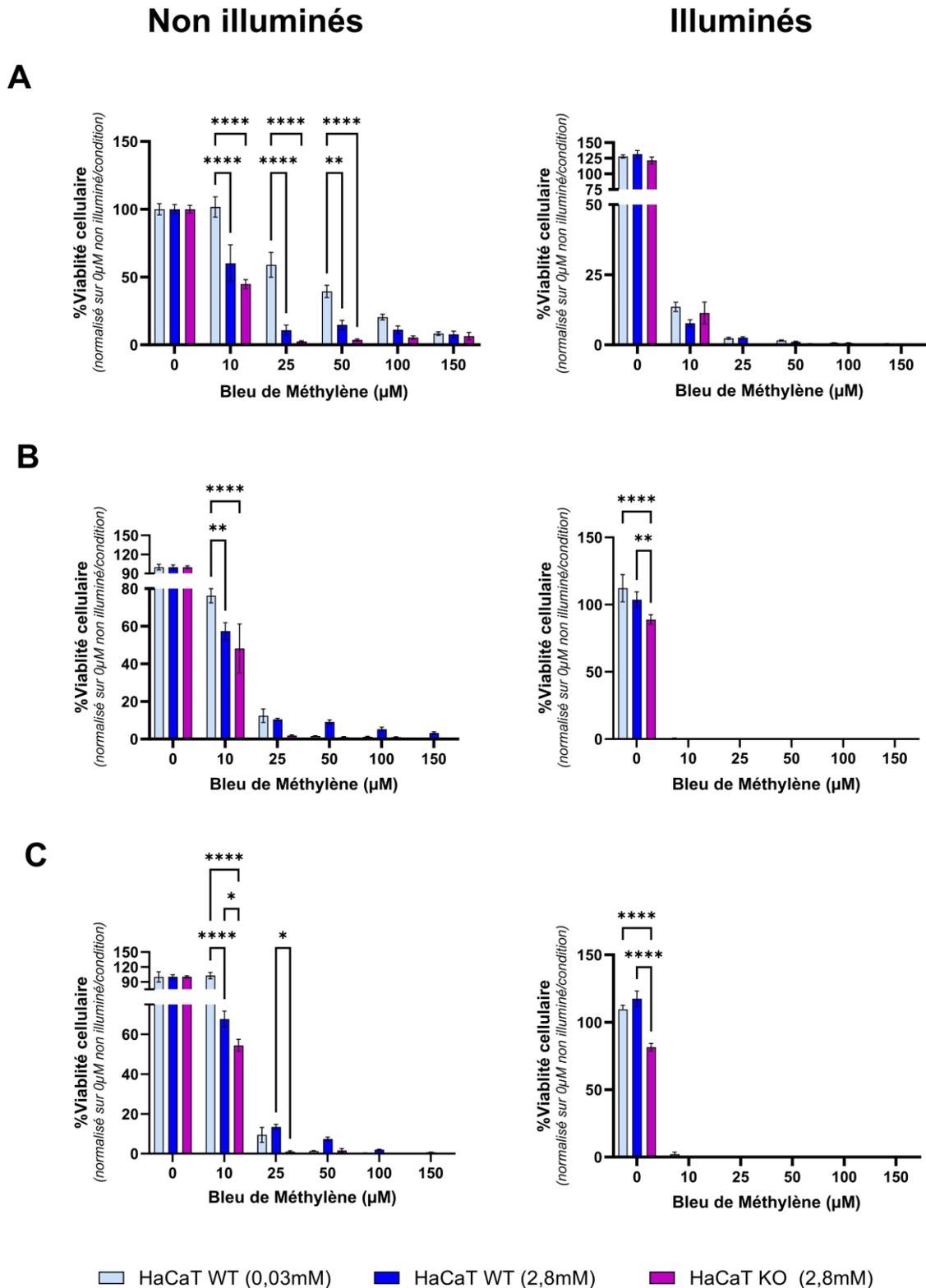
**Figure 10 : Evaluation quantitative de l'incorporation intracellulaire du 5-ALA dans les lignées HaCaT WT et KO.**

Evaluation quantitative du 5-ALA par fluorométrie dans les lignées HaCaT WT et KO, selon l'état indifférencié (0,03 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou différencié (2,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ). **A.** après 30 sec d'incubation **B.** après 2 h d'incubation **C.** après 4 h d'incubation **D.** après 6 h d'incubation. Test ANOVA à 2 facteurs (two-way),  $n=2$ , \* =  $P < 0,1$  ; \*\* =  $P < 0,01$  ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

### **C1.2. Evaluation de la PDT au bleu de méthylène in vitro sur les lignées HaCaT**

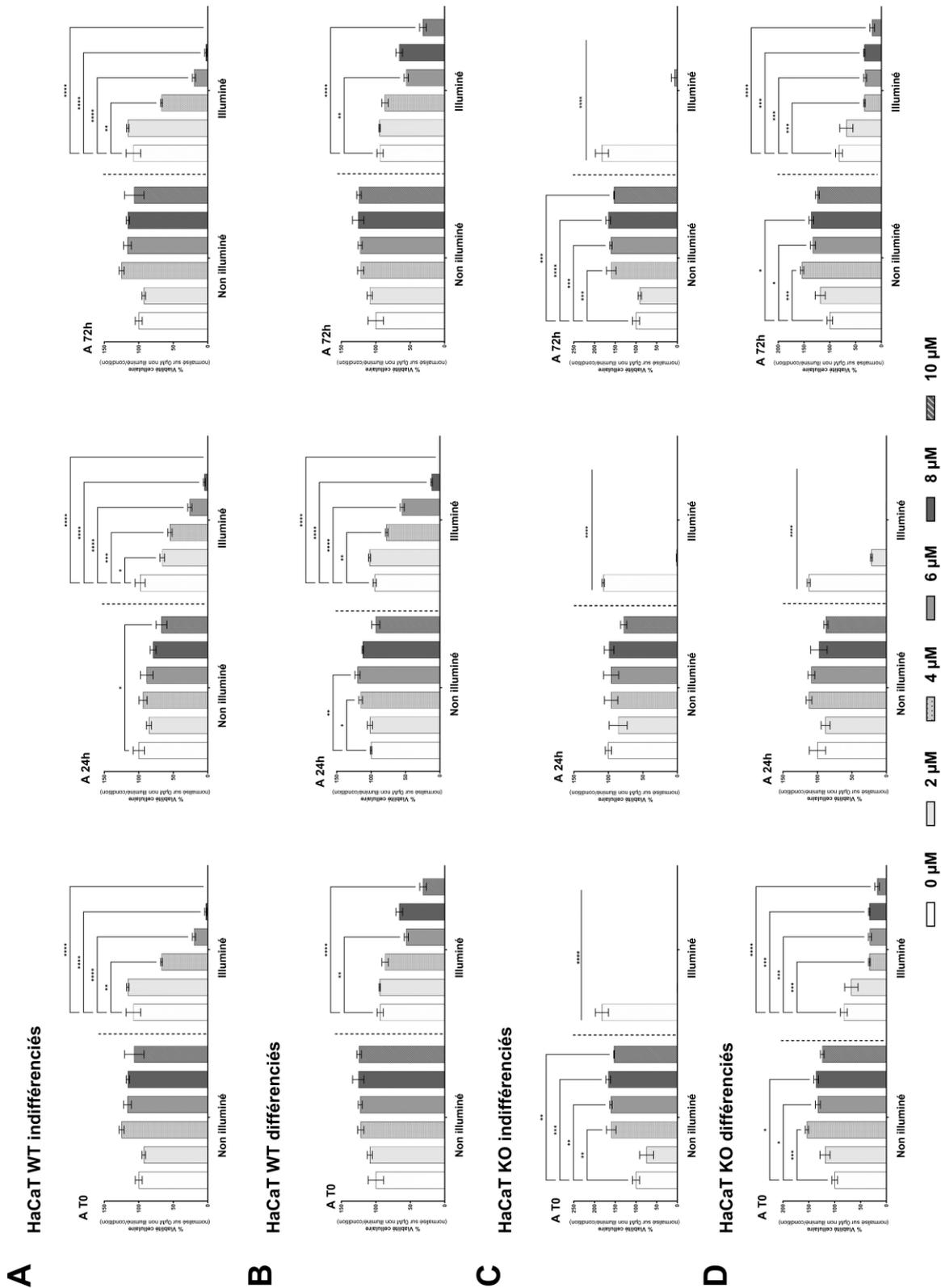
Nous nous sommes basés sur nos résultats d'incorporation du BdM, dans nos lignées HaCaT, afin de déterminer les paramètres optimaux d'incubation pour réalisation du traitement par PDT. Ainsi, nous avons incubé les lignées HaCaT WT et KO, indifférenciés et différenciés, pendant 2 h en présence du BdM, en reprenant la même gamme de concentration du PS que celle utilisée pour les tests de fluorométrie c'est-à-dire 0, 10, 25, 50, 100 et 150  $\mu\text{M}$ . Après lavage du PS, nous avons illuminé les KCs pendant 1h30 à 3 mW (5,4 Joules/cm<sup>2</sup>), à la longueur d'excitation du BdM, soit 668nm en continu. Un test de viabilité cellulaire, par mesure de l'ATP par technique de luminescence (Cell Titer Glo®) est réalisé à 10 minutes, à 24, 48 et 72 heures après illumination (**Fig.11A-C**). Nous avons également réalisé, pour chaque temps d'évaluation, un contrôle négatif correspondant à nos lignées HaCaT WT et KO, exposées au BdM sans subir d'illumination. Nos résultats de PDT au BdM sur les HaCaT KO indifférenciés ne sont pas représentés à la suite d'un problème sur la culture cellulaire. Nos données ont été normalisées sur la valeur obtenue pour les HaCaT non illuminées, non traitées de la lignée correspondante.

Nous avons constaté une perte significative de viabilité cellulaire de nos HaCaT, très rapidement après illumination comparé à la condition non illuminée, et ce même aux concentrations les plus faibles du BdM. A 10 min de l'illumination, la viabilité des HaCaT, traités à la plus faible concentration du PS à 10  $\mu\text{M}$ , est divisée au moins par 7 (-86,5% [SD=3,36] pour les HaCaT WT indifférenciés, -92,33% [SD=2,49] pour les HaCaT WT différenciés et -88,6% [SD=7,75] pour les HaCaT KO différenciés) par rapport aux HaCaT non illuminés non traités (**Fig.11A**). A 24 heures de l'illumination, la viabilité des HaCaT traités à des concentrations supérieures ou égale à 10  $\mu\text{M}$  de BdM est nulle (**Fig.11B**). Nous remarquons que la viabilité des HaCaT non illuminés décroît significativement, en présence du BdM dès 10 $\mu\text{M}$ , dès 10 min [-39,8% ; p<0,0001 pour les HaCaT WT différenciés et -55,2% ; p<0,0001 pour les HaCaT KO différenciés] comparativement aux HaCaT WT indifférenciés (**Fig.11A**). A partir de 25  $\mu\text{M}$  et dès 10 min, l'ensemble des 3 lignées perdent au moins 40% de viabilité cellulaire sans illumination [-40,8% [SD=18,2] pour les HaCaT WT indifférenciés ; -89,2% [SD=7,3], p<0,0001 pour les HaCaT WT différenciés et -97,5% [SD=1,08] ; p<0,0001 pour les HaCaT KO différenciés] (**Fig.11A**). Nous obtenons les mêmes résultats à 48 et 72 h. Le BdM, aux concentrations utilisées, semble avoir une toxicité sur nos lignées kératinocytaires car il existe une perte de viabilité cellulaire, même en condition non illuminée et cela survient dès la concentration en BdM la plus faible c'est-à-dire 10  $\mu\text{M}$ .



**Figure 11 : Test de viabilité cellulaire des lignées HaCaT indifférenciés et différenciés après PDT au bleu de méthylène.** Les HaCaT ont été incubés avec le BdM pendant 2 h à différentes concentrations, après lavage du PS, les cellules ont été illuminées pendant 1h30 à 668 nm. Chaque donnée est normalisée par rapport aux résultats des cellules non traitées et non illuminées pour chaque condition. Un test de viabilité cellulaire par luminescence a été réalisé à **A.** 10 min, **B.** 24 h, **C.** 48 h. Test ANOVA à 2 facteurs (two-way),  $n=1$ , \* =  $P < 0,1$  ; \*\* =  $P < 0,01$  ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

Nous avons donc réalisé à nouveau un traitement de PDT au BdM avec les mêmes paramètres mais en utilisant des concentrations de PS inférieures ou égales à 10  $\mu\text{M}$  (**Fig.12A-D**). Nous avons alors observé un effet dose-dépendant du BdM sur la viabilité des HaCaT WT, indifférencié et différencié, après PDT, dès la première évaluation de viabilité à 10 min mais également à tous les autres temps d'évaluation (**Fig.12A-B**). Nous remarquons que la lignée HaCaT KO, indifférenciée et différenciée, est nettement plus sensible à la PDT au BdM que la lignée HaCaT WT. Dans la lignée HaCaT KO indifférenciée, la viabilité cellulaire est nulle, dès l'utilisation de la plus petite concentration du BdM à 2  $\mu\text{M}$  et dès 10 min, le résultat est similaire à toutes les autres concentrations et temps d'évaluation (**Fig.12C**). Pour les KO différenciés, dès 10 min après la PDT, l'utilisation du BdM à 2  $\mu\text{M}$  a fait perdre 30% de viabilité cellulaire et à partir de 4  $\mu\text{M}$  la viabilité cellulaire diminue au moins de 70% (**Fig.12D**). Alors que les HaCaT KO non illuminés montrent une bonne viabilité, même à 72 h après incubation au BdM (**Fig.12C-D**). Nous montrons qu'il existe un effet majeur et rapide de la PDT au BdM, dans le modèle *in vitro* d'HS comparé au modèle kératinocytaire HaCaT WT. Nous montrons également que l'application de BdM, sans illumination, utilisé aux concentrations inférieures ou égales à 10  $\mu\text{M}$ , n'entraîne pas d'effet toxique sur la viabilité cellulaire.



**Figure 12 : Test de viabilité cellulaire des lignées HaCaT WT et KO, indifférenciés et différenciés, après PDT au bleu de méthylène à concentration  $\leq 10 \mu\text{M}$ .** Les HaCaT ont été incubés avec le Bdm pendant 2 h à différentes concentrations, après lavage du PS, les cellules ont été illuminées pendant 1h30 à 668 nm. Chaque donnée est normalisée par rapport aux résultats des cellules non traitées et non illuminées pour chaque condition. Un test de viabilité cellulaire par luminescence a été réalisé à 10 min, 24 h, 48 h (non représenté) et 72 h sur **A**. la lignée HaCaT WT indifférenciés **B**. la lignée HaCaT WT différencié **C**. les HaCaT KO indifférenciés **D**. les HaCaT KO différenciés. Test ANOVA à 2 facteurs (two-way),  $n=1$ , \* =  $P < 0,1$  ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

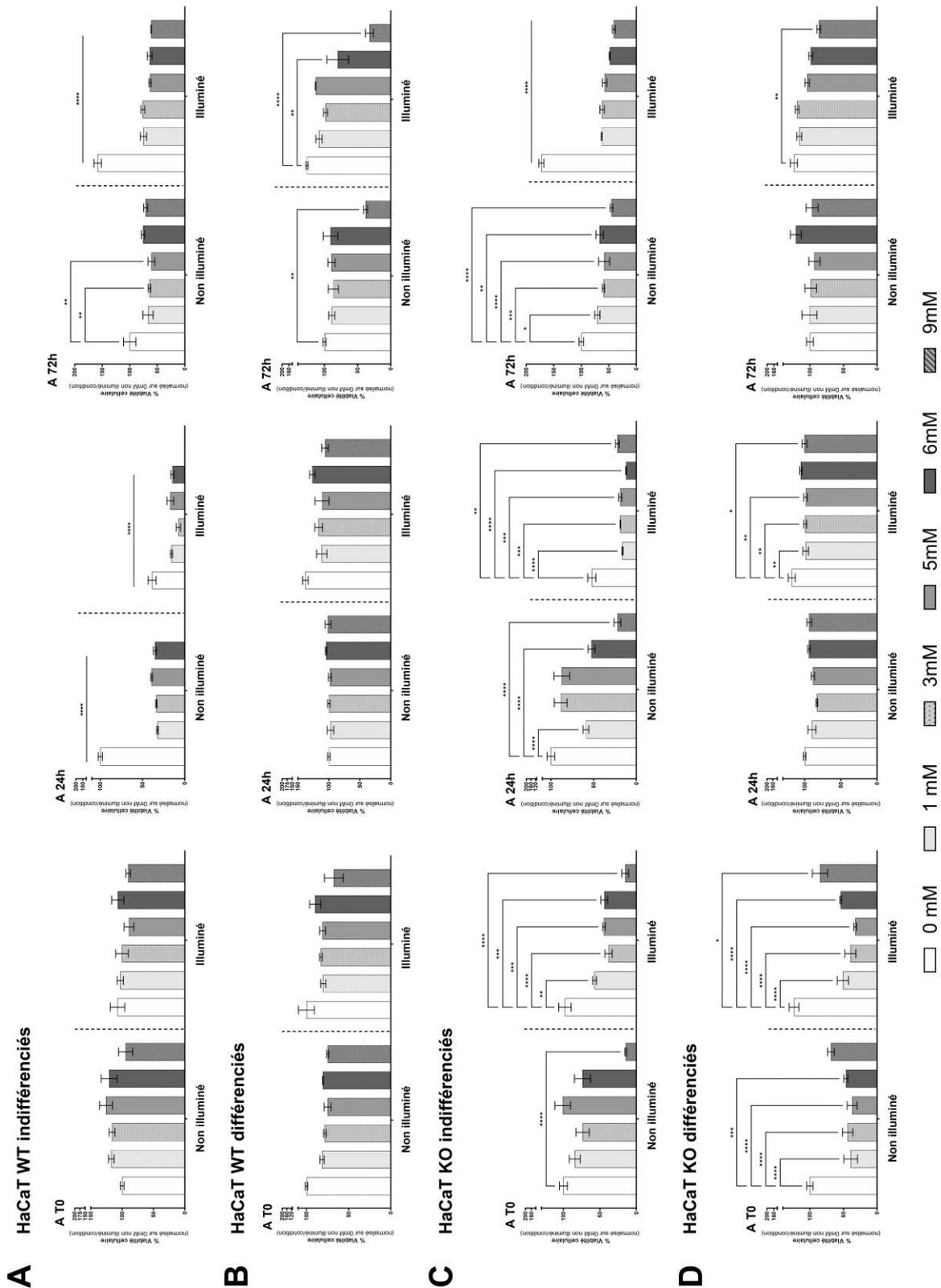
### **C1.3. Evaluation de la PDT au 5-ALA sur nos modèles *in vitro* HaCaT WT et KO**

Nous avons incubé nos lignées HaCaT WT et KO, indifférenciés et différenciés, avec le 5-ALA, pendant 2 h à différentes concentrations du PS (0,1,3,5,6,9 mM) (**Fig.13A-D**). En raison d'une contamination microbienne, nous n'avons pas pu réaliser cette technique sur les HaCaT WT différenciés. Après lavage du 5-ALA, les KCs sont illuminés pendant 1 h à 3 mW (3,6 Joules/cm<sup>2</sup>), à la longueur d'onde d'excitation du PS à 635 nm en continu. Un test de viabilité cellulaire par luminescence (*Cell Titer Glo*®) est réalisé à 10 min et à 24, 48 et 72 h de l'illumination. Nous avons réalisé un contrôle négatif en incubant nos KCs avec le 5-ALA mais sans réalisation d'illumination. Nous avons observé une diminution de la viabilité cellulaire chez les lignées HaCaT WT et KO en condition indifférenciée bien que nous ayons observé peu d'incorporation du 5-ALA en intracellulaire chez nos lignées. Dans la lignée HaCaT WT indifférenciée, on décrit une baisse de viabilité cellulaire de 80% à 24 h et de 40% à 72 h, que ce soit pour la condition non illuminée ou illuminée (**Fig.13A**). Pour les HaCaT KO indifférenciés, cette baisse de viabilité est de 80% à 24 h seulement pour la condition illuminée et de 45% à 72 h pour la condition non illuminée et illuminée. Ces données suggèrent un potentiel effet toxique du 5-ALA sur nos lignées kératinocytaires. Par ailleurs, nous observons que la PDT au 5-ALA n'a que très peu d'effet sur nos lignées HaCaT WT et KO en condition différenciée, indépendamment du temps et des concentrations du PS (**Fig.13B et D**). Nous n'avons pas observé d'effet dose au 5-ALA chez les HaCaT WT et KO, non illuminés et illuminés, quelle que soit la durée après l'illumination.

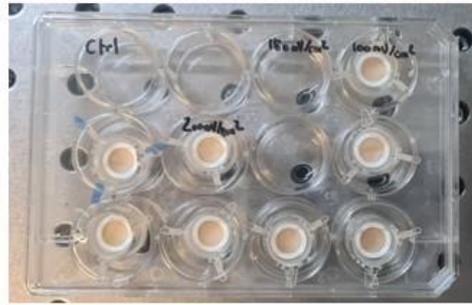
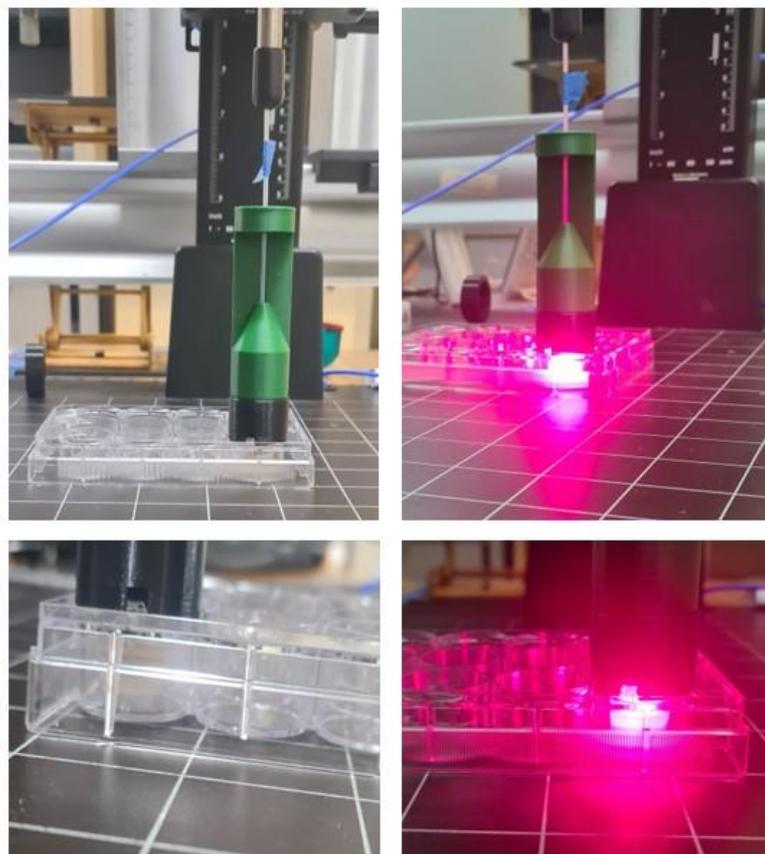
### **C2) Mise au point et évaluation du dispositif de PDT à partir d'explants cutanés de donneur sain**

Nous voulons également développer un protocole thérapeutique innovant de PDT dans le cadre de l'HS. Grâce à la technologie Genoskin®, nous avons obtenu des explants cutanés humains issus d'un même donneur, à la suite d'un geste d'abdominoplastie et dont le phototype renseigné est 2-3. Ces explants cutanés sont insérés dans du milieu de culture qui garantit une survie tissulaire de 7 jours (**Fig.14A**). Nous avons développé, avec l'aide de l'équipe physico-PDT de l'unité OncoThAI coordonnée par A-S. VIGNON, un dispositif laser permettant de focaliser le rayon lumineux sur l'épiderme dans le but d'éviter toute illumination des explants sur le versant dermique pour garantir les conditions de réalisation de la technique *in vivo*

**(Fig.14B).** Nous avons paramétré les réglages laser, à partir des données de la littérature<sup>305,306</sup>, afin d'illuminer les explants de peau à 668 nm (longueur d'onde d'excitation du BdM), avec des fluences de 100, 150, 200 et 250 mW/cm<sup>2</sup> pendant 5 min. Nous n'avons pas observé macroscopiquement de lésions de brûlures épidermiques en surface des explants cutanées à la puissance du laser utilisée. Nous avons ensuite fixé nos explants au paraformaldéhyde à T0, puis à 24, 48, 72 et 96 h de l'illumination. Nous avons réalisé un contrôle négatif correspondant aux explants non illuminés. Nous avons réalisé une coloration histochimique standard à l'HES. Grâce à la collaboration avec le Docteur Quinchon, nous avons pu avoir une analyse anatomopathologique du pourcentage de nécrose cutanée induite par l'illumination. Nos résultats montrent que l'illumination seule, indépendamment de l'intensité allant de 100 à 250 mW/cm<sup>2</sup>, n'a pas induit plus de nécrose cutanée que celle retrouvée dans les explants cutanés non illuminés **(Fig.14C)**. Les taux de nécrose cutanée ne dépassent pas 1%, sauf pour la condition d'illumination la plus faible à 100 mW/cm<sup>2</sup> à 96 h qui est d'un maximum de 3% de nécrose cutanée **(Fig.14C)**. Ces résultats nous permettent de valider le prototype d'illumination laser afin de pouvoir réaliser le traitement par PDT des explants cutanés *ex vivo* de patients HS.



**Figure 13 : Test de viabilité cellulaire des lignées HaCaT indifférenciés et différenciés après PDT au 5-ALA.** Les HaCaT ont été incubés avec le 5-ALA pendant 2 h à différentes concentrations, après lavage du PS, les cellules ont été illuminées pendant 1 h à 635 nm. Chaque donnée est normalisée par rapport aux résultats des cellules non traitées et non illuminées pour chaque condition. Un test de viabilité cellulaire par luminescence a été réalisé à 10 min, 24 h, 48 h (non représenté) et 72 h sur **A**. la lignée HaCaT WT indifférenciés **B**. la lignée HaCaT WT différencié **C**. les HaCaT KO indifférenciés **D**. les HaCaT KO différenciés. Test ANOVA à 2 facteurs (two-way),  $n=2$ , \* =  $P < 0,1$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

**A****B****C**

	Intensité d'illumination				
	0 mW	100 mW	150 mW	200 mW	250 mW
<b>A T0</b>	0%	0%	0%	0%	0%
<b>A 24h</b>	0%	0%	0%	<1%	0%
<b>A 48h</b>	0%	0%	0%	1%	1%
<b>A 72h</b>	<1%	0%	<1%	1%	
<b>A 96h</b>	1%	3%	1%	1%	1%

**Figure 14 : Mise au point du dispositif d'illumination laser pour réalisation de la PDT sur un modèle ex vivo d'HS.** **A.** Explants cutanés issus de la technologie Genoskin®, **B.** Mise au point et essai du dispositif laser, **C.** Détermination du pourcentage de nécrose cutanée par le Dr QUINCHON, anatomopathologiste, des explants cutanés selon l'intensité d'illumination reçue et à différents temps.



# **DISCUSSION**



## **A. Choix du modèle d'étude**

Nous avons fait le choix de réaliser nos analyses à partir d'un modèle *in vitro* de KCs humains immortalisés HaCaT, qui est largement utilisé dans le cadre d'études de biologie cutanée, notamment concernant l'étude de la réponse inflammatoire cutanée. C'est également un modèle *in vitro* d'étude de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire, fréquemment utilisé dans la recherche en particulier sur l'acné ou le psoriasis<sup>262,307</sup>. Malgré les nombreuses controverses relatives aux études *in vitro* basées sur les KCs épidermiques concernant leur pertinence pour l'étude du psoriasis ou de l'HS par exemple, ce sont les cellules HaCaT qui ont le plus souvent été utilisées comme modèles cellulaires<sup>289,308,309</sup>. Il est plus difficile d'analyser le phénotype kératinocytaire dans un modèle *in vivo*, du fait que l'épiderme est un tissu complexe et que les KCs sont influencés par les autres types cellulaires épidermiques, ainsi les conclusions sur un phénomène précis sont plus réservées.

Il faut également souligner que l'utilisation des HaCaT représentent une option moins onéreuse que d'autres lignées cellulaires, telles que les kératinocytes épidermiques humains 001 (HEK001) et les kératinocytes Tr (KERTr). De plus, les cellules HEK 001 n'expriment pas la KRT10, ce qui renseigne sur un phénotype exclusivement de type basal, tandis que KERTr sont dépourvus de molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité, moins représentatives des KCs humains<sup>310</sup>. Tandis que de nombreuses lignées de KCs transformées par des virus comportent des altérations d'expression de leurs marqueurs de différenciation, les HaCaT ont l'avantage de pouvoir exprimer l'ensemble des marqueurs de différenciation tels que KRT1 et la KRT10, ainsi que l'IVL et la filaggrine<sup>311</sup>.

Les cellules HaCaT sont tout de même plus faciles à obtenir et à cultiver et sont un premier choix dans les analyses initiales et fondamentales d'un projet de recherche. Il est nécessaire de cultiver nos lignées kératinocytaires avec l'ajout de cytokines afin de se rapprocher des conditions physiopathologiques de notre modèle d'étude. Compte tenu de l'utilisation du modèle HaCaT dans l'HS mais également dans d'autres dermatoses inflammatoires, en particulier le psoriasis, et l'absence de modèle animal validé dans l'HS, nous avons fait le choix d'utiliser ce modèle. Les premières données issues de notre modèle *in vitro* monocouche de HaCaT devront ensuite être validées, par l'obtention de prélèvements cutanés issus de patients HS.

## **B. Modèle *in vitro* HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup> mimant l'HS**

Dans un premier temps, nous avons évalué le modèle *in vitro* HaCaT KO, obtenu grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Boniotto, qui a d'ailleurs publié à partir de ce modèle, une étude sur les caractéristiques et les modalités thérapeutiques dans l'HS<sup>289</sup>. Nous avons observé et validé une sous-expression génique et protéique de la NCSTN mature. Nous rappelons que la lignée HaCaT KO pour la NCSTN<sup>-/-</sup> a été obtenue grâce à la technologie CRISPR Cas9. Cette technique consiste à provoquer une cassure de l'ADN double brin des cellules. Cette interruption du cadre de lecture peut ensuite être prise en charge par réparation spontanée *via* une jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) ou en présence d'une séquence d'ADN donneur par recombinaison homologue (HDR). Lorsque la Cas9 clive avec succès le gène cible, des modifications spontanées sont introduites par NHEJ. Ces modifications sont généralement des délétions et/ou des insertions d'une ou quelques dizaines de nucléotides. Les deux tiers d'entre elles vont alors induire un décalage du cadre de lecture dans une séquence codante inactivant complètement le produit du gène. Cependant si la modification induit un changement d'un multiple de 3 paires de bases cela peut engendrer une protéine non fonctionnelle<sup>312</sup>. Ce phénomène a pu se produire dans le modèle HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup> en induisant une modification au niveau du N-terminal de la protéine ce qui a déjà été démontrée comme capable d'entraîner une incapacité de maturation de la protéine NCSTN, qui reste alors localisée au sein du réticulum endoplasmique. La partie N-terminale de la NCSTN comprend des sites de glycosylation conservés, nécessaires au trafic de la protéine vers l'appareil de golgi, où elle sera associée aux autres sous unités de la  $\gamma$ -sécrétase, afin d'assurer le fonctionnement correct du complexe enzymatique et permettre la transduction du signal NOTCH<sup>313</sup>. Une étude, à partir d'explant cutané provenant de patients atteints d'HS et porteurs de mutations du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase, a révélé que l'expression membranaire de la  $\gamma$ -sécrétase était inchangée, malgré la réduction de l'expression de protéines cellulaires la composant<sup>314</sup>, ce qui pourrait être liée à la sélection post-transcriptionnelle physiologique des complexes qui sont ensuite localisés à la membrane. Il est fort probable que les patients HS ne présentent qu'une perte de fonction partielle de la  $\gamma$ -sécrétase, et qu'ils possèdent encore des quantités suffisantes de protéines fonctionnelles pour maintenir une physiologie normale. Ainsi, toute réduction de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase par d'autres facteurs, notamment environnementaux tels que le tabac, pourrait déclencher un phénotype clinique<sup>135</sup>.

Notre modèle HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup> présente une expression certes réduite de 70% de la protéine NCSTN mature, il serait intéressant de compléter nos premières données par une étude fonctionnelle de la protéine. Ce modèle *in vitro* représente cependant assez bien les mutations perte de fonction de la NCSTN décrites chez les patients HS<sup>314</sup>.

Nous avons mis en évidence des troubles de la différenciation de la lignée HaCaT KO, sur le plan morphologique mais également concernant l'expression des marqueurs d'indifférenciation/différenciation, par rapport à la lignée HaCaT WT. En effet, la lignée HaCaT KO, à l'état indifférencié et différencié, montre une sous expression du marqueur d'indifférenciation ainsi que des marqueurs de différenciation kératinocytaire, par rapport à la lignée HaCaT WT du même statut de différenciation, suggérant un phénotype plutôt indifférencié. L'ajout de calcium dans le milieu de culture permet certes une augmentation des marqueurs de différenciation et une diminution du marqueur d'indifférenciation, dans notre lignée KO, mais à un niveau d'expression moins important comparé à la lignée HaCaT WT. Une étude a montré, à partir de coupes histologiques issues de lésions d'HS de patients, que la KRT1 semblait diminuer et la KRT14 augmenter évoquant plutôt un phénotype de kératinocyte basal<sup>315</sup>. Nous observons également une diminution importante des marqueurs de différenciation kératinocytaire chez notre lignée HaCaT KO, après induction d'une inflammation, que nous n'observons pas chez la lignée HaCaT sauvage.

Notre hypothèse dans notre modèle est que cette différence de différenciation kératinocytaire est probablement liée à l'altération de l'expression de la NCSTN, entraînant secondairement un défaut d'activité de la  $\gamma$ -sécrétase et ainsi du signal Notch, qui joue un rôle important dans la différenciation des KCs. Il est important d'essayer de reproduire au plus près les conditions physiopathologiques de l'HS dans notre modèle *in vitro*. Il apparaît que le modèle HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup> présente certaines caractéristiques retrouvées chez les patients atteints d'HS, en particulier les troubles de différenciation kératinocytaire. Ces troubles de différenciation s'aggravent en contexte inflammatoire qui se rapprochent des conditions physiopathologiques de l'HS. Cependant, il s'agit de premières données exploratoires réalisées sur un modèle cellulaire concernant une pathologie complexe et multifactorielle. Des analyses complémentaires, à partir de notre modèle *ex vivo*, permettront d'affiner nos premiers résultats.

## **C. Impact de l'inflammation sur le modèle HaCaT KO**

Afin de reproduire le contexte inflammatoire retrouvé dans l'HS, nous avons fait le choix d'utiliser le LPS, molécule présente à la membrane externe des bactéries Gram négatif, afin de mimer l'inflammation induite par une infection bactérienne sachant que la prévalence de ce type de bactérie est retrouvée augmentée au sein des lésions d'HS<sup>316</sup>. Par ailleurs, le CD14 et le TLR4 sont exprimés, de manière constitutive, par les KCs humains et jouent un rôle important dans les réponses cellulaires induites par le LPS dans le cadre des infections bactériennes. Il a été montré que la liaison du LPS au CD14 et au TLR4 des KCs provoque une réponse rapide  $Ca^{2+}$  médié, permettant la translocation du facteur NF- $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires<sup>317</sup>. Nous avons fait également le choix d'utiliser le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 car il s'agit de cytokines inflammatoires majeures dans la physiopathologie de l'HS et dont le TNF- $\alpha$  est l'une des cibles thérapeutiques par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$  dans cette maladie.

Nos résultats, concernant le sécrétome de la lignée HaCaT KO, en condition inflammatoire, montrent des similarités à ce qui est retrouvé notamment à partir d'explant cutané lésionnel de patients HS. En effet, nous montrons une élévation de l'IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$  et IL-6 chez notre lignée HaCaT KO en réponse à une inflammation. Dans la peau lésionnelle de patients HS, il est retrouvé une augmentation d'IL-23 et du TNF- $\alpha$  ainsi que des niveaux d'expression élevés d'IFN- $\gamma$ , d'IL-6, d'IL-17A et de TGF- $\beta$ <sup>114</sup>. Une autre étude, à partir d'explant cutané lésionnel de patients HS, a montré que les cytokines retrouvées étaient associées à la réponse T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>17 telles que : IL-17, IFN $\gamma$ , IL-23, IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ <sup>202</sup>. Fait intéressant, nous remarquons également une augmentation de production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-17A, d'IL-23, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ , dans notre modèle HaCaT KO contrairement aux HaCaT WT, en condition non inflammatoire, suggérant un dysfonctionnement kératinocytaire dans le modèle *in vitro* HS.

De plus, nous remarquons une diminution de l'IL-10 dans notre lignée HaCaT KO en condition contrôle et inflammatoire comparé aux HaCaT WT contrôle, sur l'analyse multiplexe. L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive, en cas de perte de l'équilibre entre les éléments régulateurs et inflammatoires cela peut compromettre l'homéostasie de la réponse immunitaire à l'origine de dommages cellulaires et de chronicisation de la réponse inflammatoire. Il a été montré que les KCs différenciés synthétisent, de manière constitutive de l'IL-10<sup>318</sup> et que cette production pouvait être

augmentée, selon des facteurs extérieurs, tels que les rayonnements ultraviolets avec un effet dose<sup>319</sup>. Tandis qu'une autre étude a montré que l'altération de la voie Notch pouvait altérer la production d'IL-10<sup>320</sup> ce qui pourrait expliquer ce défaut de sécrétion dans notre lignée HaCaT KO par rapport à la lignée sauvage. Ces données ne concordent pas avec les résultats des études faites chez les patients HS, où l'IL-10 est retrouvée augmentée dans le sérum et à partir d'explants cutanés lésionnels<sup>321-323</sup>. Dans notre cas, l'absence de cellules immunitaires, au sein de nos cultures, notamment les T-regs et les DCs, peut également expliquer l'absence d'augmentation de l'IL-10 dans notre modèle HacaT KO, en condition inflammatoire. En conclusion, il semblerait que les kératinocytes HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup> puissent favoriser et entretenir la réponse inflammatoire par la sécrétion à l'état basal de cytokines pro-inflammatoires participant alors à l'auto-inflammation dans l'HS et compromettant l'homéostasie immunitaire.

Les cytokines issues de la voie T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17, c'est-à-dire l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-23, le TNF- $\alpha$  et l'IL-17A, sont donc retrouvées augmentées dans notre modèle HaCaT KO à l'état basal et après induction d'une réponse inflammatoire par rapport aux WT contrôle. Il est important de notifier que ces médiateurs de l'inflammation favorisent également la prolifération kératinocytaire et peuvent ainsi aggraver l'hyperplasie épidermique et l'occlusion folliculaire toutes deux retrouvées au sein des lésions d'HS<sup>174,324</sup>. L'induction de l'inflammation a été générée par l'IL-6, dont l'expression augmente dans les KCs lors d'une agression cutanée. L'IL-6 induit également la prolifération des KCs *via* la signalisation STAT3 afin de favoriser la réparation de la barrière cutanée<sup>175</sup>. Alors que les KCs expriment de manière constitutive l'IL-1 $\beta$ , son expression est cependant augmentée en cas de présence de signaux de danger, ce qui active également la sécrétion de CCL20 par les KCs afin d'attirer les cellules immunitaires sur la zone d'agression<sup>175</sup>. L'IL-1 $\beta$  induit la défense antimicrobienne de la peau et, avec l'IL-6 et l'IL-23, elle est cruciale pour les cellules T productrices d'IL-17<sup>325</sup>. En effet, l'IL-23, n'influence pas la différenciation T<sub>H</sub>17 mais agit sur les lymphocytes T<sub>H</sub>17 différenciés, qui possèdent alors le récepteur de l'IL-23, favorisant ainsi leur expansion<sup>326,327</sup>. L'IL-17 permet d'induire l'expression de l'IL-23 et de PAMs par les KCs<sup>175,325,328</sup>.

En revanche, l'expression génique de l'IL-22 est retrouvée quasi inexistante pour la lignée HaCaT KO contrôle et diminuée de plus de la moitié dans les HaCaT KO inflammatoires comparé à la condition HaCaT WT contrôle. En effet, les KCs sont une cible majeure de la famille des cytokines IL-20, comprenant l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22

et l'IL-26, synthétisées par les lymphocytes, et donc qui agissent de manière paracrine permettant la communication avec les cellules épithéliales. L'IL-22 peut induire la prolifération des KCs et favorise la production de médiateurs inflammatoires et d'immunomodulateurs<sup>329</sup>. L'IL-17 et l'IL-22 sont donc principalement produites par les cellules immunitaires et jouent un rôle essentiel dans l'immunorégulation et la défense de l'hôte. Dans la littérature, il a été montré que les taux sériques circulants d'IL-22 sont significativement diminués chez les patients atteints d'HS que chez les témoins sains<sup>330</sup>. Cependant il n'y a pas de lien entre les taux d'IL-22 et l'activation pro-inflammatoire ou la gravité de l'HS. Au sein des lésions cutanées de patients atteints d'HS, il a été mis en évidence une diminution du nombre de cellules T<sub>H</sub>22 et une inhibition de la voie de l'IL-22<sup>210</sup>. L'IL-22 ne joue pas un rôle direct sur la réponse immunitaire, elle intervient sur les cellules épithéliales formant les barrières corporelles (peau, système digestif et respiratoire) et favorise la production de PAMs et de chimiokines<sup>331</sup>. Dans la littérature, il a également été décrit un déficit en IL-22 au sein des lésions d'HS, alors qu'elle apparaît augmentée dans d'autres pathologies cutanées comme le psoriasis ou la dermatite atopique<sup>213</sup>, ce qui peut expliquer l'altération de la production de PAMs par les KCs et ainsi favoriser la dysbiose cutanée dans l'HS. Il a été montré qu'il existe non seulement une baisse de l'expression de l'IL-22 au sein des lésions cutanées d'HS mais également une diminution significative du taux sérique de cette cytokine, ce qui indique que cette diminution est généralisée chez les patients atteints d'HS. L'absence de corrélation entre le taux d'IL-22 et la gravité de la maladie peut signifier qu'il s'agit d'un événement précoce dans l'évolution naturelle de la maladie.

Ainsi, nos résultats sur le sécrétome de notre modèle HaCaT KO en condition standard et inflammatoire, valident certaines données retrouvées dans la littérature concernant la réponse inflammatoire dans l'HS. Cependant il s'agit d'un modèle cellulaire kératinocytaire qui ne représente pas l'ensemble des acteurs intervenant dans l'inflammation cutanée de l'HS. Nos résultats pourraient être complétés par l'évaluation de l'impact du sécrétome des HaCaT, aux différentes conditions, sur des PBMCs de donneurs sains en réalisant un immunophénotypage et une étude de l'état d'activation de ces PBMCs traités avec les milieux conditionnés de nos lignées HaCaT. Ces données pourront également être corrélées dans un second temps avec l'obtention d'explants cutanés lésionnels et de sérums issus de patients HS.

Nous avons également voulu évaluer l'impact de la réponse inflammatoire sur l'expression génique des voies de signalisation. Nous avons mis en évidence une augmentation marquée de l'expression de Tbet et ROR $\gamma$ t dans la lignée HaCaT KO par rapport au HaCaT WT, il s'agit respectivement des facteurs de transcription clé du lignage T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17, d'autant plus que nous avons également montré une augmentation d'expression de l'IFN- $\gamma$ , du TGF- $\beta$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'IL-23 qui correspondent aux cytokines induisant la réponse T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>17. Nous n'avons pas retrouvé d'augmentation d'expression du CCL20, un médiateur de la voie T<sub>H</sub>17, dans notre lignée HaCaT KO alors que nous observons une augmentation de son expression dans la lignée WT en condition inflammatoire.

Par ailleurs, nous retrouvons une diminution d'expression des facteurs de la voie T<sub>H</sub>2 tels que le facteur de transcription GATA3 ainsi que les cytokines IL-4 et IL-5 dans les HaCaT KO comparé aux HaCaT WT. L'IL-4 et l'IL-5 sont des cytokines qui sont inversement corrélées à la présence de cytokines associées aux voies T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>17<sup>332</sup>, ce qui souligne donc l'importance des cytokines T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>17 dans la pathogenèse de l'HS. Il a été montré que la réduction de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase provoque une diminution de l'expression de GATA3<sup>333</sup>, et l'altération de l'expression de la NCSTN a également entraîné une diminution du taux de GATA3 chez les patients HS et dans les KCs traités par siARN (ARN interférents) de la NCSTN<sup>334</sup>. Cependant, nous avons retrouvé une augmentation, de plus du double de l'expression des transcrits de l'IL-13, autre cytokine de la voie T<sub>H</sub>2, dans la lignée HaCaT KO en condition non-inflammatoire et inflammatoire comparativement aux HaCaT WT contrôle. Il a été décrit que le déficit de la voie Notch au niveau de l'épiderme, était associé à une sécrétion élevée de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) par les KCs dans un modèle de dermatite atopique. Les DCs activées par la TSLP sont capables d'induire une polarisation des cellules T<sub>H</sub>2 et la production de cytokines IL-5 et IL-13 ainsi que le TNF- $\alpha$  tout en inhibant l'IL-10<sup>320</sup>. Il a d'ailleurs été observé par l'équipe de Daniele et al., une importante élévation des taux d'IL-13 sériques chez les patients atteints d'HS<sup>335</sup>. Les auteurs concluaient au rôle anti-inflammatoire de l'IL-13 et à l'induction de macrophage M2 dans ce contexte d'inflammation chronique<sup>335</sup>. Ainsi, dans notre modèle HaCaT KO, l'altération de la voie de signalisation Notch pourrait expliquer ces différences d'expression concernant l'IL-13, le TNF- $\alpha$  et l'IL-10.

Nous observons une diminution de l'expression de l'ARNm de MMP-1 que ce soit dans la lignée HaCaT WT en condition inflammatoire et dans la lignée HaCaT KO, en condition standard et inflammatoire, par rapport aux WT contrôle. Dans la

littérature, il a été retrouvé à partir d'explant cutané de patients HS, une production accrue de MMP-2, MMP-8 et MMP-9<sup>336</sup>. L'augmentation de l'expression des MMPs peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , qui sont élevées dans l'HS<sup>336,337</sup>. Ces MMPs peuvent être impliquées dans la rupture précoce des unités de follicules pileux et dans l'altération des jonctions cellules-cellules épidermiques lors de la formation des sinus dans l'HS par le remodelage de la MEC, d'ailleurs, il a été montré que la production de MMP-2 et de MMP-8 était positivement corrélée à la gravité de l'HS<sup>336</sup>. Il a également été décrit, à partir d'un modèle *ex vivo*, de prélèvement tissulaire lésionnel de patient HS, que l'altération de la MEC induite par les MMPs pouvait participer à l'inflammation de l'HS en libérant des facteurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$ <sup>166</sup>. Cependant, l'expression de MMP-1 est déclenchée dans les KCs basaux (indifférenciés) lorsqu'il y a une dégradation de la MEC<sup>338</sup>. L'expression de la MMP-1 est induite lorsque les cellules sont en contact avec le collagène de type I, par la liaison à l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  ce qui favorise la migration et enclenche le processus de cicatrisation<sup>338</sup>. Nous avons réalisé notre analyse à partir de KCs différenciés, sans contexte de blessure, ce qui peut expliquer l'absence d'augmentation d'expression de la MMP-1, contrairement à d'autres métalloprotéinases, dont l'expression peuvent être induite par des cytokines pro-inflammatoires.

Nous avons retrouvé une nette augmentation de l'expression des transcrits de Notch 1 à 3 ainsi que de PIK3R3 et une diminution de l'expression du transcrit AKT3 dans la lignée KO, en condition non inflammatoire et inflammatoire, par rapport à la lignée HaCaT WT contrôle. Ces résultats n'étaient pas attendus, du fait de la déficience du gène de la NCSTN dans notre lignée mutée, nous nous attendions à retrouver une altération de la voie Notch, l'une des hypothèses physiopathologiques soutenues par la plupart des auteurs. Quand nous regardons les données de la littérature, les données sont plutôt contradictoires, l'équipe de Xiao a montré, à partir d'une lignée HaCaT traitée par siARN ciblant le gène NCSTN et à partir d'explants cutanés issus d'un patient atteint d'HS familial ayant une mutation perte de fonction de la NCSTN, une diminution de l'expression des transcrits et des protéines de la nicastrine et de Notch 1-3<sup>126</sup>.

Une autre étude portant sur l'analyse de l'expression génique de Notch 1-4 notamment dans l'HS, n'a pas mis en évidence de différence d'expression significative dans la peau lésionnelle HS par rapport aux contrôles sains<sup>339</sup>. Une autre analyse montrait une absence de différence d'expression du transcrit de la NCSTN entre les

explants cutanés lésionnels et sains issus de patients atteints d'HS<sup>340</sup>. Très récemment l'équipe de Bechara a constaté, sur un échantillonnage de 60 patients atteints d'HS, une augmentation significative de l'expression des transcrits et des protéines de NCSTN, Notch1-3, PIK3R3 et AKT3 dans la peau lésionnelle et périlésionnelle des patients HS par rapport aux témoins sains<sup>341</sup>, même à des stades précoces de la maladie suggérant l'implication de ces voies dans le développement lésionnel de l'HS. Il n'a pas été retrouvé de modification du niveau d'expression de l'ARNm des gènes cités ci-dessus selon la présence d'antécédents familiaux ou la consommation de tabac. Une faible corrélation du niveau d'expression génique de Notch 2 et 3 avec l'élévation de l'IMC a été décrite<sup>341</sup>.

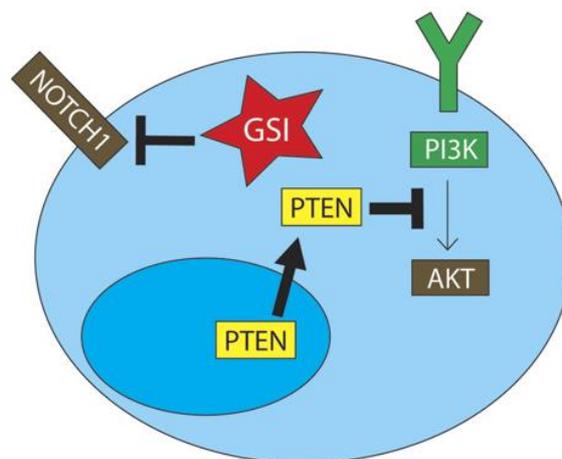
Il a été montré que la signalisation Notch favorise la prolifération des KCs et conduit à l'activation de l'immunité innée en régulant le développement et la fonctionnalité des cellules immunitaires<sup>136,342,343</sup>. Il a également été décrit que la voie Notch est principalement active dans les cellules qui subissent ou initient une différenciation terminale, ainsi le follicule pileux, localisation initiale des lésions d'HS, aurait une activité Notch importante<sup>341,344</sup>.

Par ailleurs, l'activation de la voie Notch entraîne une élévation de l'expression de l'IL-17, cytokine majeure issue de la différenciation des cellules T en T<sub>H</sub>17<sup>342</sup>. En effet, à partir d'un modèle murin de psoriasis (dermatose inflammatoire), il a été montré que l'injection d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase entraînait la diminution de l'expression de Notch1 et par conséquent la diminution de l'IL-17 et du facteur de transcription des T<sub>H</sub>17, ROR $\gamma$ t, conduisant à une baisse de l'inflammation cutanée<sup>345</sup>. Chez la souris, l'activation de la voie PI3K/AKT induisait une prolifération des cellules souches des follicules pileux et de l'épiderme inter folliculaire, conduisant à une hyperplasie épidermique et folliculaire<sup>345</sup>.

Ainsi, ces dernières données remettent en cause l'idée que la voie Notch ferait constamment défaut dans l'HS, au contraire, son hyperactivation pourrait contribuer à l'aggravation de l'inflammation et pourrait être une des causes de l'inflammation chronique dans l'HS. Les données contradictoires retrouvées dans la littérature pourraient s'expliquer par l'origine des études et donc la présence de mutation différente selon les populations étudiées. Nos données montrant une augmentation de l'expression de l'ARNm de Notch 1 -3 au sein de notre lignée KO doivent être confirmées par une analyse protéique de Notch. De plus, dans l'HS, il ne s'agit pas d'un déficit quantitatif des acteurs de la voie Notch mais plutôt d'un défaut de fonctionnalité de la NCSTN composant de la  $\gamma$ -sécrétase, qui empêcherait la libération

protéolytique du NICD et donc d'un défaut qualitatif de la voie de signalisation empêchant la transcription des gènes cibles en amont tels que HES1/ *Hairy and enhancer of split 1*.

Nos résultats, dans la lignée HaCaT KO, montrent une augmentation significative des niveaux d'expression de PIK3R3 (*phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3*) mais une diminution de l'expression d'AKT3, deux composants en aval de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase et de la voie Notch. PIK3R3 et AKT3 sont des molécules de signalisation majeure au sein de la voie PI3K/AKT. La voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée également dans de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose. L'activation de la voie PI3K/AKT est impliquée dans la prolifération et la différenciation des KCs<sup>126,341</sup>. En cas d'altération de cette voie de signalisation, il a été montré d'importants troubles de la différenciation et de la prolifération kératinocytaire et un défaut de différenciation des sébocytes (cellules formant la glande sébacée) qui remettent en cause l'homéostasie du follicule pileux menant à la production de DAMPs<sup>169</sup>. Il a été montré que l'inhibition de la voie Notch permettait de restaurer l'expression de PTEN<sup>346</sup>. Hors PTEN va bloquer la voie de signalisation PIK3R3/AKT3 en aval de PIK3R3, pouvant expliquer dans le cas de notre lignée HaCaT KO, la diminution de l'expression de l'ARNm d'AKT3 (**Illustration 12**).



**Illustration 12.** Inhibition de la voie de signalisation Notch entraînant le blocage secondaire de la voie PI3K/AKT d'après Gutierrez, 2007<sup>346</sup>.

## **D. L'inflammation altère l'état de différenciation kératinocytaire et les capacités de cicatrisation de notre modèle *in vitro* d'HS**

Nos résultats, concernant l'expression des marqueurs de différenciation kératinocytaire, en fonction de l'induction d'une réponse inflammatoire, ne montrent pas de différence majeure dans notre lignée HaCaT WT, du fait probablement que notre lignée soit déjà différenciée. Nous montrons dans notre lignée HaCaT KO, non inflammatoire, une altération des marqueurs de différenciation avec une augmentation des transcrits des marqueurs de différenciation kératinocytaire (KRT1, KRT10 et IVL) et une diminution d'expression de la KRT14 comparativement à la lignée sauvage. Ces données concordent avec les données de la littérature, où l'équipe de Xiao a montré que lorsqu'on traitait des KCs avec un siRNA ciblant la NCSTN, il existait une aberration d'expression des marqueurs de différenciation<sup>126</sup>. La différenciation épidermique est contrôlée par la signalisation de l'EGFR<sup>334,347</sup>. Il a été décrit que l'altération de la NCSTN provoquait une réduction de l'EGFR et contribuait ainsi à une différenciation kératinocytaire anormale au sein des lésions d'HS. Une étude a montré que l'inhibition de la NCSTN (siARN) dans des cellules HaCaT augmentait l'expression en ARNm et en protéine de la KRT 1 (marqueur de différenciation précoce) et de la loricrine (marqueur de différenciation tardive), ces données ont également été retrouvées sur un modèle murin NCSTN<sup>-/-334</sup>. Ainsi l'altération de la NCSTN favorise la différenciation épidermique, cependant ces données sont en contradictions avec les lésions cutanées présentes dans l'HS où il est retrouvé une acanthose épidermique pouvant être liée soit à une hyperprolifération kératinocytaire comme dans le psoriasis soit à une augmentation de la viabilité kératinocytaire est donc plutôt à un défaut de différenciation.

Cette contradiction est résolue lorsque nous induisons une inflammation dans le milieu de culture, ce qui mime le contexte inflammatoire de la maladie. En effet, dans notre lignée HaCaT KO, les niveaux d'expression des marqueurs de différenciation kératinocytaire sont inversés, avec une diminution nette des marqueurs de différenciation sauf pour l'IVL dont l'expression du transcrite est stable. Nous observons également que l'inflammation induit une augmentation du marqueur d'indifférenciation (KRT14) chez nos HaCaT KO. Les KCs sont les cibles directes de nombreuses cytokines, ces dernières induisent des changements de propriétés biologiques, permettant aux KCs de contribuer à la réponse inflammatoire, telles que

la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de PAMs, mais les cytokines jouent également sur les capacités de différenciation et de migration kératinocytaire<sup>18,21</sup>. En effet, il est montré que les cytokines pro-inflammatoires diminuent les marqueurs de différenciation des KCs<sup>21</sup>. En particulier, il a été montré que l'IL-22 réduisait l'expression de nombreux marqueurs de différenciation kératinocytaire tels que la filaggrine, l'IVL, la loricrine, la KRT1 et la KRT10<sup>348,349</sup>. L'équipe de Morel s'est appliquée à étudier les effets des cytokines seules ou combinées sur la différenciation kératinocytaire. Ils ont montré que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-17A, l'IL-22, et le TNF- $\alpha$  diminuaient, de manière séparée, l'expression de la KRT10 d'un facteur 3 à 8, tandis que la combinaison de ces cytokines avait un effet synergique, diminuant de 500 fois l'expression de l'ARNm de la KRT10<sup>348</sup>. Ils ont montré que le TNF- $\alpha$  diminuait l'expression de l'ARNm de la KRT1 et de la filaggrine, tandis que l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-17A n'ont qu'une activité mineure sur l'expression des marqueurs de différenciation<sup>348</sup>. Il a été montré des niveaux d'inhibition différents entre les cytokines, en effet, le TNF- $\alpha$  est l'une des cytokines la plus puissante concernant la réduction d'expression des marqueurs de différenciation puisque son retrait permet de rétablir partiellement l'expression de l'ARNm des différents facteurs étudiés<sup>348</sup>. La même équipe a voulu confirmer ses résultats, *in vivo*, en injectant en intradermique dans les oreilles de souris, un cocktail de cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-22 et TNF- $\alpha$ ). A 24 heures, ils observaient une nette diminution de l'expression de l'ARNm de la KRT1, KRT10, FLG et IVL par rapport à la peau contrôle (injection de PBS). L'analyse histologique à 48 h montrait une hyperplasie épidermique importante dans les oreilles injectées avec les cytokines<sup>348</sup> et confirmait la diminution de l'expression de la KRT10 et la filaggrine. De plus, la réalisation d'une coloration au Ki67 révélait une prolifération kératinocytaire accrue sur la zone d'injection de ces cytokines<sup>348</sup>. Cependant, l'épaississement de l'épiderme (acanthose) observé après ajout seul de l'IL-22, n'était pas expliqué par une augmentation de la prolifération des KCs<sup>348,350</sup>. Les auteurs évoquaient également la possibilité que l'hyperplasie épidermique était liée à l'inhibition de la différenciation et ainsi à la durée de vie prolongée des KCs avant leur différenciation terminale en cornéocytes. Une autre étude, se basant sur des analyses *in vitro* et *in vivo*, a utilisé un siARN let-7b afin de cibler directement l'IL-6 et son rôle sur la signalisation ERK. Ils ont montré que la surexpression de let-7b dans les KCs basaux inhibe l'acanthose et réduit la gravité de la maladie dans deux modèles murins de psoriasis<sup>351</sup>. Ils montrent que let-7b par son contrôle sur la signalisation ERK1/2 dépendante de l'IL-6 permet une régulation de la différenciation kératinocytaire<sup>351</sup>. Ainsi, ils démontrent

indirectement que l'IL-6 est donc une cytokine essentielle dans la régulation de la différenciation cellulaire et qui est particulièrement induite dans l'épiderme lésé de patients atteints de dermatoses inflammatoires telles que le psoriasis et l'HS<sup>352,353</sup>. Nos résultats et ces données sont tout à fait intéressants, car la mise de notre modèle *in vitro* d'HS, dans un environnement proche de celui de la maladie vérifie certaines données cliniques. Les kératinocytes présentant une altération de la voie Notch, en présence de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (cytokines utilisées pour induire l'inflammation dans nos cultures), montrent une évolution de leur profil de différenciation vers un phénotype de type basal, améliorant alors leur capacité de prolifération et leur survie cellulaire. Ces modifications ont pour conséquence l'induction d'une acanthose épidermique favorisant ainsi l'occlusion folliculaire et la formation de cicatrices hypertrophiques caractéristiques dans l'HS. Ce phénotype pourrait s'apparenter à un état partiel d'EMT favorisant la prolifération et la migration kératinocytaire comme décrit dans des cas de plaies cutanées.

Nous avons également voulu analyser l'impact de l'inflammation et du statut de différenciation sur les capacités de cicatrisation de notre lignée HaCaT KO. Nous observons que notre lignée KO indifférenciée présente une capacité de fermeture moins importante que la lignée HaCaT WT tandis que l'induction de la différenciation entraîne une inversion des capacités de fermeture en faveur des HaCaT KO. Une autre équipe a montré à partir du même modèle kératinocytaire HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup>, en culture standard, que les KCs présentaient une augmentation de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules en phase S<sup>126</sup>. Il a été décrit que les mutations ciblant la NCSTN pouvaient perturber la prolifération et la différenciation des KCs par l'activation des signaux Notch et PI3K<sup>126</sup>. Les preuves moléculaires de l'association de Notch avec l'hyperprolifération des KCs sont bien établies<sup>354,355</sup>. La signalisation Notch est dérégulée dans plusieurs autres dermatoses inflammatoires comme le psoriasis et la dermatite atopique<sup>57</sup>. Il a été montré que la surexpression, autant que la perte de Notch1, ont toutes deux favorisé la prolifération des épithéliums stratifiés<sup>356</sup>. D'ailleurs il a été retrouvé une hyperplasie psoriasiforme de l'épiderme inter folliculaire à partir d'explants cutanés issus de patients HS et dans la peau de souris déficientes en Notch1<sup>167,171,357</sup>. Dans notre cas, nous retrouvons la surexpression de l'ARNm de Notch 1-3 dans la lignée HaCaT KO, que ce soit en condition standard ou en condition inflammatoire, ce qui peut expliquer l'amélioration des capacités de fermeture par une

augmentation des capacités prolifératives de ces cellules par rapport à la lignée sauvage.

Nous avons montré l'importance de la présence du calcium dans l'induction de la différenciation kératinocytaire cependant le calcium extracellulaire est également un régulateur majeur de l'homéostasie épidermique, il favorise la migration et la prolifération kératinocytaire. Lors de plaies cutanées, l'expression du récepteur sensible au calcium (CaSR) augmente, élevant ainsi le taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les KCs. Une étude a montré que le blocage de l'expression du CaSR, dans les KCs en culture, a nettement inhibé la propagation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire induite par la blessure, diminuant leur capacité à migrer et supprimant leur capacité proliférative<sup>358</sup>. A partir de ces données, nous pouvons émettre que l'amélioration des capacités de cicatrisation de nos HaCaT KO différenciés par rapport aux indifférenciés, peut être liée à la différence de concentration calcique dans les milieux de culture qui joue sur la migration et la prolifération kératinocytaire.

Par ailleurs, nous observons une nette augmentation des capacités de fermeture, lorsque nous ajoutons des cytokines pro-inflammatoires au milieu de culture (LPS+TNF- $\alpha$ +IL-6) des HaCaT KO différenciés. Or, il a été démontré que les paires de KRT5-KRT14 et KRT1-KRT10 sont directement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, qui amorce la différenciation des KCs. En outre, l'absence ou la réduction de ces paires a entraîné une plus grande prolifération épidermique<sup>359,360</sup>. Nous avons montré, sur nos analyses précédentes, que lors de l'induction de l'inflammation sur notre lignée HaCaT KO, cette dernière montrait une nette diminution de l'expression d'ARNm de la KRT1 et 10, pouvant expliquer un état d'hyperprolifération et ainsi augmenter les capacités de cicatrisation du test de blessure. La réépithélialisation joue en effet un rôle clé pendant la cicatrisation et peut être caractérisée par la migration ou la prolifération des KCs. D'après nos observations et les données de la littérature, l'élévation de la capacité de cicatrisation de notre modèle *in vitro* d'HaCaT semble être liée à l'altération de la voie Notch, à la présence de calcium dans le milieu et à l'induction d'une inflammation qui entraîne un état d'hyperprolifération de nos KCs. Il serait intéressant de poursuivre ces tests de blessure en présence de mitomycine, afin de bloquer la division cellulaire, afin d'étudier les capacités de migration en s'affranchissant de la prolifération cellulaire.

De plus, de nombreuses études ont rapporté que le LPS pouvait favoriser la migration de diverses cellules, y compris des KCs<sup>361</sup>. Le TNF- $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire puissante, joue également un rôle crucial dans divers processus

physiologiques et pathologiques. Dans les cellules normales, le TNF- $\alpha$  contribue au processus de régénération en stimulant la production de cytokines par les cellules immunitaires pendant l'étape d'inflammation et en favorisant la prolifération cellulaire par la sécrétion de facteurs de croissance<sup>18,21,175,362</sup>. Dans les dermatoses inflammatoires telles que l'HS, le TNF- $\alpha$  est l'un des principaux médiateurs, car il entraîne la libération de cytokines inflammatoires, en particulier l'IL-17 et l'IL-23, et provoque une perte de contrôle de la prolifération cellulaire<sup>362,363</sup>. En effet, il a été rapporté que le TNF- $\alpha$  pouvait favoriser la prolifération de plusieurs tumeurs solides telles que les tumeurs ovariennes, intestinales et cutanées<sup>362</sup>. L'effet du TNF- $\alpha$  sur la prolifération cellulaire est régulé en partie par l'activation de la voie PI3K/AKT ; dont dépend la prolifération des KCs humains<sup>362</sup>. La voie PI3K/AKT a été associée à de nombreuses maladies inflammatoires, y compris l'HS et il a été montré qu'elle participait au processus de cicatrisation<sup>22,341</sup>. Cette voie de transduction est en effet responsable d'une variété de fonctions cellulaires physiologiques majeures comme l'inhibition de l'apoptose, la survie cellulaire, la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse<sup>341,346</sup>. Enfin, l'IL-6 favorise également la prolifération cellulaire lors du processus de cicatrisation d'une plaie<sup>175</sup>. En effet, l'afflux de neutrophiles au niveau de la blessure, recruté par l'intermédiaire de l'IL-8, permet la délivrance du récepteur soluble  $\alpha$  de l'IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) libéré de la surface des neutrophiles<sup>364</sup>. Il s'agit d'une étape clé de transition de la phase inflammatoire de la cicatrisation à la phase proliférative, car les complexes IL-6/IL-6R $\alpha$  activent des voies de signalisation par l'intermédiaire du récepteur transmembranaire gp130 ubiquitaire, ayant pour conséquence la prolifération des cellules souches<sup>175,364</sup>. Une étude a montré spécifiquement les effets de l'IL-6 sur les KCs épidermiques humains. L'IL-6 à 2,5 ng/ml ou à des concentrations plus élevées a favorisé la prolifération des KCs, avec une concentration efficace médiane d'environ 15 ng/ml<sup>324</sup>. Il a également été montré que l'IL-6 induisait une réorganisation des filaments intermédiaires de KRT au sein des KCs épidermiques humains<sup>324</sup>.

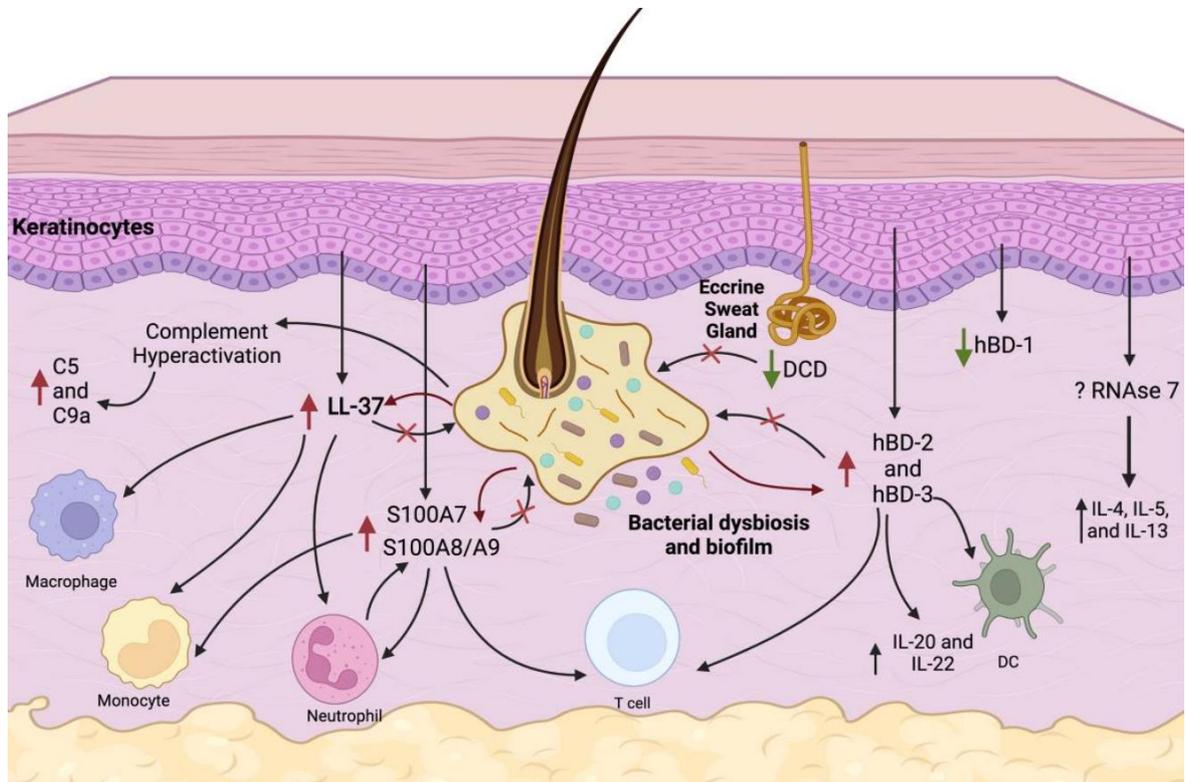
Ainsi, il existe un équilibre subtil entre la prolifération et la différenciation des KCs dans le but de maintenir les caractéristiques architecturales et fonctionnelles de l'épiderme. Cet équilibre homéostatique est mis à mal lors de plaies avec l'initiation du processus de cicatrisation et il est dérégulé dans des conditions pathologiques telles que les cancers cutanés, le psoriasis et l'HS<sup>365,366</sup>. A partir de notre modèle *in vitro* mimant l'HS, nous avons voulu mimer l'environnement inflammatoire, il est apparu que notre modèle présente des troubles de la différenciation ainsi que des capacités

augmentées de fermeture au test de blessure, qui pourraient s'apparenter à un état d'hyperprolifération kératinocytaire. Ce modèle se rapproche de ce qui est constaté dans l'HS, où la perte de contrôle de la réponse inflammatoire et l'augmentation de la prolifération des KCs, elle-même amplifiée par l'inflammation, conduisent à l'obstruction folliculaire, à la formation de sinus et de cicatrices hypertrophiques<sup>167</sup>. Ces analyses pourraient être complétées par, l'ajout de la mitomycine, afin de s'affranchir de l'impact de la prolifération kératinocytaire au test de blessure, permettant d'étudier les différences de capacité de migration des HacaT aux différentes conditions.

## **E. Etude des PAMs dans le modèle *in vitro* d'HS**

Concernant l'analyse de l'expression des PAMs, nous avons montré une nette augmentation d'expression de la LL-37, dans notre modèle *in vitro* d'HS, que ce soit en condition physiologique ou en condition inflammatoire. Nos données vont dans le sens d'autres études montrant une augmentation de l'expression de LL-37 à partir d'explants cutanés issus de patients atteints d'HS, tant sur l'ARNm qu'en protéique<sup>218,220</sup>. Les cathélicidines possèdent une activité antimicrobienne à large spectre et sont exprimées constitutivement par les KCs folliculaires et les mastocytes cutanés. La synthèse de LL-37 est induite par l'inflammation cutanée causée par des agents pathogènes<sup>367</sup>. Il a été montré la présence de LL-37 au sein de plaies cutanées aiguës<sup>368</sup>. Le LL-37 a également une activité immunomodulatrice, il agit sur la chimiotaxie des neutrophiles et des cellules T, et joue sur la maturation des cellules T<sub>H1</sub>/T<sub>H17</sub><sup>218,221</sup>. Les neutrophiles attirés sur la zone inflammatoire libèrent via leurs granules spécifiques également de la LL-37<sup>221</sup>. Des études ont montré que la gravité de l'HS était corrélée à l'élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 et le TNF- $\alpha$  dont la synthèse est favorisée par la présence de LL-37<sup>218,322,369</sup>. La LL-37 favorise aussi la prolifération kératinocytaire par une action anti-apoptotique, contribuant ainsi à l'hyperplasie épidermique et à la séquestration des brins épithéliaux, ce qui aboutit à la formation de sinus<sup>222</sup>. Des résultats récents ont mis en évidence que la LL-37 pouvait induire une tolérance du *Staphylococcus aureus* à la daptomycine, un antibiotique, en augmentant la synthèse de peptidoglycanes, composant majeur dans la formation de biofilm<sup>370</sup>. Ces données sont intéressantes compte tenu de la prévalence de cette bactérie dans l'HS et soulignent la complexité de l'interaction hôte-pathogène en conditions inflammatoires. Ainsi, l'élévation

constante de LL-37 dans l'HS pourrait favoriser l'inflammation locale du fait d'une boucle de rétroaction positive en lien avec une dysrégulation de la réponse immunitaire et la présence d'une dysbiose cutanée, pouvant en faire une potentielle cible thérapeutique (**Illustration 13**).



**Illustration 13.** Implication des PAMPs dans la physiopathologie de l'HS d'après Chopra et al., 2022<sup>218</sup>.

Nous avons montré une baisse de l'expression génique de l'hBD-1 dans notre modèle *in vitro* d'HS, en condition inflammatoire, tandis qu'il existe une élévation de l'expression d'hBD-2 et d'hBD-3 par rapport aux HaCaT WT. Nos résultats sont similaires à ceux décrits dans la littérature (**Illustration 13**), sur des modèles *ex vivo* humain d'HS. En effet, il existe quelques données concernant l'hBD-1 dans l'HS, où il est constaté une réduction systématique de son expression au sein des lésions<sup>213,371</sup>. Concernant les niveaux d'ARNm et de protéines d'hBD-2, ils sont retrouvés à des niveaux significativement élevés dans les lésions d'HS<sup>372</sup>. Contrairement à hBD-2, les données sur hBD-3 sont contradictoires, des études retrouvent soit une augmentation de son expression dans l'HS<sup>210,213,218,371</sup>, soit une expression similaire à celle retrouvée au sein de la peau non lésionnelle<sup>218,373</sup>. Les  $\beta$ -défensines 1, 2 et 3 sont toutes exprimées par les KCs<sup>218</sup>, en réponse à une inflammation ou à l'invasion d'agents pathogènes. Les hBD-1 et hBD-2 ont une efficacité contre les bactéries Gram-négatifs, tandis qu'hBD-3 a un spectre d'activité plus large<sup>218</sup>. Les kératinocytes expriment

constitutivement hBD-1 dans la peau saine, il s'agit d'un PAM majeur de la réponse immunitaire innée<sup>374</sup>. En cas de défaut d'hBD-1, les bactéries commensales cutanées sont susceptibles de proliférer favorisant la dysbiose microbienne. Alors qu'hBD-2 et hBD-3 ne sont pas exprimés de manière constitutive mais sont régulés, sur le plan transcriptionnel, en réponse à une infection microbiennes ou à une inflammation selon les niveaux de TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire caractéristique de l'HS et la présence de LPS<sup>218,375,376</sup>. hBD-2 a des capacités chimiotactiques sur les DCs et les cellules T mémoires et induit la libération d'histamine par les mastocytes, participant à la réponse inflammatoire. hBD-2 et hBD-3 stimulent également la prolifération des KCs<sup>377</sup>, ainsi l'augmentation de l'expression de ces PAMs au sein des lésions d'HS favorisent l'hyperkératose et l'obstruction du follicule pileux créant ainsi les conditions idéales à la prolifération bactérienne et à la formation de biofilm. Les hBD pourraient donc participer à la pathogenèse de l'HS par leur rôle sur la prolifération kératinocytaire et leur capacité de chimiotactisme sur les cellules inflammatoires.

Ensuite, nos résultats montrent une augmentation des protéines S100 dans la lignée HaCaT KO, en condition non inflammatoire et inflammatoire, par rapport à la lignée HaCaT WT. Nous notons une expression de S100A7 et S100A9 plus importante lors de l'ajout de facteurs inflammatoires dans la lignée HaCaT KO par rapport à la condition contrôle. La famille des protéines S100 ou alarmines comprend au moins 21 protéines différentes. Selon la signalisation calcique, ces protéines cytosoliques peuvent servir de régulateurs intracellulaires et de molécules de signalisation extracellulaire de manière paracrine ou autocrine<sup>218</sup>. Les protéines S100 ont de multiples fonctions, en particulier elles régulent la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire, ainsi que la modulation de la réponse inflammatoire<sup>378</sup>. Ces PAMs sont produites par les KCs, les DCs, les neutrophiles et les macrophages<sup>379</sup>. Les protéines S100A7, S100A8 et S100A9 sont rarement détectées dans la peau saine, alors que leur augmentation est bien décrite dans de nombreuses dermatoses inflammatoires telles que le psoriasis, la dermatite atopique et le mycosis fongoïde<sup>218</sup>. S100A7 possède une forte activité bactéricide contre *Escherichia coli* et une action plus faible pour les bactéries Gram-positives, tandis que S100A8/S100A9 forment un hétérodimère connu sous le nom de calprotectine qui joue un rôle majeur dans les infections aiguës et chroniques en particulier dans l'HS<sup>31</sup>. De multiples données dans la littérature confirment une augmentation des niveaux de protéines S100 dans l'HS<sup>210,213,216,218,368,372,373,379</sup> (**Illustration 13**). Une expression accrue de la protéine S100A7, tant au niveau de l'ARNm que des protéines, a été

observée dans la peau lésionnelle de l'HS<sup>210,218,372,373,380</sup>. Il a également été démontré que la présence des protéines S100A8 et S100A9 étaient augmentées dans les lésions cutanées d'HS<sup>210,213,373,375,380</sup>. L'augmentation des protéines S100 peut être induite en réponse à des cytokines inflammatoires. Une étude a montré, à partir de monocultures kératinocytaires HaCaT, au stade indifférencié ( $\text{Ca}^{2+} \leq 0,1$  mM) et différencié ( $\text{Ca}^{2+}$  à 2 mM), qu'après ajout de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-22 et TNF- $\alpha$ ) il existait une nette augmentation de l'expression des gènes de S100A7 et S100A9<sup>310</sup>. Ces PAMs sont induits en cas de signaux de danger, au niveau de la barrière cutanée, ils ont une action sur les réponses inflammatoires de l'hôte, sur l'angiogenèse et possèdent un rôle de chimiotactique en augmentant la production de CCL20, CXCL1, CXCL2, et CXCL8 par les KCs afin de recruter les cellules immunitaires sur la zone agressée<sup>310,381</sup>. L'augmentation des complexes S100A7 et S100A8/S100A9 dans l'HS peut donc aggraver le niveau d'inflammation en raison de leur fonction chimiotactique, augmentant alors l'expression des cytokines pro-inflammatoires et induisant une boucle de rétroaction positive, alors que la dysbiose cutanée persiste. En effet, les protéines S100 exercent leur fonction antimicrobienne par la séquestration des ions  $\text{Mn}^+$  et  $\text{Zn}^+$ , indispensables au métabolisme bactérien<sup>382</sup> ; cependant, une séquestration excessive peut inhiber la réponse de l'hôte, en ayant par exemple un impact sur la fonction de la DCD dépendante du  $\text{Zn}^{+383}$  diminuant alors la réponse antimicrobienne.

Concernant la DCD, nous avons retrouvé une diminution de son expression dans la lignée HaCaT KO, en condition standard et inflammatoire, par rapport à la lignée HaCat WT. La dermcidine est un PAM produit spécifiquement par les glandes sudoripares eccrines et sécrétée de manière constitutive dans la sueur. Il s'agit d'un PAM ayant un large spectre d'activité. Elle n'a jamais pu être isolée des glandes sudoripares apocrines<sup>218,384</sup>. Il a été montré que la DCD entraînait la formation de larges pores au sein des membranes des bactéries Gram-négatives<sup>385</sup>. Contrairement aux autres PAMs, la DCD n'est pas surexprimée par les KCs lors d'une réaction inflammatoire car elle a plutôt une fonction de maintien du microbiote commensal cutané et joue un rôle préventif<sup>218,386</sup>. Il a été montré, à partir d'explant cutané lésionnel de patient HS, que la DCD était significativement diminuée que ce soit au niveau des transcrits que sur le plan protéique<sup>373</sup>, ce qui suggère qu'un défaut de DCD pourrait favoriser la prolifération de bactéries Gram-négatives au sein des lésions chroniques de type sinus dans l'HS et pourrait compromettre les capacités cicatricielles de la peau<sup>387</sup> (**Illustration 13**). Récemment, une équipe a réalisé l'analyse de l'exome entier

d'une famille italienne de quatre membres ayant eu une transmission verticale de l'HS<sup>388</sup>. Ils ont identifié une mutation perte de fonction du gène de la DCD. Ils ont mis en évidence des différences significatives du microbiote cutané, à partir de prélèvements réalisés à l'aîne, des groupes mutés comparé aux contrôles<sup>388</sup>. Ainsi la DCD joue un rôle crucial dans l'étiopathogénèse de l'HS. Cependant, il a été montré que les peptides dérivés de la DCD pourraient favoriser l'inflammation cutanée en induisant la sécrétion de TNF- $\alpha$ , l'IL-8, le CXCL10 et le CCL20 par les KCs<sup>389</sup>. C'est pourquoi l'utilisation de la DCD dans un but thérapeutique dans l'HS semble limitée, des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre son implication dans la maladie.

Nos données n'ont pas montré de différence d'expression de RNase7, dans la lignée HaCaT KO, quel que soit les conditions, par rapport à la lignée WT contrôle. La RNase 7, qui fait partie de la superfamille de la RNase A, possède diverses fonctions, dont un effet immunomodulateur, angiogénique, neurotoxique et une action antimicrobienne<sup>218,390</sup>. La RNase 7 a une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries Gram positives et négatives<sup>390</sup>. La RNase 7 est exprimée de manière constitutive dans les KCs et existe en grandes quantités dans toutes les couches de l'épiderme, avec une concentration particulière dans la couche cornée et dans l'épithélium folliculaire<sup>218,391</sup>, ce qui suggère son implication dans l'HS. Actuellement, la relation entre la RNase 7 et l'HS n'a pas été clairement définie, il a été décrit que l'ARNm de la RNase 7 est augmenté<sup>210</sup> ou diminué<sup>216</sup> dans la peau lésionnelle de l'HS par rapport à la peau saine, et quelle est augmentée dans la peau lésionnelle de l'HS par rapport à la peau périlésionnelle<sup>392</sup> (**Illustration 13**). L'expression de la RNase 7 est induite par la présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  dans l'HS<sup>218,390,391</sup>. La RNase 7 peut également favoriser la détection rapide de l'ADN bactérien par les DCs, provoquant une production accrue de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\alpha$  contribuant à la perpétuation de l'inflammation dans l'HS<sup>393</sup>.

Pour l'élafine, nos données montrent qu'il existe une diminution de l'expression de l'ARNm, en contexte inflammatoire, dans nos 2 lignées HaCaT. Dans la littérature, l'équipe de Bechara a montré, à partir de peau lésionnelle et non lésionnelle de patients HS, qu'il existe une augmentation de l'expression d'ARNm de l'élafine comparé à des explants cutanés sains<sup>392</sup>. Cette augmentation d'expression est corrélée à l'augmentation de l'expression de NOD2. En effet, il a été décrit des mutations NOD2 dans des cas familiaux d'HS ainsi que dans des maladies auto-inflammatoires associées à l'HS, en particulier le PASH syndrome. Cependant, ces

mêmes auteurs montrent, qu'à la suite d'un stimulus inflammatoire par PAM2CSK4 (agoniste des TLR 2-6) ou MDP (agoniste de NOD2), les résultats s'inversent avec une diminution de l'expression de l'élafine chez les kératinocytes provenant de tissus lésionnels de patients HS alors qu'elle augmente chez les kératinocytes sains<sup>392</sup>. L'élafine (SKALP) est un inhibiteur inductible de protéinase dérivé des KCs. Ce PAM est absent de l'épiderme humain normal, mais il est retrouvé dans un certain nombre de maladies inflammatoires de la peau, telles que le psoriasis. Il module la réponse inflammatoire cutanée en agissant sur le trafic des leucocytes et possède une activité antimicrobienne. Nos résultats montrent une diminution de l'expression de l'élafine, après induction d'une inflammation, que ce soit dans la lignée WT ou KO. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à l'état basal l'élafine ne soit pas exprimée et que pour la réponse inflammatoire nous ayons utilisé du LPS qui ne passe pas par la voie de signalisation NOD2 pouvant expliquer l'absence de l'induction d'expression de ce PAM.

A notre connaissance, aucune étude concernant la chémérine dans l'HS n'a été publiée. La chémérine est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la chimiotaxie des cellules immunitaires et la régulation de la différenciation et de la fonction des adipocytes. La chémérine est sécrétée en grandes quantités dans le tissu adipeux, mais aussi dans la peau, le côlon et les poumons<sup>394</sup>. La chémérine est exprimée par les KCs cependant son rôle biologique reste encore à déterminer. La chémérine humaine est sécrétée sous la forme d'un précurseur et doit subir une transformation protéolytique afin d'acquérir ces compétences de chimio attraction, en particulier, sur les DCs, les macrophages et les cellules NK<sup>395</sup>. Elle joue un rôle important dans l'angiogenèse et le métabolisme et stimule les macrophages à sécréter des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Il a été montré dans les MICI, que le taux sérique de chémérine est significativement plus élevé que les témoins<sup>395</sup>. Il a également été mis en évidence que le niveau de chémérine est corrélé à la gravité de la maladie de Crohn<sup>395</sup>. Des taux sériques élevés de chémérine ont été observés dans le lupus érythémateux disséminé, le psoriasis<sup>396</sup>, le diabète de type 2 et certains cancers ; son taux est en corrélation avec la gravité de l'inflammation<sup>395</sup>. La plupart des études mettent en évidence le rôle pro-inflammatoire de la chémérine, mais il a été montré qu'elle possède également des effets anti-inflammatoires notamment en réduisant la migration transépithéliale des neutrophiles et en bloquant la production de médiateurs inflammatoires par les macrophages en réponse à l'IFN $\gamma$  et au LPS. La chémérine peut donc contribuer à la suppression de la réponse

inflammatoire aiguë. Dans nos lignées HaCat WT et KO, le taux d'expression de chémérine est diminué, en condition inflammatoire, comparé aux HaCaT WT contrôle. Il serait intéressant de doser cette protéine, à partir du sérum de patients atteints d'HS, afin de vérifier si comme pour les MICI, il pourrait avoir une corrélation avec le niveau de sévérité de l'inflammation.

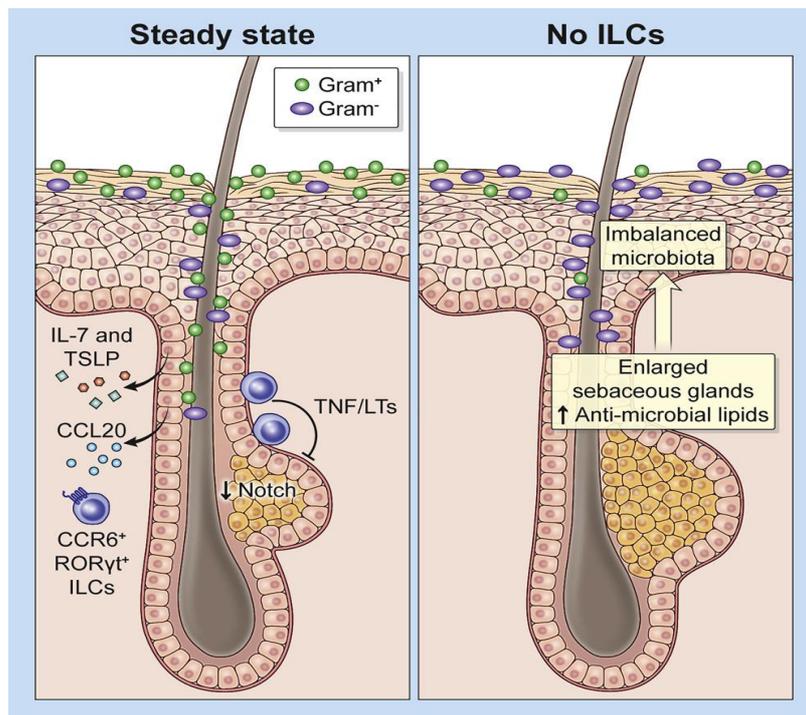
En conclusion, nous mettons en évidence, à partir de nos modèles *in vitro*, une différence de production de PAMs sur notre lignée KO par rapport à la lignée WT. En effet, nous montrons dans notre lignée HaCaT KO, une augmentation d'expression de certains PAMs, notamment LL-37, hBD-2, hBD-3, S100A7, S110A8 et S100A9, leurs expressions sont davantage accentuées lors de l'induction d'une inflammation, en comparaison à la lignée HaCaT sauvage. Ces peptides ont montré un rôle dans la réponse inflammatoire et pour certains d'entre eux une action sur la prolifération kératinocytaire, ils pourraient donc être néfaste en cas de surexpression. Cependant, dans l'HS, il a été montré que l'altération de la voie NOTCH réduit la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en lymphocytes T<sub>H</sub>22. Cela ayant pour conséquence une diminution de production d'IL-22 au sein des lésions d'HS qui est associée à un déficit partiel de production de PAMs<sup>213,331</sup>. Nos premières données devront donc être confirmées par l'analyse du sérum et d'explants cutanés lésionnels issus de patients HS grâce à la mise en place de l'étude clinique ImoHS. Nous nous intéressons aux PAMs dans l'idée d'optimiser l'effet de la PDT en l'associant dans un second temps à un dispositif de libération de PAMs afin d'optimiser les effets antimicrobiens mais également les capacités de cicatrisation au sein des lésions d'HS. Il est cependant important d'obtenir plus de données quand à la surexpression ou l'altération des PAMs dans l'HS et leur rôle dans la pathogenèse de cette maladie, puisqu'en effet il a été décrit un potentiel rôle aggravant des PAMs dans la réponse inflammatoire.

## **F. Les ILCs : nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'HS**

Nous avons voulu déterminer la présence et le rôle des ILCs dans l'HS, au vu de leurs localisations tissulaires, de leurs fonctions et de leurs implications dans d'autres dermatoses inflammatoires, en particulier, le psoriasis<sup>192,193,397</sup>. Nous avons donc mis au point une stratégie d'analyse des ILCs à partir des PBMCs, par la réalisation d'un immunophénotypage à partir du sang de donneur sain. Comme attendu, malgré un enrichissement pan-ILCs du prélèvement, la fréquence des ILCs

dans le compartiment périphérique reste rare de l'ordre du 1%. Cependant, l'analyse de ces cellules est nécessaire dans l'HS, car à notre connaissance, une seule équipe a étudié le rôle de ces cellules dans la physiopathologie de l'HS au moment de l'écriture de cette thèse. Cette étude a donc été la première à établir l'immunophénotypage des sous-ensembles d'ILCs au sein des PBMCs et dans la peau de patients atteints d'HS<sup>398</sup>. Concernant les sous-groupes, il est retrouvé des fréquences significativement élevées d'ILC3, mais pas d'ILC1, dans la peau non lésionnelle par rapport à la peau lésionnelle des patients atteints d'HS<sup>398</sup>. L'enrichissement d'ILC3 dans la peau non lésionnelle suggère que ces cellules pourraient jouer un rôle dans la phase précoce de la réponse inflammatoire et de la formation lésionnelle des patients HS. Il a été démontré que les ILC3 produisent de l'IL-22 et de l'IL-17 dans la peau, après avoir été activées par l'IL-1 et l'IL-23<sup>193</sup>. Les ILC3 pourraient jouer un rôle de médiateur dans la phase initiale de l'inflammation cutanée dans l'HS, qui serait dans un second temps, soutenu par une réponse adaptative à médiation T<sub>H</sub>, avec l'expression de cytokines dérivées de la voie T<sub>H</sub>17 et T<sub>H</sub>1. La persistance des ILCs dans la peau nécessite la présence d'IL-7 et de la TSLP. Les ILCs expriment le CCR6, ainsi lors d'une agression cutanée l'expression de CCL20 par les cellules immunitaires permet la migration des ILCs sur le site d'inflammation. Les ILC3 (ILC ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) expriment des ligands du récepteur au TNF- $\alpha$  et des lymphotoxines, qui limitent ainsi la croissance des sébocytes en réprimant la voie de signalisation Notch<sup>399,400</sup> (**Illustration 14**). Nous avons à plusieurs reprises décrit l'association entre l'altération de la signalisation Notch et la pathogenèse de l'HS. Il a été constaté que les glandes sébacées sont réduites dans les follicules pileux de la peau non lésionnelle des patients atteints d'HS<sup>401</sup>. Les auteurs émettent l'hypothèse que les ILC3 pourraient contribuer à la pathogenèse de l'HS par la régulation de la voie de signalisation Notch<sup>398</sup>. En effet, la perte des ILCs peut entraîner une hyperplasie sébacée ainsi qu'une production accrue de PAMs ayant pour conséquence une restriction des communautés bactériennes commensales Gram + de la peau<sup>399</sup>. Ainsi, les signaux issus des cellules épidermiques permettent le maintien des ILCs résidant dans la peau qui régulent le microbiote par l'intermédiaire des glandes sébacées. Dans l'étude analysant les ILCs dans l'HS, les auteurs observent un taux d'ILCs plus élevé dans la peau non lésionnelle que dans la peau lésionnelle chez les patients<sup>398</sup>. La perte des ILCs au sein des lésions d'HS pourrait expliquer la dégradation de la symbiose entre l'hôte et les microbes favorisant ainsi l'amplification de la réponse inflammatoire et l'invasion par des bactéries pathogènes

Gram - dont la prévalence élevée est retrouvée dans les lésions les plus sévères d'HS (grade II et III de Hurley).



**Illustration 14.** Rôle des ILC3 résidents dans la symbiose hôte – microbiote cutané issu de l'article de Kobayashi et al<sup>399</sup>.

L'équipe de Petrasca et al. ont mis en évidence, à partir de prélèvements de sang issus de patients HS, que le traitement par anti-TNF- $\alpha$  affecte le nombre systémique d'ILC. Les patients atteints d'HS présentent un nombre significativement plus faible d'ILC dans le sang et un nombre plus élevé dans la peau par rapport aux témoins sains, cependant après traitement par anti-TNF- $\alpha$ , le nombre d'ILC dans le sang a été restauré au même niveau que les témoins<sup>398</sup>. Ces données sont différentes de ce qui est décrit dans d'autres dermatoses inflammatoires telles que le psoriasis, puisqu'il a été décrit une augmentation statistiquement significative de la fréquence des ILC3<sup>+</sup> circulants, chez des patients atteints de psoriasis par rapport aux individus sains<sup>192</sup>. Dans le psoriasis, le traitement par anti-TNF- $\alpha$  de ces patients a montré une corrélation entre la réponse thérapeutique, la diminution des lésions inflammatoires cutanées et la diminution du nombre d'ILC3<sup>+</sup> circulants<sup>192</sup>. Le rôle des ILCs dans l'homéostasie tissulaire et leur impact dans les pathologies inflammatoires n'est pas encore entièrement élucidé. Les données qui seront obtenues par l'immunophénotypage du sang issus de patients HS ainsi que l'analyse immunohistochimie des explants cutanés lésionnelles d'HS concernant cette population cellulaire seront très intéressantes pour avancer dans la compréhension de

ces acteurs dans la physiopathologie de l'HS.

## **G. Effets de la PDT sur notre modèle *in vitro* d'HS**

Nous avons observé, à partir de nos modèles *in vitro*, que la PDT au 5-ALA ne présente pas d'effet sur les lignées HaCaT WT et KO, au stade différencié, alors que nous notons une baisse de viabilité cellulaire chez nos HaCaT WT et KO, indifférenciés, à partir de 24 h de la réalisation de la PDT pour n'importe quelle concentration de 5-ALA utilisée. Une équipe a montré que l'ALA-PDT ne provoque pas d'apoptose sur le modèle *in vitro* HaCaT<sup>262</sup>. La même équipe a cependant observé que l'ALA-PDT est impliquée dans l'inhibition de la différenciation et de la prolifération des KCs induites par le facteur de croissance des fibroblastes 10 (FGF-10). De plus, l'induction de ROS intracellulaires par l'ALA-PDT peut bloquer la voie du récepteur 2 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR2b) qui permet la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  par les kératinocytes HaCaT<sup>262</sup>. Il a été montré que l'IL-1 $\alpha$  peut entraîner une hyperprolifération et une différenciation anormale des KCs infundibulaires dans les unités pilo-sébacées isolées *in vitro*<sup>262,402</sup>. D'après leurs données *in vitro*, les auteurs ont testé l'ALA-PDT sur des lésions d'acné, à partir d'un modèle animal de lapins, ils ont montré que l'ALA-PDT réduit l'hyperplasie épidermique et l'hyperkératose folliculaire<sup>262</sup>. Ces données pourraient donc expliquer pourquoi nos lignées HaCaT WT et KO indifférenciées sont plus sensibles aux effets de l'ALA-PDT que les HaCaT WT et KO différenciés, par le fait que les KCs basaux (indifférenciés) ont une capacité de prolifération plus importante. L'ALA-PDT en inhibant FGF-10 permet donc de réguler la différenciation et la prolifération des KCs<sup>262</sup>, en contrôlant indirectement la voie MAPK qui joue sur la prolifération cellulaire et l'expression des MMPs, la voie PI3K/Akt et la voie phospholipase Cg/PKC<sup>403</sup>. Ces données concernant les effets de l'ALA-PDT sont très intéressantes car elles agissent sur différents mécanismes également décrits et impliqués au sein des lésions d'HS. Une autre étude a montré que la prolifération et la différenciation des KCs étaient 2 paramètres pouvant influencer les effets de la PDT selon le photosensibilisateur choisi<sup>404</sup>. Une équipe a testé l'ALA-PDT, sur plusieurs modèles *in vitro* de KCs dont les HaCaT, où ils induisent la différenciation par l'ajout d'IFN- $\gamma$  et l'activation/prolifération par l'ajout d'EGF- $\alpha$ . Les auteurs montrent que l'ALA-PDT est plus efficace lorsqu'on active les KCs primaires<sup>404</sup>. Ceci est expliqué par le mécanisme du PS, car le 5-ALA est une prodrogue qui est métabolisée de manière plus importante dans les cellules activées et en prolifération, ainsi le PS s'accumule

dans les cellules métaboliquement actives. Ce mécanisme est utilisé pour le traitement des lésions cancéreuses et précancéreuses en dermatologie, ceci permettant de cibler l'action de l'ALA-PDT. Cependant, ils ne retrouvent pas de différence lors de l'induction de prolifération dans la lignée HaCaT<sup>404</sup>. L'absence de différence de l'activité de l'ALA-PDT sur la lignée HaCaT, dans cette étude, est liée au fait que les HaCaT sont cultivés dans du milieu calcique (1,7 mM) et sont donc à l'état différencié (couches suprabasales), alors que nos résultats montrent une susceptibilité plus importante de l'ALA-PDT, sur nos lignées HaCaT WT et KO, cultivées dans du milieu pauvre en calcium (0,03 mM) par rapport à nos lignées à l'état différencié. En effet, nos KCs indifférenciés représentent les KCs de la couche basale de l'épiderme, où l'activité de prolifération y est importante puisque permettant le renouvellement cutané, ce qui peut expliquer cette différence d'effet de l'ALA-PDT dans nos lignées HaCaT. Dans le cadre de l'HS, il existe une hyperplasie épidermique au niveau de l'infundibulum provoquant une occlusion folliculaire ainsi que le développement de cicatrices hypertrophiques, ce type de lésion pourrait bien répondre au traitement par ALA-PDT du fait d'une hyperprolifération kératinocytaire. Cependant, la faible absorption du 5-ALA au niveau épidermique limite l'effet de la PDT à la superficie de la peau. En effet, la pénétration cutanée du 5-ALA a été retrouvée à 1,5-2 mm maximum et la concentration semblait homogène sur l'ensemble de la zone traitée jusqu'à un maximum de 500  $\mu\text{m}$ <sup>405,406</sup>, alors que les lésions d'HS sont bien plus profondes touchant le derme et l'hypoderme<sup>271</sup>. Afin d'optimiser l'absorption du PS, il pourrait être intéressant de mettre en place un dispositif composé de microaiguilles solubles à base de polymère d'acide hyaluronique afin d'obtenir une délivrance transdermique du PS<sup>407,408</sup>.

Du fait de ce point limitant, nous avons voulu également tester la PDT en utilisant le BdM comme PS. Nous observons que la PDT au BdM est très efficace et rapide, avec une perte de viabilité chez les HaCaT KO indifférenciés et une diminution marquée de la viabilité cellulaire de plus de 50%, dès la concentration de 4  $\mu\text{M}$  de BdM, chez les HaCaT KO différenciés par rapport aux HaCaT WT, ces données sont observées juste après avoir réalisé l'illumination. Pour les HaCaT WT, indifférenciés et différenciés, les effets de la PDT au BdM sur la viabilité cellulaire sont observés uniquement à partir de la concentration de 8  $\mu\text{M}$  de BdM. Ces résultats sont très intéressants car il serait possible de limiter les effets de la PDT au BdM sur les KCs sains. Que ce soit pour les HaCaT WT et KO, les effets de la PDT au BdM semblent plus efficaces sur les KCs indifférenciés par rapport aux HaCaT différenciés. La génération des ROS est plus nocive sur les cellules métaboliquement actives qui ont

un niveau de stress oxydatif déjà élevé c'est pourquoi les cellules basales épidermiques y sont plus sensibles.

Une étude expérimentale a évalué la pénétration cutanée du BdM en solution (solution saline isotonique) à partir de biopsie cutanée en utilisant une méthode d'analyse numérique. Il a été montré que la solution du BdM pénètre dans les échantillons de peau par le derme alors que l'épiderme n'a pratiquement pas été coloré du fait de la difficulté de diffusion des solutions aqueuses à travers cette couche hydrophobe<sup>409</sup>. Les auteurs ont montré que le coefficient de diffusion du BdM est faible au sein du derme du fait d'interaction des ions du BdM avec les protéines tissulaires<sup>409</sup>. Il est cependant important de souligner que, dans cette étude, la solution de BdM a marqué l'hypoderme après 2 h d'incubation des explants cutanés avec le colorant. Il semblerait donc que l'utilisation du BdM puisse avoir une diffusion plus importante que celle du 5-ALA. Cependant, il est important d'étudier la méthode d'application du BdM du fait de l'absence de pénétration de l'épiderme. Comme nous l'évoquions antérieurement, l'utilisation de microaiguilles à base d'acide hyaluronique pour la diffusion transdermique du BdM semble intéressante pour s'affranchir du passage de l'épiderme<sup>407,408</sup>. Il est possible également d'étudier d'autres compositions du BdM, comme un hydrogel de BdM liposomal permettant d'améliorer la pénétration du PS à travers la peau, tout en diminuant leur absorption dans la circulation systémique<sup>410,411</sup>. L'hydrogel est une forme topique permettant d'avoir des propriétés hydrophobes/lipophiles. Cette forme a été utilisée notamment dans le traitement de l'acné par PDT, le BdM a bien été retrouvé au sein des glandes sébacées<sup>412</sup>. L'avantage du BdM par rapport au 5-ALA est qu'il y avait peu de diffusion du BdM aux tissus environnants limitant ainsi les effets secondaires sur le tissu sain. Le coût est également moins onéreux pour le BdM par rapport au 5-ALA. Par ailleurs, la réaction photochimique créée par le PDT peut éventuellement induire une immunomodulation et une cytotoxicité, le fait d'utiliser le BdM offre également une action antimicrobienne<sup>278,284</sup>.

En parallèle, des analyses de l'effet de la PDT sur nos modèles kératinocytaires, nous avons mis au point un dispositif d'illumination afin de pouvoir réaliser la PDT sur des explants cutanés de patients HS et de donneurs sains, dans le cadre de l'étude clinique ImoHS. Nous avons validé le dispositif, qui respecte d'une part une illumination exclusivement épidermique et d'autre part ne provoque pas de brûlure au niveau de l'épiderme et du derme, à différentes fluences testées.

## **PERSPECTIVES**

Nous avons pu obtenir et caractériser un modèle *in vitro* d'HS et obtenir des premières données de PDT au 5-ALA et au BdM sur nos lignées HaCaT. En parallèle, nous avons mis en place l'étude clinique ImoHS. Cette étude nous permettra d'obtenir des explants cutanés lésionnels et des prélèvements sanguins issus de patients atteints d'HS afin d'explorer l'inflammation locale et systémique. Nous avons dans ce contexte obtenu l'autorisation du CPP afin de pouvoir débiter les inclusions de l'étude clinique ImoHS. Par ailleurs, nous avons ajusté et testé notre dispositif d'illumination PDT sur notre modèle *ex vivo*, qui nous permettra d'analyser les effets de ce traitement, afin d'étudier les potentiels effets immunomodulateurs de la PDT et la profondeur de son action sur la peau. Nous avons également réalisé la stratégie d'analyse des sous-groupes d'ILCs à partir du sang périphérique de donneur sain. L'obtention de prélèvements sanguins issus de patients HS nous permettront d'analyser la fréquence de ces populations cellulaires dans cette maladie.

### **Collaborations du projet d'étude**

- Collaboration avec le Docteur M. BONIOTTO, chercheur au sein de l'unité U955, INSERM, Equipe 16, Créteil, pour l'obtention des lignées cellulaires HaCaT WT et mutée *NCSTN*<sup>-/-</sup>.
- Collaboration avec le Docteur J-F. QUINCHON, anatomopathologiste, Hôpital Saint-Vincent de Paul, pour l'expertise des relectures des coupes histologiques des explants cutanés.
- Collaboration avec l'équipe Physico-PDT de l'unité OncoThAI, Docteur A-S VIGNION, pour la mise en place du dispositif laser dans le cadre de la PDT sur nos modèles *in vitro* et *ex vivo*.

### **Encadrements durant le projet d'étude**

- Novembre 2021 – Juin 2023 : Encadrement de Monsieur Mel DIEDRO, **étudiant en master II Recherche Biologie-Santé**, sur le projet « Identification des modulations cicatricielles et des effets des peptides antimicrobiens sur la cicatrisation cellulaire dans un modèle *in vitro* de l'hydradénite suppurée », Inserm U1189 OncoThAI, Institut Biologie de Lille

- Février 2022 – Juillet 2022 : Encadrement de Monsieur Florian WATEL, **étudiant en master II Professionnel – Technologies interdisciplinaires pour le vivant**, sur le projet « Évaluation *in vitro* et *ex vivo* d'une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur la thérapie photodynamique dans l'Hidradénite suppurée », Inserm U1189 OncoThAI, Institut Biologie de Lille

## **Financements du projet d'étude**

Je tiens à remercier chaleureusement les institutions, les associations de patients et les laboratoires pharmaceutiques qui ont accordé une subvention ou un soutien financier à ce projet :

Obtention de l'Appel à projet interne GHICL 2021  
Obtention de l'Appel à soutien "Pré-maturation" 2021, Université de Lille  
Don pour l'aide à la recherche – Laboratoire Leo Pharma  
Don de l'Association de Patients – Solidarité Verneuil  
Don pour l'aide à la recherche – UCB laboratoire



## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2013 Dec;1833(12):3471–80.
2. Kyriiotou M, Huber M, Hohl D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the ‘fused genes’ family. *Exp Dermatol.* 2012 Sep;21(9):643–9.
3. Newton VL, Bradley RS, Seroul P, Cherel M, Griffiths CEM, Rawlings AV, et al. Novel approaches to characterize age-related remodelling of the dermal-epidermal junction in 2D, 3D and in vivo. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* 2017 May;23(2):131–48.
4. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016 Feb;25(2):92–8.
5. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol EJD.* 2002;12(4):390–9; quiz 400–1.
6. Adams M. Mathematical models of calcium and tight junctions in normal and reconstructed epidermis. 2015 [cited 2023 Oct 15]; Available from: <http://rgdoi.net/10.13140/2.1.4391.2486>
7. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol.* 1982 Nov;95(2 Pt 1):580–8.
8. Bovenschen HJ, Seyger MMB, Van de Kerkhof PCM. Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesional T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153(1):72–8.
9. Lee SE, Lee SH. Skin Barrier and Calcium. *Ann Dermatol.* 2018 Jun;30(3):265–75.
10. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983 Jul;81(1 Suppl):33s–40s.
11. Watt FM. Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J Cell Biol.* 1984 Jan;98(1):16–21.
12. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 1990 May;143(2):294–302.
13. Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol.* 1989 Sep;109(3):1207–17.
14. Hohl D, Lichti U, Breitreutz D, Steinert PM, Roop DR. Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *J Invest Dermatol.* 1991 Apr;96(4):414–8.
15. Dale BA, Scofield JA, Hennings H, Stanley JR, Yuspa SH. Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J Invest Dermatol.* 1983 Jul;81(1 Suppl):90s–5s.

16. Huff CA, Yuspa SH, Rosenthal D. Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. *J Biol Chem.* 1993 Jan 5;268(1):377–84.
17. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75–81.
18. Savagner P, Arnoux V. [Epithelio-mesenchymal transition and cutaneous wound healing]. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Dec;193(9):1981–91; discussion 1992.
19. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T, et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol.* 2005 Mar;202(3):858–66.
20. Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. 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.* 1996 Feb;132(3):381–97.
21. Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine.* 1996 Jul;8(7):548–56.
22. Zhao M. PTEN: a promising pharmacological target to enhance epithelial wound healing. *Br J Pharmacol.* 2007 Dec;152(8):1141–4.
23. Mangoni ML, McDermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol.* 2016 Mar;25(3):167–73.
24. Parnham A, Bousfield C. The influence of matrix metalloproteases and biofilm on chronic wound healing: a discussion. *Br J Community Nurs.* 2018 Mar 2;23(Sup3):S22–9.
25. Ardon CB, Prens EP, Fursted K, Ejaz RN, Shailes J, Jenssen H, et al. Biofilm production and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from Hidradenitis Suppurativa lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2019 Jan;33(1):170–7.
26. Ring H c., Bay L, Nilsson M, Kallenbach K, Miller I m., Saunte D m., et al. Bacterial biofilm in chronic lesions of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2017;176(4):993–1000.
27. Chung MG, Preda-Naumescu A, Yusuf N. Hidradenitis Suppurativa: Consequences of Microbiome Dysbiosis on Immune Dysregulation and Disease Severity. *Indian J Dermatol.* 2022;67(6):699–704.
28. Haidari H, Melguizo-Rodríguez L, Cowin AJ, Kopecki Z. Therapeutic potential of antimicrobial peptides for treatment of wound infection. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2023 Jan 1;324(1):C29–38.
29. Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Ogawa H. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp Dermatol.* 2017;26(11):989–98.
30. Su T, Qiu Y, Hua X, Ye B, Luo H, Liu D, et al. Novel Opportunity to Reverse Antibiotic Resistance: To Explore Traditional Chinese Medicine With Potential Activity Against Antibiotics-Resistance Bacteria. *Front Microbiol.* 2020;11:610070.
31. Yao Y, Frew JW, Thomsen SF, Ring HC. Antimicrobial peptides in hidradenitis suppurativa: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2022 Feb;186(2):236–44.

32. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Aug 3];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00281>
33. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2271–9.
34. Pinheiro da Silva F, Machado MCC. The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunol Lett*. 2017 Feb 1;182:57–60.
35. Di Domizio J, Pagnoni A, Huber M, Hohl D, Gilliet M. [The skin microbiota: a colossus steps into the spotlight]. *Rev Med Suisse*. 2016 Mar 30;12(512):660–4.
36. Šuler Baglama Š, Trčko K. Skin and gut microbiota dysbiosis in autoimmune and inflammatory skin diseases. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* [Internet]. 2022 [cited 2023 Nov 29];31(3). Available from: <http://acta-apa.mf.uni-lj.si/journals/acta-dermatovenerol-apa/papers/10.15570/actaapa.2022.16/actaapa.2022.16.pdf>
37. Guet-Revillet H, Domp Martin A, Join-Lambert O. [Skin microbiome: role in human health and skin inflammatory diseases]. *Rev Prat*. 2020 Jun;70(6):653–6.
38. Garg A, Neuren E, Cha D, Kirby JS, Ingram JR, Jemec GBE, et al. Evaluating patients' unmet needs in hidradenitis suppurativa: Results from the Global Survey Of Impact and Healthcare Needs (VOICE) Project. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Feb;82(2):366–76.
39. Bertolotti A, Sbidian E, Join-Lambert O, Bourgault-Villada I, Moyal-Barracco M, Perrot P, et al. Guidelines for the management of hidradenitis suppurativa: recommendations supported by the Centre of Evidence of the French Society of Dermatology. *Br J Dermatol*. 2021;184(5):963–5.
40. Zouboulis CC, Del Marmol V, Mrowietz U, Prens EP, Tzellos T, Jemec GBE. Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa: Criteria for Diagnosis, Severity Assessment, Classification and Disease Evaluation. *Dermatology*. 2015;231(2):184–90.
41. Revuz J. Évaluation clinique de la sévérité de l'hidradénite suppurée – maladie de Verneuil. *Ann Dermatol Vénérologie*. 2015 Dec;142(12):729–35.
42. Hurley HJ, Roenigk RK, Roenigk HH, Jr, eds. Axillary hyperhidrosis, apocrine bromhidrosis, hidradenitis suppurativa and familial benign pemphigus: surgical approach. In: *Dermatologic surgery: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, . 2nd ed.
43. Thorlacius L. Severity staging of hidradenitis suppurativa: is Hurley classification the answer? *Br J Dermatol*. 2019 Aug;181(2):243–4.
44. Canoui-Poitrine F, Revuz JE, Wolkenstein P, Viallette C, Gabison G, Pouget F, et al. Clinical characteristics of a series of 302 French patients with hidradenitis suppurativa, with an analysis of factors associated with disease severity. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Jul;61(1):51–7.
45. Sartorius K, Lapins J, Emtestam L, Jemec GBE. Suggestions for uniform outcome variables when reporting treatment effects in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2003 Jul;149(1):211–3.
46. Revuz J. [Modifications to the Sartorius score and instructions for evaluating the severity of suppurative hidradenitis]. *Ann Dermatol Venereol*. 2007 Feb;134(2):173–4.

47. Zouboulis CC, Tzellos T, Kyrgidis A, Jemec GBE, Bechara FG, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Development and validation of the International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4), a novel dynamic scoring system to assess HS severity. *Br J Dermatol*. 2017 Nov;177(5):1401–9.
48. van Straalen KR, Tzellos T, Alavi A, Benhadou F, Cuenca-Barrales C, Daxhelet M, et al. External Validation of the IHS4-55 in a European Antibiotic-Treated Hidradenitis Suppurativa Cohort. *Dermatol Basel Switz*. 2023;239(3):362–7.
49. Kimball AB, Kerdel F, Adams D, Mrowietz U, Gelfand JM, Gniadecki R, et al. Adalimumab for the treatment of moderate to severe Hidradenitis suppurativa: a parallel randomized trial. *Ann Intern Med*. 2012 Dec 18;157(12):846–55.
50. Kimball AB, Sobell JM, Zouboulis CC, Gu Y, Williams DA, Sundaram M, et al. HiSCR (Hidradenitis Suppurativa Clinical Response): a novel clinical endpoint to evaluate therapeutic outcomes in patients with hidradenitis suppurativa from the placebo-controlled portion of a phase 2 adalimumab study. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2016 Jun;30(6):989–94.
51. Wortsman X, Moreno C, Soto R, Arellano J, Pezo C, Wortsman J. Ultrasound in-depth characterization and staging of hidradenitis suppurativa. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2013 Dec;39(12):1835–42.
52. Marasca C, Marasca D, Megna M, Annunziata MC, Fabbrocini G. Ultrasound: an indispensable tool to evaluate the outcome of surgical approaches in patients affected by hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2020 Aug;34(8):e413–4.
53. Kirby JS, Thorlacius L, Villumsen B, Ingram JR, Garg A, Christensen KB, et al. The Hidradenitis Suppurativa Quality of Life (HiSQOL) score: development and validation of a measure for clinical trials. *Br J Dermatol*. 2020 Aug;183(2):340–8.
54. Marrón SE, Gómez-Barrera M, Tomás-Aragonés L, Díaz Díaz RM, Vilarrasa Rull E, Madrid Álvarez MB, et al. Development and Preliminary Validation of the HSQoL-24 Tool to Assess Quality of Life in Patients With Hidradenitis Suppurativa. *Actas Dermosifiliogr*. 2019 Sep;110(7):554–60.
55. Kimball AB, Sundaram M, Banderas B, Foley C, Shields AL. Development and initial psychometric evaluation of patient-reported outcome questionnaires to evaluate the symptoms and impact of hidradenitis suppurativa. *J Dermatol Treat*. 2018 Mar;29(2):152–64.
56. Peris K, Lo Schiavo A, Fabbrocini G, Dini V, Patrizi A, Fusano M, et al. HIDRADisk: validation of an innovative visual tool to assess the burden of hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2019 Apr;33(4):766–73.
57. Frew JW, Hawkes JE, Sullivan-Whalen M, Gilleaudeau P, Krueger JG. Inter-rater reliability of phenotypes and exploratory genotype–phenotype analysis in inherited hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2019 Sep;181(3):566–71.
58. Canoui-Poitrine F, Le Thuaut A, Revuz JE, Viallette C, Gabison G, Poli F, et al. Identification of Three Hidradenitis Suppurativa Phenotypes: Latent Class Analysis of a Cross-Sectional Study. *J Invest Dermatol*. 2013 Jun;133(6):1506–11.
59. van der Zee HH, Jemec GBE. New insights into the diagnosis of hidradenitis suppurativa: Clinical presentations and phenotypes. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Nov;73(5 Suppl 1):S23-26.

60. Martorell A, Jfri A, Koster SBL, Gomez-Palencia P, Solera M, Alfaro-Rubio A, et al. Defining hidradenitis suppurativa phenotypes based on the elementary lesion pattern: results of a prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Jun;34(6):1309–18.
61. Alavi A, Piguet V. Genotype–phenotype correlation in inherited hidradenitis suppurativa: one step forward, one step back. *Br J Dermatol*. 2019;181(3):443–4.
62. Shlyankevich J, Chen AJ, Kim GE, Kimball AB. Hidradenitis suppurativa is a systemic disease with substantial comorbidity burden: A chart-verified case-control analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Dec;71(6):1144–50.
63. Reddy S, Strunk A, Garg A. Comparative Overall Comorbidity Burden Among Patients With Hidradenitis Suppurativa. *JAMA Dermatol*. 2019 Jul 1;155(7):797.
64. Garg A, Malviya N, Strunk A, Wright S, Alavi A, Alhusayen R, et al. Comorbidity screening in hidradenitis suppurativa: Evidence-based recommendations from the US and Canadian Hidradenitis Suppurativa Foundations. *J Am Acad Dermatol*. 2022 May;86(5):1092–101.
65. Tiri H, Jokelainen J, Timonen M, Tasanen K, Huilaja L. Substantially reduced life expectancy in patients with hidradenitis suppurativa: a Finnish nationwide registry study. *Br J Dermatol*. 2019 Jun;180(6):1543–4.
66. Xu H, Xiao X, He Y, Zhang X, Li C, Mao Q, et al. Increased serum interleukin-6 levels in patients with hidradenitis suppurativa. *Postepy Dermatol Alergol*. 2017 Feb;34(1):82–4.
67. Garg A, Hundal J, Strunk A. Overall and Subgroup Prevalence of Crohn Disease Among Patients With Hidradenitis Suppurativa: A Population-Based Analysis in the United States. *JAMA Dermatol*. 2018 Jul 1;154(7):814–8.
68. Lee JH, Kwon HS, Jung HM, Kim GM, Bae JM. Prevalence and comorbidities associated with hidradenitis suppurativa in Korea: a nationwide population-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Oct;32(10):1784–90.
69. Farzanfar D, Dowlati Y, French LE, Lowes MA, Alavi A. Inflammation: A Contributor to Depressive Comorbidity in Inflammatory Skin Disease. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31(5):246–51.
70. Garg A, Papagermanos V, Midura M, Strunk A, Merson J. Opioid, alcohol, and cannabis misuse among patients with hidradenitis suppurativa: A population-based analysis in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 2018 Sep;79(3):495-500.e1.
71. Deckers IE, Kimball AB. The Handicap of Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin*. 2016 Jan;34(1):17–22.
72. Alavi A, Farzanfar D, Rogalska T, Lowes MA, Chavoshi S. Quality of life and sexual health in patients with hidradenitis suppurativa. *Int J Womens Dermatol*. 2018 Jun;4(2):74–9.
73. Machado MO, Stergiopoulos V, Maes M, Kurdyak PA, Lin PY, Wang LJ, et al. Depression and Anxiety in Adults With Hidradenitis Suppurativa: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2019 Aug 1;155(8):939–45.
74. Wright S, Strunk A, Garg A. Prevalence of depression among children, adolescents, and adults with hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 2022 Jan;86(1):55–60.
75. Tannenbaum R, Strunk A, Garg A. Overall and subgroup prevalence of pyoderma gangrenosum among patients with hidradenitis suppurativa: A population-based analysis in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jun;80(6):1533–7.

76. Marzano AV, Borghi A, Wallach D, Cugno M. A Comprehensive Review of Neutrophilic Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018 Feb;54(1):114–30.
77. Poizeau F, Hotz C, Mircher C, Rebillat AS, Chosidow O, Ravel A, et al. Prévalence et caractéristiques de l'hidradénite suppurée dans la trisomie 21 : une étude prospective sur 783 patients. *Ann Dermatol Vénéréologie*. 2017 Dec;144(12):S131.
78. Gouillon L, Guillem P, Dickinson-Blok J, Delage M, Benhadou F, Siham M, et al. Association maladie de Verneuil et trisomie 21 – Étude internationale multicentrique de 56 cas. *Ann Dermatol Vénéréologie*. 2017 Dec;144(12):S131–2.
79. Scheinfeld N. Diseases associated with hidranitis suppurativa: part 2 of a series on hidradenitis. *Dermatol Online J [Internet]*. 2013 [cited 2023 May 25];19(6). Available from: <https://escholarship.org/uc/item/5pc6t287>
80. Mathew L, Goldenberg SD, Griffin N, Ferguson FJ, De La Roche HM, Hay I, et al. The management of osteomyelitis in hidradenitis suppurativa. *Int J Dermatol*. 2023 Feb 2;ijd.16603.
81. Micieli R, Alavi A. Lymphedema in patients with hidradenitis suppurativa: a systematic review of published literature. *Int J Dermatol*. 2018 Dec;57(12):1471–80.
82. Deckers IE, van der Zee HH, Prens EP. Severe fatigue based on anaemia in patients with hidradenitis suppurativa: report of two cases and a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2016 Jan;30(1):174–5.
83. Helvacı Ö, Güz G, Adışen E, Cevher SK, Güz G. Hidradenitis Suppurativa: a lesser-known cause of AA amyloidosis. *Hippokratia*. 2020;24(1):33–7.
84. Sabat R, Jemec GBE, Matusiak Ł, Kimball AB, Prens E, Wolk K. Hidradenitis suppurativa. *Nat Rev Dis Primer*. 2020 Dec;6(1):18.
85. Chapman S, Delgadillo Iii D, Barber C, Khachemoune A. Cutaneous squamous cell carcinoma complicating hidradenitis suppurativa: a review of the prevalence, pathogenesis, and treatment of this dreaded complication. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat [Internet]*. 2018 [cited 2023 May 25];27(1). Available from: <http://acta-apa.mf.uni-lj.si/journals/acta-dermatovenerol-apa/papers/10.15570/actaapa.2018.5/actaapa.2018.5.pdf>
86. Posso-De Los Rios CJ, Sarfo A, Ghias M, Alhusayen R, Hamzavi I, Lowes MA, et al. Proceeding report of the third symposium on Hidradenitis Suppurativa advances ( SHSA ) 2018. *Exp Dermatol*. 2019 Jul;28(7):769–75.
87. Ingram JR, Jenkins-Jones S, Knipe DW, Morgan CLI, Cannings-John R, Piguet V. Population-based Clinical Practice Research Datalink study using algorithm modelling to identify the true burden of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2018 Apr;178(4):917–24.
88. Shalom G, Cohen AD. The epidemiology of hidradenitis suppurativa: what do we know? *Br J Dermatol*. 2019 Apr;180(4):712–3.
89. Garg A, Kirby JS, Lavian J, Lin G, Strunk A. Sex- and Age-Adjusted Population Analysis of Prevalence Estimates for Hidradenitis Suppurativa in the United States. *JAMA Dermatol*. 2017 Aug 1;153(8):760–4.
90. Loget J, Saint-Martin C, Guillem P, Kanagaratnam L, Becherel PA, Nassif A, et al. Errance médicale des patients atteints d'hidradénite suppurée : un problème majeur et

- persistant. Étude « R-ENS Verneuil ». *Ann Dermatol Vénéréologie*. 2018 May;145(5):331–8.
91. Garg A, Lavian J, Strunk A. Low Utilization of the Dermatology Ambulatory Encounter among Patients with Hidradenitis Suppurativa: A Population-Based Retrospective Cohort Analysis in the USA. *Dermatol Basel Switz*. 2017;233(5):396–8.
  92. Wolk K, Join-Lambert O, Sabat R. Aetiology and pathogenesis of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2020 Dec;183(6):999–1010.
  93. Kelly G, Prens EP. Inflammatory Mechanisms in Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin*. 2016 Jan;34(1):51–8.
  94. Micheletti R. Tobacco smoking and hidradenitis suppurativa: associated disease and an important modifiable risk factor. *Br J Dermatol*. 2018 Mar;178(3):587–8.
  95. Goldberg SR, Strober BE, Payette MJ. Hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 2020 May;82(5):1045–58.
  96. Garg A, Papagermanos V, Midura M, Strunk A. Incidence of hidradenitis suppurativa among tobacco smokers: a population-based retrospective analysis in the U.S.A. *Br J Dermatol*. 2018 Mar;178(3):709–14.
  97. Sartorius K, Emtestam L, Jemec GBE, Lapins J. Objective scoring of hidradenitis suppurativa reflecting the role of tobacco smoking and obesity. *Br J Dermatol*. 2009 Oct;161(4):831–9.
  98. Garg A, Besen J, Legler A, Lam CS. Factors Associated With Point-of-Care Treatment Decisions for Hidradenitis Suppurativa. *JAMA Dermatol*. 2016 May 1;152(5):553–7.
  99. Midgette B, Strunk A, Akilov O, Alavi A, Ardon C, Bechara FG, et al. Factors associated with treatment satisfaction in patients with hidradenitis suppurativa: results from the Global VOICE project. *Br J Dermatol*. 2022 Dec 1;187(6):927–35.
  100. Denny G, Anadkat MJ. The effect of smoking and age on the response to first-line therapy of hidradenitis suppurativa: An institutional retrospective cohort study. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jan;76(1):54–9.
  101. Kromann CB, Deckers IE, Esmann S, Boer J, Prens EP, Jemec GBE. Risk factors, clinical course and long-term prognosis in hidradenitis suppurativa: a cross-sectional study. *Br J Dermatol*. 2014 Oct;171(4):819–24.
  102. Wright S, Strunk A, Garg A. Trends in body mass index before and after diagnosis of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2021 Jul;185(1):74–9.
  103. Jørgensen AHR, Aarestrup J, Baker JL, Thomsen SF. Association of Birth Weight, Childhood Body Mass Index, and Height With Risk of Hidradenitis Suppurativa. *JAMA Dermatol*. 2020 Jul 1;156(7):746–53.
  104. Kjaersgaard Andersen R, Loft IC, Hansen T, Hjalgrim H, Rostgaard K, Banasik K, et al. Incidence and remission rates of self-reported hidradenitis suppurativa - A prospective cohort study conducted in Danish blood donors. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2022 May;36(5):717–25.
  105. Pescitelli L, Ricceri F, Prignano F. Hidradenitis suppurativa and associated diseases. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr*. 2018 Jun;153(3 Suppl 2):8–17.

106. Theut Riis P, Saunte DM, Benhadou F, del Marmol V, Guillem P, El-Domyati M, et al. Low and high body mass index in hidradenitis suppurativa patients-different subtypes? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Feb;32(2):307–12.
107. Nosrati A, Torpey ME, Shokrian N, Ch'en PY, Andriano TM, Benesh G, et al. Adalimumab efficacy is inversely correlated with body mass index (BMI) in hidradenitis suppurativa. *Int J Dermatol*. 2022 Dec 29;
108. Frew JW, Singh N, Jiang CS, Vaughan R, Krueger JG. The Impact of Body Mass Index Upon the Efficacy of Adalimumab in Hidradenitis Suppurativa. *Front Med*. 2021;8:603281.
109. Iannone M, Janowska A, Bartolomei G, Puntoni M, Oranges T, Romanelli M, et al. Systemic antibiotics in hidradenitis suppurativa: efficacy and effects of body mass index and smoking pack-year on the response to therapy. *Dermatol Ther*. 2021 May;34(3):e14919.
110. Macklis PC, Tyler K, Kaffenberger J, Kwatra S, Kaffenberger BH. Lifestyle modifications associated with symptom improvement in hidradenitis suppurativa patients. *Arch Dermatol Res*. 2022 Apr;314(3):293–300.
111. Yamanaka-Takaichi M, Revankar R, Shih T, Gall M, Hsiao JL, Shi VY, et al. Expert consensus on priority research gaps in dietary and lifestyle factors in hidradenitis suppurativa: a Delphi consensus study. *Arch Dermatol Res [Internet]*. 2023 Mar 23 [cited 2023 May 4]; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00403-023-02610-9>
112. Gallagher C, Kirthi S, Burke T, O'Shea D, Tobin AM. Remission of hidradenitis suppurativa after bariatric surgery. *JAAD Case Rep*. 2017 Sep;3(5):436–7.
113. Mintoff D, Benhadou F, Pace NP, Frew JW. Metabolic syndrome and hidradenitis suppurativa: epidemiological, molecular, and therapeutic aspects. *Int J Dermatol*. 2022 Oct;61(10):1175–86.
114. Dajnoki Z, Somogyi O, Medgyesi B, Jenei A, Szabó L, Gáspár K, et al. Primary alterations during the development of hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2022 Mar;36(3):462–71.
115. Ikeda K, Morizane S, Akagi T, Hiramatsu-Asano S, Tachibana K, Yahagi A, et al. Obesity and Dyslipidemia Synergistically Exacerbate Psoriatic Skin Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 13;23(8):4312.
116. Ingram JR. The epidemiology of hidradenitis suppurativa\*. *Br J Dermatol*. 2020 Dec;183(6):990–8.
117. Zouboulis CC, Benhadou F, Byrd AS, Chandran NS, Giamarellos-Bourboulis EJ, Fabbrocini G, et al. What causes hidradenitis suppurativa ?-15 years after. *Exp Dermatol*. 2020 Dec;29(12):1154–70.
118. Riis PT, Ring HC, Themstrup L, Jemec GB. The Role of Androgens and Estrogens in Hidradenitis Suppurativa - A Systematic Review. *Acta Dermatovenerol Croat ADC*. 2016 Dec;24(4):239–49.
119. Seivright JR, Villa NM, Grogan T, Parvataneni RK, Thompson AM, Shi VY, et al. Impact of Pregnancy on Hidradenitis Suppurativa Disease Course: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dermatol Basel Switz*. 2022;238(2):260–6.
120. Karagiannidis I, Nikolakis G, Sabat R, Zouboulis CC. Hidradenitis suppurativa/Acne inversa: an endocrine skin disorder? *Rev Endocr Metab Disord*. 2016 Sep;17(3):335–41.

121. Karagaiah P, Daveluy S, Ortega-Loayza A, Gulliver W, Szepletowski J, Grabbe S, et al. Update on Hormonal Therapy in Hidradenitis Suppurativa. *J Drugs Dermatol JDD*. 2023 Apr 1;22(4):369–74.
122. Nikolakis G, Kyrgidis A, Zouboulis CC. Is There a Role for Antiandrogen Therapy for Hidradenitis Suppurativa? A Systematic Review of Published Data. *Am J Clin Dermatol*. 2019 Aug;20(4):503–13.
123. Nomura T. Hidradenitis Suppurativa as a Potential Subtype of Autoinflammatory Keratinization Disease. *Front Immunol*. 2020;11:847.
124. Frew JW, Vekic DA, Woods J, Cains GD. A systematic review and critical evaluation of reported pathogenic sequence variants in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2017 Oct;177(4):987–98.
125. Wang B, Yang W, Wen W, Sun J, Su B, Liu B, et al. Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa. *Science*. 2010 Nov 19;330(6007):1065.
126. Xiao X, He Y, Li C, Zhang X, Xu H, Wang B. Nicastrin mutations in familial acne inversa impact keratinocyte proliferation and differentiation through the Notch and phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathways. *Br J Dermatol*. 2016;174(3):522–32.
127. Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, et al. Nicastrin Functions as a  $\gamma$ -Secretase-Substrate Receptor. *Cell*. 2005 Aug;122(3):435–47.
128. Jorissen E, De Strooper B. Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr Top Dev Biol*. 2010;92:201–30.
129. Shirotani K, Edbauer D, Capell A, Schmitz J, Steiner H, Haass C. Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):16474–7.
130. Yang J, Wang L, Huang Y, Liu K, Lu C, Si N, et al. Keratin 5-Cre-driven deletion of Ncstn in an acne inversa-like mouse model leads to a markedly increased IL-36a and Sprr2 expression. *Front Med*. 2020 Jun;14(3):305–17.
131. Gallenstein N, Tichy L, Weigand MA, Schenz J. Notch Signaling in Acute Inflammation and Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 9;24(4):3458.
132. Pink AE, Simpson MA, Desai N, Dafou D, Hills A, Mortimer P, et al. Mutations in the  $\gamma$ -Secretase Genes NCSTN, PSENEN, and PSEN1 Underlie Rare Forms of Hidradenitis Suppurativa (Acne Inversa). *J Invest Dermatol*. 2012 Oct 1;132(10):2459–61.
133. O'Sullivan Coyne G, Woodring TS, Lee CCR, Chen AP, Kong HH. Hidradenitis Suppurativa-Like Lesions Associated with Pharmacologic Inhibition of Gamma-Secretase. *J Invest Dermatol*. 2018 Apr;138(4):979–81.
134. Zeng C, Shao Z, Wei Z, Yao J, Wang W, Yin L, et al. The NOTCH-HES-1 axis is involved in promoting Th22 cell differentiation. *Cell Mol Biol Lett*. 2021 Dec;26(1):7.
135. Melnik BC, Plewig G. Impaired Notch-MKP-1 signalling in hidradenitis suppurativa: an approach to pathogenesis by evidence from translational biology. *Exp Dermatol*. 2013;22(3):172–7.
136. Shang Y, Smith S, Hu X. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein Cell*. 2016 Mar;7(3):159–74.

137. Golub R. The Notch signaling pathway involvement in innate lymphoid cell biology. *Biomed J*. 2021 Apr 1;44(2):133–43.
138. Alam MS, Maekawa Y, Kitamura A, Tanigaki K, Yoshimoto T, Kishihara K, et al. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 30;107(13):5943–8.
139. Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, et al. gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell*. 2004 Nov;7(5):731–43.
140. Zouboulis CC, Desai N, Emtestam L, Hunger RE, Ioannides D, Juhász I, et al. European S1 guideline for the treatment of hidradenitis suppurativa/acne inversa. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2015 Apr;29(4):619–44.
141. Ingram JR, Wood M, John B, Butler R, Anstey AV. Absence of pathogenic  $\gamma$ -secretase mutations in a South Wales cohort of familial and sporadic hidradenitis suppurativa (acne inversa). *Br J Dermatol*. 2013 Apr;168(4):874–6.
142. Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull KM, Wood G, Wise CA, et al. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13501–6.
143. İlgen U, Yayla ME, Eyüpoğlu Ş, Karahan İ. Hidradenitis suppurativa and Mediterranean fever gene mutations. *JAAD Case Rep*. 2019 Sep;5(9):792–3.
144. Alikhan A, Sayed C, Alavi A, Alhusayen R, Brassard A, Burkhart C, et al. North American clinical management guidelines for hidradenitis suppurativa: A publication from the United States and Canadian Hidradenitis Suppurativa Foundations: Part II: Topical, intralesional, and systemic medical management. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jul;81(1):91–101.
145. Bettoli V, Naldi L, Cazzaniga S, Zauli S, Atzori L, Borghi A, et al. Overweight, diabetes and disease duration influence clinical severity in hidradenitis suppurativa-acne inversa: evidence from the national Italian registry. *Br J Dermatol*. 2016 Jan;174(1):195–7.
146. Barrea L, Fabbrocini G, Annunziata G, Muscogiuri G, Donnarumma M, Marasca C, et al. Role of Nutrition and Adherence to the Mediterranean Diet in the Multidisciplinary Approach of Hidradenitis Suppurativa: Evaluation of Nutritional Status and Its Association with Severity of Disease. *Nutrients*. 2018 Dec 28;11(1):57.
147. Brocard A, Dréno B. Innate immunity: a crucial target for zinc in the treatment of inflammatory dermatosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2011 Oct;25(10):1146–52.
148. Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B. Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur J Dermatol EJD*. 2007;17(6):492–6.
149. Hessam S, Sand M, Meier NM, Gambichler T, Scholl L, Bechara FG. Combination of oral zinc gluconate and topical triclosan: An anti-inflammatory treatment modality for initial hidradenitis suppurativa. *J Dermatol Sci*. 2016 Nov;84(2):197–202.
150. Join-Lambert O, Ribadeau-Dumas F, Jullien V, Kitzis MD, Jais JP, Coignard-Biehler H, et al. Dramatic reduction of clindamycin plasma concentration in hidradenitis suppurativa patients treated with the rifampin-clindamycin combination. *Eur J Dermatol EJD*. 2014;24(1):94–5.

151. Kimball AB, Okun MM, Williams DA, Gottlieb AB, Papp KA, Zouboulis CC, et al. Two Phase 3 Trials of Adalimumab for Hidradenitis Suppurativa. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):422–34.
152. Ghias MH, Hyde MJ, Tomalin LE, Morgan BP, Alavi A, Lowes MA, et al. Role of the Complement Pathway in Inflammatory Skin Diseases: A Focus on Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol*. 2020 Mar;140(3):531-536.e1.
153. Kimball AB, Jemec GBE, Alavi A, Reguiai Z, Gottlieb AB, Bechara FG, et al. Secukinumab in moderate-to-severe hidradenitis suppurativa (SUNSHINE and SUNRISE): week 16 and week 52 results of two identical, multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind phase 3 trials. *Lancet Lond Engl*. 2023 Mar 4;401(10378):747–61.
154. Glatt S, Jemec GBE, Forman S, Sayed C, Schmieder G, Weisman J, et al. Efficacy and Safety of Bimekizumab in Moderate to Severe Hidradenitis Suppurativa: A Phase 2, Double-blind, Placebo-Controlled Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 2021 Nov 1;157(11):1279–88.
155. van der Zee HH, Longcore M, Geng Z, Garg A. Weekly adalimumab treatment decreased disease flare in hidradenitis suppurativa over 36 weeks: integrated results from the phase 3 PIONEER trials. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2020 May;34(5):1050–6.
156. Orenstein LAV, Wright S, Strunk A, Garg A. Low prescription of tumor necrosis alpha inhibitors in hidradenitis suppurativa: A cross-sectional analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2021 May;84(5):1399–401.
157. Tzanetakou V, Kanni T, Giatrakou S, Katoulis A, Papadavid E, Netea MG, et al. Safety and Efficacy of Anakinra in Severe Hidradenitis Suppurativa: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 2016 Jan;152(1):52–9.
158. Blok JL, Li K, Brodmerkel C, Horvátovich P, Jonkman MF, Horváth B. Ustekinumab in hidradenitis suppurativa: clinical results and a search for potential biomarkers in serum. *Br J Dermatol*. 2016 Apr;174(4):839–46.
159. Hazen PG, Hazen BP. Hidradenitis suppurativa: successful treatment using carbon dioxide laser excision and marsupialization. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2010 Feb;36(2):208–13.
160. Madan V, Hindle E, Hussain W, August PJ. Outcomes of treatment of nine cases of recalcitrant severe hidradenitis suppurativa with carbon dioxide laser. *Br J Dermatol*. 2008 Dec;159(6):1309–14.
161. Krakowski AC, Admani S, Uebelhoer NS, Eichenfield LF, Shumaker PR. Residual scarring from hidradenitis suppurativa: fractionated CO2 laser as a novel and noninvasive approach. *Pediatrics*. 2014 Jan;133(1):e248-251.
162. Tierney E, Mahmoud BH, Hexsel C, Ozog D, Hamzavi I. Randomized control trial for the treatment of hidradenitis suppurativa with a neodymium-doped yttrium aluminium garnet laser. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2009 Aug;35(8):1188–98.
163. Xu LY, Wright DR, Mahmoud BH, Ozog DM, Mehregan DA, Hamzavi IH. Histopathologic study of hidradenitis suppurativa following long-pulsed 1064-nm Nd:YAG laser treatment. *Arch Dermatol*. 2011 Jan;147(1):21–8.
164. Morgan WP, Hughes LE. The distribution, size and density of the apocrine glands in hidradenitis suppurativa. *Br J Surg*. 1979 Dec;66(12):853–6.

165. Bergant Suhodolčan A, Luzar B, Kecelj Leskovec N. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2, but not COX-2 serve as additional predictors for chronic venous ulcer healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2021 Sep;29(5):725–31.
166. Sanchez J, Le Jan S, Muller C, François C, Renard Y, Durlach A, et al. Matrix remodelling and MMP expression/activation are associated with hidradenitis suppurativa skin inflammation. *Exp Dermatol*. 2019 May;28(5):593–600.
167. von Laffert M, Helmbold P, Wohlrab J, Fiedler E, Stadie V, Marsch WC. Hidradenitis suppurativa (acne inversa): early inflammatory events at terminal follicles and at interfollicular epidermis. *Exp Dermatol*. 2010 Jun;19(6):533–7.
168. Ring HC, Thorsen J, Saunte DM, Lilje B, Bay L, Riis PT, et al. The Follicular Skin Microbiome in Patients With Hidradenitis Suppurativa and Healthy Controls. *JAMA Dermatol*. 2017 Sep 1;153(9):897–905.
169. Orvain C, Lin YL, Jean-Louis F, Hocini H, Hersant B, Bennasser Y, et al. Hair follicle stem cell replication stress drives IFI16/STING-dependent inflammation in hidradenitis suppurativa. *J Clin Invest*. 2020 Jun 8;130(7):3777–90.
170. Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. 2015 Jul;25(7):771–84.
171. Melnik BC, Plewig G. Impaired Notch-MKP-1 signalling in hidradenitis suppurativa: an approach to pathogenesis by evidence from translational biology. *Exp Dermatol*. 2013 Mar;22(3):172–7.
172. Kelly G, Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Hidradenitis suppurativa: the role of immune dysregulation. *Int J Dermatol*. 2014 Oct;53(10):1186–96.
173. Bitschar K, Wolz C, Krismer B, Peschel A, Schittek B. Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *J Dermatol Sci*. 2017 Sep;87(3):215–20.
174. Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, Ward NL, Harms PW, Zeng C, et al. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*. 2020 Oct 15;5(20):e142067, 142067.
175. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 20;21(22):8790.
176. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature*. 2018 Jan 24;553(7689):427–36.
177. Stannard JN, Reed TJ, Myers E, Lowe L, Sarkar MK, Xing X, et al. Lupus Skin Is Primed for IL-6 Inflammatory Responses through a Keratinocyte-Mediated Autocrine Type I Interferon Loop. *J Invest Dermatol*. 2017 Jan;137(1):115–22.
178. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015 May;16(5):448–57.
179. Tüzün Y, Antonov M, Dolar N, Wolf R. Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. *Dermatol Clin*. 2007 Oct;25(4):467–76, vii.
180. Robinson ES, Werth VP. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine*. 2015 Jun;73(2):326–34.

181. Howie SE, Aldridge RD, McVittie E, Forsey RJ, Sands C, Hunter JA. Epidermal keratinocyte production of interferon-gamma immunoreactive protein and mRNA is an early event in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 1996 Jun;106(6):1218–23.
182. Black APB, Ardern-Jones MR, Kasprovicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS, et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007 Jun;37(6):1485–93.
183. Tamoutounour S, Han SJ, Deckers J, Constantinides MG, Hurabielle C, Harrison OJ, et al. Keratinocyte-intrinsic MHCII expression controls microbiota-induced Th1 cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Nov 19;116(47):23643–52.
184. Zhou S, Li Q, Wu H, Lu Q. The pathogenic role of innate lymphoid cells in autoimmune-related and inflammatory skin diseases. *Cell Mol Immunol.* 2020 Apr;17(4):335–46.
185. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell.* 2018 23;174(5):1054–66.
186. Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2017 Nov;17(11):665–78.
187. Kim BS. Innate lymphoid cells in the skin. *J Invest Dermatol.* 2015 Mar;135(3):673–8.
188. Trabanelli S, Gomez-Cadena A, Salomé B, Michaud K, Mavilio D, Landis BN, et al. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 May;94(3):392–9.
189. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity.* 2015 Jul 21;43(1):29–40.
190. Yamanaka K, Yamamoto O, Honda T. Pathophysiology of psoriasis: A review. *J Dermatol.* 2021;48(6):722–31.
191. Fang W, Zhang Y, Chen Z. Innate lymphoid cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2020 Dec;22(1):25.
192. Villanova F, Flutter B, Tosi I, Gryns K, Sreeneebus H, Perera GK, et al. Characterization of Innate Lymphoid Cells in Human Skin and Blood Demonstrates Increase of NKp44+ ILC3 in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2014 Apr;134(4):984–91.
193. Teunissen MBM, Munneke JM, Bernink JH, Spuls PI, Res PCM, te Velde A, et al. Composition of Innate Lymphoid Cell Subsets in the Human Skin: Enrichment of NCR+ ILC3 in Lesional Skin and Blood of Psoriasis Patients. *J Invest Dermatol.* 2014 Sep 1;134(9):2351–60.
194. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013 Dec 16;210(13):2939–50.
195. Krueger JG, Frew J, Jemec GBE, Kimball AB, Kirby B, Bechara FG, et al. Hidradenitis suppurativa: new insights into disease mechanisms and an evolving treatment landscape. *Br J Dermatol.* 2023 Sep 16;ljad345.
196. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009 May;30(5):646–55.

197. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gökmen MR, Perucha E, Jackson I, et al. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun.* 2012 Dec 11;3(1):1268.
198. Johnson MO, Wolf MM, Madden MZ, Andrejeva G, Sugiura A, Contreras DC, et al. Distinct Regulation of Th17 and Th1 Cell Differentiation by Glutaminase-Dependent Metabolism. *Cell.* 2018 Dec 13;175(7):1780-1795.e19.
199. Engler JB, Heckmann NF, Jäger J, Gold SM, Friese MA. Pregnancy Enables Expansion of Disease-Specific Regulatory T Cells in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2019 Oct 1;203(7):1743–52.
200. Basu R, O'Quinn DB, Silberger DJ, Schoeb TR, Fouser L, Ouyang W, et al. Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity.* 2012 Dec 14;37(6):1061–75.
201. Fukaya T, Fukui T, Uto T, Takagi H, Nasu J, Miyanaga N, et al. Pivotal Role of IL-22 Binding Protein in the Epithelial Autoregulation of Interleukin-22 Signaling in the Control of Skin Inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:1418.
202. Thomi R, Cazzaniga S, Seyed Jafari SM, Schlapbach C, Hunger RE. Association of Hidradenitis Suppurativa With T Helper 1/T Helper 17 Phenotypes: A Semantic Map Analysis. *JAMA Dermatol.* 2018 May 1;154(5):592–5.
203. Scala E, Cacciapuoti S, Garzorz-Stark N, Megna M, Marasca C, Seiringer P, et al. Hidradenitis Suppurativa: Where We Are and Where We Are Going. *Cells.* 2021 Aug 15;10(8):2094.
204. Byrd AS, Carmona-Rivera C, O'Neil LJ, Carlucci PM, Cisar C, Rosenberg AZ, et al. Neutrophil extracellular traps, B cells, and type I interferons contribute to immune dysregulation in hidradenitis suppurativa. *Sci Transl Med.* 2019 Sep 4;11(508):eaav5908.
205. Witte-Händel E, Wolk K, Tsaousi A, Irmer ML, Mößner R, Shomroni O, et al. The IL-1 Pathway Is Hyperactive in Hidradenitis Suppurativa and Contributes to Skin Infiltration and Destruction. *J Invest Dermatol.* 2019 Jun;139(6):1294–305.
206. Marzano AV, Damiani G, Ceccherini I, Berti E, Gattorno M, Cugno M. Autoinflammation in pyoderma gangrenosum and its syndromic form (pyoderma gangrenosum, acne and suppurative hidradenitis). *Br J Dermatol.* 2017 Jun;176(6):1588–98.
207. Arakelyan A, Nersisyan L, Poghosyan D, Khondkaryan L, Hakobyan A, Löffler-Wirth H, et al. Autoimmunity and autoinflammation: A systems view on signaling pathway dysregulation profiles. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187572.
208. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):235–8.
209. Moran B, Sweeney CM, Hughes R, Malara A, Kirthi S, Tobin AM, et al. Hidradenitis Suppurativa Is Characterized by Dysregulation of the Th17:Treg Cell Axis, Which Is Corrected by Anti-TNF Therapy. *J Invest Dermatol.* 2017;137(11):2389–95.
210. Hotz C, Boniotto M, Guguin A, Surenaud M, Jean-Louis F, Tisserand P, et al. Intrinsic Defect in Keratinocyte Function Leads to Inflammation in Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol.* 2016;136(9):1768–80.

211. Jones D, Banerjee A, Berger PZ, Gross A, McNish S, Amdur R, et al. Inherent differences in keratinocyte function in hidradenitis suppurativa: Evidence for the role of IL-22 in disease pathogenesis. *Immunol Invest*. 2018 Jan;47(1):57–70.
212. Scala E, Balato A, Marasca C, Di Caprio R, Raimondo A, Cacciapuoti S, et al. New insights into mechanism of Notch signaling in hidradenitis suppurativa. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr*. 2020 Aug;155(4):529–30.
213. Wolk K, Warszawska K, Hoeflich C, Witte E, Schneider-Burrus S, Witte K, et al. Deficiency of IL-22 contributes to a chronic inflammatory disease: pathogenetic mechanisms in acne inversa. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Jan 15;186(2):1228–39.
214. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):241–54.
215. Constantinou CA, Fragoulis GE, Nikiphorou E. Hidradenitis suppurativa: infection, autoimmunity, or both? *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019 Jan;11:1759720X1989548.
216. Hofmann SC, Saborowski V, Lange S, Kern WV, Bruckner-Tuderman L, Rieg S. Expression of innate defense antimicrobial peptides in hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Jun;66(6):966–74.
217. Jiang SW, Whitley MJ, Mariottoni P, Jaleel T, MacLeod AS. Hidradenitis Suppurativa: Host-Microbe and Immune Pathogenesis Underlie Important Future Directions. *JID Innov*. 2021 Mar;1(1):100001.
218. Chopra D, Arens RA, Amornpairoj W, Lowes MA, Tomic-Canic M, Strbo N, et al. Innate immunity and microbial dysbiosis in hidradenitis suppurativa - vicious cycle of chronic inflammation. *Front Immunol*. 2022;13:960488.
219. Giamarellos-Bourboulis EJ, Platzer M, Karagiannidis I, Kanni T, Nikolakis G, Ulrich J, et al. High Copy Numbers of  $\beta$ -Defensin Cluster on 8p23.1, Confer Genetic Susceptibility, and Modulate the Physical Course of Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa. *J Invest Dermatol*. 2016 Aug;136(8):1592–8.
220. Thomi R, Schlapbach C, Yawalkar N, Simon D, Yerly D, Hunger RE. Elevated levels of the antimicrobial peptide LL-37 in hidradenitis suppurativa are associated with a Th1/Th17 immune response. *Exp Dermatol*. 2018 Feb;27(2):172–7.
221. Coates M, Blanchard S, MacLeod AS. Innate antimicrobial immunity in the skin: A protective barrier against bacteria, viruses, and fungi. *PLoS Pathog*. 2018 Dec;14(12):e1007353.
222. Chamorro CI, Weber G, Grönberg A, Pivarcsi A, Stähle M. The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2009 Apr;129(4):937–44.
223. Wark KJL, Cains GD. The Microbiome in Hidradenitis Suppurativa: A Review. *Dermatol Ther*. 2021 Feb 1;11(1):39–52.
224. Thomas C, Rodby KA, Thomas J, Shay E, Antony AK. Recalcitrant Hidradenitis Suppurativa: An Investigation of Demographics, Surgical Management, Bacterial Isolates, Pharmacologic Intervention, and Patient-reported Health Outcomes. *Am Surg*. 2016 Apr;82(4):362–8.
225. Naik HB, Nassif A, Ramesh MS, Schultz G, Piguet V, Alavi A, et al. Are Bacteria Infectious Pathogens in Hidradenitis Suppurativa? Debate at the Symposium for Hidradenitis

- Suppurativa Advances Meeting, November 2017. *J Invest Dermatol*. 2019 Jan;139(1):13–6.
226. Nikolakis G, Join-Lambert O, Karagiannidis I, Guet-Revillet H, Zouboulis CC, Nassif A. Bacteriology of hidradenitis suppurativa/acne inversa: A review. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Nov;73(5 Suppl 1):S12-18.
227. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):240–73, Table of Contents.
228. Bettoli V, Join-Lambert O, Nassif A. Antibiotic Treatment of Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin*. 2016 Jan;34(1):81–9.
229. Kathju S, Lasko LA, Stoodley P. Considering hidradenitis suppurativa as a bacterial biofilm disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):385–9.
230. Otto M. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;306:251–8.
231. Raab O. Uber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. *Ztg Biol*. 1900;
232. Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res*. 2003;23(5A):3591–600.
233. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016 Feb 15;473(4):347–64.
234. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic Therapy. *Dermatol Clin*. 2014 Jul;32(3):415–25.
235. Dupont C, Vermandel M, Leroy HA, Quidet M, Lecomte F, Delhem N, et al. INtraoperative photoDYNAMIC Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial. *Neurosurgery*. 2019 Jun 1;84(6):E414–9.
236. Leroy HA, Baert G, Guerin L, Delhem N, Mordon S, Reyns N, et al. Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastomas: A Standardized Procedure for Clinical Use. *Cancers*. 2021 Nov 17;13(22):5754.
237. Quilbe A, Moralès O, Baydoun M, Kumar A, Mustapha R, Murakami T, et al. An Efficient Photodynamic Therapy Treatment for Human Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Med*. 2020 Jan 10;9(1):192.
238. Kumar A, Pecquenard F, Baydoun M, Quilbé A, Moralès O, Leroux B, et al. An Efficient 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy Treatment for Human Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 21;24(13):10426.
239. Kumar A, Moralès O, Mordon S, Delhem N, Boleslawski E. Could Photodynamic Therapy Be a Promising Therapeutic Modality in Hepatocellular Carcinoma Patients? A Critical Review of Experimental and Clinical Studies. *Cancers*. 2021 Oct 15;13(20):5176.
240. Baydoun M, Boidin L, Leroux B, Vignion-Dewalle AS, Quilbe A, Grolez GP, et al. Folate Receptor Targeted Photodynamic Therapy: A Novel Way to Stimulate Anti-Tumor Immune Response in Intraperitoneal Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 10;24(14):11288.
241. Kubrak T, Karakuła M, Czop M, Kawczyk-Krupka A, Aebischer D. Advances in Management of Bladder Cancer-The Role of Photodynamic Therapy. *Mol Basel Switz*. 2022 Jan 23;27(3):731.

242. Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol EJD*. 2006;16(4):340–8.
243. Piette J. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF- $\kappa$ B at the crossroad between oncology and immunology. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Aug;14(8):1510–7.
244. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*. 2011;3(2):2516–39.
245. Kessel D, Reiners JJ. Photodynamic therapy: autophagy and mitophagy, apoptosis and paraptosis. *Autophagy*. 2020 Nov;16(11):2098–101.
246. Garrier J, Bressenot A, Gräfe S, Marchal S, Mitra S, Foster TH, et al. Compartmental targeting for mTHPC-based photodynamic treatment in vivo: Correlation of efficiency, pharmacokinetics, and regional distribution of apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Oct 1;78(2):563–71.
247. Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, et al. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2120–6.
248. Preise D, Scherz A, Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP). *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 2011 May;10(5):681–8.
249. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1805(1):53–71.
250. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, et al. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*. 2002 Mar;2(2):187–207.
251. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):250–81.
252. Yi G, Hong SH, Son J, Yoo J, Park C, Choi Y, et al. Recent advances in nanoparticle carriers for photodynamic therapy. *Quant Imaging Med Surg*. 2018 May;8(4):433–43.
253. Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Mar;66(2):89–106.
254. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec N Y N*. 2017 Aug;17(8):775–802.
255. Espeland K, Kleinauskas A, Juzenas P, Darvekar S, Vasovic V, Warloe T, et al. Photodynamic Effects with 5-Aminolevulinic Acid on Cytokines and Exosomes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 25;24(5):4554.
256. Deng B, Wang K, Zhang L, Qiu Z, Dong W, Wang W. Photodynamic Therapy for Inflammatory and Cancerous Diseases of the Intestines: Molecular Mechanisms and Prospects for Application. *Int J Biol Sci*. 2023;19(15):4793–810.
257. Reinhard A, Bressenot A, Dassonneville R, Loywick A, Hot D, Audebert C, et al. Photodynamic therapy relieves colitis and prevents colitis-associated carcinogenesis in mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 May;21(5):985–95.

258. Morton CA, Szeimies RM, Basset-Séguin N, Calzavara-Pinton PG, Gilaberte Y, Haedersdal M, et al. European Dermatology Forum guidelines on topical photodynamic therapy 2019 Part 2: emerging indications - field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2020 Jan;34(1):17–29.
259. Hansch A, Frey O, Gajda M, Susanna G, Boettcher J, Bräuer R, et al. Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints. *Lasers Surg Med*. 2008 Apr;40(4):265–72.
260. Favre L, Borle F, Velin D, Bachmann D, Bouzourene H, Wagnieres G, et al. Low dose endoluminal photodynamic therapy improves murine T cell-mediated colitis. *Endoscopy*. 2011 Jul;43(7):604–16.
261. Wang K, Zhang Z, Liu K, Yang X, Zou H, Zhou J, et al. Neat1-miRNA204-5p-PI3K-AKT axis as a potential mechanism for photodynamic therapy treated colitis in mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Dec;24:349–57.
262. Gozali MV, Yi F, Zhang JA, Liu J, Wu HJ, Xu Y, et al. Photodynamic therapy inhibit Fibroblast Growth Factor-10 induced keratinocyte differentiation and proliferation through ROS in Fibroblast Growth Factor Receptor-2b pathway. *Sci Rep*. 2016 Jun 7;6:27402.
263. Gracia-Cazaña T, Vera-Álvarez J, García-Patos V, Gilaberte Y. Imiquimod and Photodynamic Therapy Are Useful in the Treatment of Porokeratosis in Children with Bone Marrow Transplantation. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(6):e291-293.
264. Smits T, Kleinpenning MM, van Erp PEJ, van de Kerkhof PCM, Gerritsen MJP. A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy in patients with psoriasis. *Br J Dermatol*. 2006 Aug;155(2):429–36.
265. Reinhard A, Sandborn WJ, Melhem H, Bolotine L, Chamailard M, Peyrin-Biroulet L. Photodynamic therapy as a new treatment modality for inflammatory and infectious conditions. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015 May;11(5):637–57.
266. Morimoto K, Ozawa T, Awazu K, Ito N, Honda N, Matsumoto S, et al. Photodynamic therapy using systemic administration of 5-aminolevulinic acid and a 410-nm wavelength light-emitting diode for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected ulcers in mice. *PLoS One*. 2014;9(8):e105173.
267. Scheinfeld N. The use of photodynamic therapy to treat hidradenitis suppurativa a review and critical analysis. *Dermatol Online J*. 2015 Jan 15;21(1).
268. Andino Navarrete R, Hasson Nisis A, Parra Cares J. Effectiveness of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of hidradenitis suppurativa: a report of 5 cases. *Actas Dermosifiliogr*. 2014 Aug;105(6):614–7.
269. Suárez Valladares MJ, Eiris Salvado N, Rodríguez Prieto MA. Treatment of hidradenitis suppurativa with intralesional photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and 630nm laser beam. *J Dermatol Sci*. 2017 Mar;85(3):241–6.
270. Mordon S. Treating hidradenitis suppurativa with photodynamic therapy. *J Cosmet Laser Ther Off Publ Eur Soc Laser Dermatol*. 2018 Aug;20(4):223–8.
271. Ibbotson S, Stones R, Bowling J, Campbell S, Kownacki S, Sivaramakrishnan M, et al. A consensus on the use of daylight photodynamic therapy in the UK. *J Dermatol Treat*. 2017 May 19;28(4):360–7.

272. Rothe F, Patties I, Kortmann RD, Glasow A. Immunomodulatory Effects by Photodynamic Treatment of Glioblastoma Cells In Vitro. *Mol Basel Switz*. 2022 May 24;27(11):3384.
273. Dos Santos JD, De Alvarenga JA, Rossoni RD, García MT, Moraes RM, Anbinder AL, et al. Immunomodulatory effect of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. 2017 Sep;110:507–11.
274. Huang X, Xu M, Pan W, Wang M, Wu X, Dai S, et al. Antimicrobial and immunomodulatory responses of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* model. *BMC Microbiol*. 2020 Dec;20(1):196.
275. Cohen DK, Lee PK. Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancers. *Cancers*. 2016 Oct 4;8(10):90.
276. Boen M, Brownell J, Patel P, Tsoukas MM. The Role of Photodynamic Therapy in Acne: An Evidence-Based Review. *Am J Clin Dermatol*. 2017 Jun;18(3):311–21.
277. Li R, Chen J, Cesario TC, Wang X, Yuan JS, Rentzepis PM. Synergistic reaction of silver nitrate, silver nanoparticles, and methylene blue against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Nov 29;113(48):13612–7.
278. Songsantiphap C, Vanichanan J, Chatsuwat T, Asawanonda P, Boontaveeyuwat E. Methylene Blue-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy Against Clinical Isolates of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria Causing Nosocomial Infections in Thailand, An In Vitro Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:929242.
279. Li R, Yuan L, Jia W, Qin M, Wang Y. Effects of Rose Bengal- and Methylene Blue-Mediated Potassium Iodide-Potentiated Photodynamic Therapy on *Enterococcus faecalis*: A Comparative Study. *Lasers Surg Med*. 2021 Mar;53(3):400–10.
280. Pushparajah Mak RS, Liebelt EL. Methylene Blue: An Antidote for Methemoglobinemia and Beyond. *Pediatr Emerg Care*. 2021 Sep 1;37(9):474–7.
281. Probst RL, Reinecke F, Geginat G. Methylene blue in the evaluation of gastrointestinal tract integrity: potential limitations. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur*. 2005;37(4):246–9.
282. Tardivo JP, Adami F, Correa JA, Pinhal MAS, Baptista MS. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Sep;11(3):342–50.
283. Ragàs X, Dai T, Tegos GP, Agut M, Nonell S, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. *Lasers Surg Med*. 2010 Jul;42(5):384–90.
284. Anane YA, Apalata T, Vasaikar S, Okuthe GE, Songca SP. In vitro antimicrobial photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilm using Protoporphyrin IX and Methylene blue. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Jun;30:101752.
285. Agut-Busquet E, Romaní J, Gilaberte Y, García-Malinis A, Ribera-Pibernat M, Luelmo J. Photodynamic therapy with intralesional methylene blue and a 635 nm light-emitting diode lamp in hidradenitis suppurativa: a retrospective follow-up study in 7 patients and a review of the literature. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 2016 Aug 4;15(8):1020–8.
286. Hernandez-Quintanar L, Stolik S, De La Rosa J. Experimental tests in tissue phantoms of a photoirradiation system with optical dosimetry for photodynamic therapy. In:

CONIELECOMP 2012, 22nd International Conference on Electrical Communications and Computers [Internet]. Cholula, Puebla, Mexico: IEEE; 2012 [cited 2024 Jan 15]. p. 45–9. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6189879/>

287. Amira Didi. Synthèses de composites à bases de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dopés par des métaux, destinés simultanément à la catalyse et à la photocatalyse. 2019.
288. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1–12.
289. Tricarico PM, Zupin L, Ottaviani G, Pacor S, Jean-Louis F, Boniotto M, et al. Photobiomodulation therapy promotes in vitro wound healing in nicastrin KO HaCaT cells. *J Biophotonics*. 2018 Dec;11(12):e201800174.
290. Ferri G, Tricarico PM, Vincelli I, Gratton R, Ottaviani G, Boniotto M, et al. Photobiomodulation therapy is able to decrease IL1B gene expression in an in vitro cellular model of hidradenitis suppurativa. *Lasers Med Sci*. 2020 Jun;35(4):1003–5.
291. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):783–4.
292. Wang T, Gao X, Chen S, Li D, Chen S, Xie M, et al. Genome-wide identification and expression analysis of ethylene responsive factor family transcription factors in *Juglans regia*. *PeerJ*. 2021;9:e12429.
293. Vicentini C, Vignion-Dewalle AS, Thecua E, Lecomte F, Béhal H, Maire C, et al. Photodynamic therapy for actinic keratosis of the forehead and scalp with the Aktillite CL 128: Is there a cut-off value for PpIX-weighted irradiance for effective treatment? *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2019 Jul;35(4):232–7.
294. Wilson VG. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. In: Turksen K, editor. *Epidermal Cells: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2014 [cited 2022 Aug 4]. p. 33–41. (Methods in Molecular Biology). Available from: [https://doi.org/10.1007/7651\\_2013\\_42](https://doi.org/10.1007/7651_2013_42)
295. Peña-Rosado A, Riera-Martí N, Expósito-Serrano V, Romaní J. Autoinflammatory Keratinization Diseases. *Actas Dermo-Sifiliográficas Engl Ed*. 2021 Nov;112(10):891–900.
296. Hotz C, Boniotto M, Guguin A, Surenaud M, Jean-Louis F, Tisserand P, et al. Intrinsic Defect in Keratinocyte Function Leads to Inflammation in Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol*. 2016;136(9):1768–80.
297. Frade MAC, de Andrade TAM, Aguiar AFCL, Guedes FA, Leite MN, Passos WR, et al. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). *An Bras Dermatol*. 2015;90(3):347–50.
298. Leite MN, Viegas JSR, Praça FSG, de Paula NA, Ramalho LNZ, Bentley MVLB, et al. Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. *Eur J Pharm Sci*. 2021 May 1;160:105769.
299. Danso MO, Berkers T, Mieremet A, Hausil F, Bouwstra JA. An ex vivo human skin model for studying skin barrier repair. *Exp Dermatol*. 2015;24(1):48–54.
300. Polese B, Zhang H, Thurairajah B, King IL. Innate Lymphocytes in Psoriasis. *Front Immunol*. 2020 Feb 21;11:242.

301. Sato Y, Ogawa E, Okuyama R. Role of Innate Immune Cells in Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 9;21(18):6604.
302. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell W m. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 2003;148(2):229–32.
303. Dharmaratne P, Wang B, Wong RCH, Chan BCL, Lau KM, Ke MR, et al. Monosubstituted tricationic Zn(II) phthalocyanine enhances antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and cytotoxicity evaluation for topical applications: in vitro and in vivo study. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 1;9(1):1628–37.
304. Hua H, Cheng J wei, Bu W bo, Liu J, Ma W wei, Ni N, et al. 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy inhibits ultraviolet B-induced skin photodamage. *Int J Biol Sci.* 2019 Aug 7;15(10):2100–9.
305. Alberdi E, Gómez C. Efficiency of methylene blue-mediated photodynamic therapy vs intense pulsed light in the treatment of onychomycosis in the toenails. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2019;35(2):69–77.
306. Soliman M, Salah M, Fadel M, Nasr M, El-Azab H. Contrasting the efficacy of pulsed dye laser and photodynamic methylene blue nanoemulgel therapy in treating acne vulgaris. *Arch Dermatol Res.* 2021 Apr;313(3):173–80.
307. Gao J, Chen F, Fang H, Mi J, Qi Q, Yang M. Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice. *Biol Res.* 2020 Oct 20;53(1):48.
308. Weng Z, Patel AB, Vasiadi M, Therianou A, Theoharides TC. Luteolin inhibits human keratinocyte activation and decreases NF- $\kappa$ B induction that is increased in psoriatic skin. *PloS One.* 2014;9(2):e90739.
309. Kashyap MP, Khan J, Sinha R, Jin L, Atigadda V, Deshane JS, et al. Advances in molecular pathogenesis of hidradenitis suppurativa: Dysregulated keratins and ECM signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2022 Aug;128:120–9.
310. Bocheńska K, Moskot M, Gabig-Cimińska M. Use of Cytokine Mix-, Imiquimod-, and Serum-Induced Monoculture and Lipopolysaccharide- and Interferon Gamma-Treated Co-Culture to Establish In Vitro Psoriasis-like Inflammation Models. *Cells.* 2021 Nov 2;10(11):2985.
311. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 Mar;106(3):761–71.
312. Tremblay JP. [The CRISPR system can correct or modify the expression of genes responsible for hereditary diseases]. *Med Sci MS.* 2015 Nov;31(11):1014–22.
313. Yang DS, Tandon A, Chen F, Yu G, Yu H, Arawaka S, et al. Mature Glycosylation and Trafficking of Nicastrin Modulate Its Binding to Presenilins. *J Biol Chem.* 2002 Aug;277(31):28135–42.
314. Vellaichamy G, Dimitrion P, Zhou L, Ozog D, Lim HW, Liao W, et al. Insights from  $\gamma$ -Secretase: Functional Genetics of Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol.* 2021 Aug;141(8):1888–96.

315. Kurokawa I, Nishijima S, Kusumoto K, Senzaki H, Shikata N, Tsubura A. Étude immunohistochimique des cytokératines dans l'hidradénite suppurée (Acne Inversa). *J Int Med Res.* 2002 Apr 1;30(2):131–6.
316. Rosi E, Guerra P, Silvi G, Nunziati G, Scandagli I, Di Cesare A, et al. Consistency of Bacterial Triggers in the Pathogenesis of Hidradenitis Suppurativa. *Vaccines.* 2023 Jan 13;11(1):179.
317. Song PI, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC, Park YM, Abraham T, et al. Human Keratinocytes Express Functional CD14 and Toll-Like Receptor 4. *J Invest Dermatol.* 2002 Aug;119(2):424–32.
318. Enk CD, Sredni D, Blauvelt A, Katz SI. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995 May 1;154(9):4851–6.
319. Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Interleukin-10 production by cultured human keratinocytes: regulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation. *J Invest Dermatol.* 1995 Jan;104(1):3–6.
320. Melnik B. The Potential Role of Impaired Notch Signalling in Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(1):5–11.
321. van der Zee HH, de Ruyter L, van den Broecke DG, Dik WA, Laman JD, Prens EP. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Br J Dermatol.* 2011 Jun;164(6):1292–8.
322. Kelly G, Hughes R, McGarry T, van den Born M, Adamzik K, Fitzgerald R, et al. Dysregulated cytokine expression in lesional and nonlesional skin in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2015 Dec;173(6):1431–9.
323. Smith MK, Nicholson CL, Parks-Miller A, Hamzavi IH. Hidradenitis suppurativa: an update on connecting the tracts. *F1000Research.* 2017;6:1272.
324. Hernández-Quintero M, Kuri-Harcuch W, González Robles A, Castro-Muñozledo F. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.* 2006 Jul;325(1):77–90.
325. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care.* 2016 Feb 1;5(2):65–78.
326. Liu T, Li S, Ying S, Tang S, Ding Y, Li Y, et al. The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Skin Diseases: From Bench to Bedside. *Front Immunol [Internet].* 2020 [cited 2021 May 12];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.594735/full>
327. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014 Sep;14(9):585–600.
328. Su Y, Huang J, Zhao X, Lu H, Wang W, Yang XO, et al. Interleukin-17 receptor D constitutes an alternative receptor for interleukin-17A important in psoriasis-like skin inflammation. *Sci Immunol.* 2019 Jun 7;4(36):eaau9657.
329. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Feb 15;178(4):2229–40.

330. Ponikowska M, Matusiak, Kasztura M, Jankowska E, Szepietowski J. Decreased Serum Level of Interleukin-22 Correlates with Hepcidin in Patients with Hidradenitis Suppurativa. *Acta Derm Venereol.* 2021;101(9):adv00558.
331. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jan;13(1):21–38.
332. Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev.* 2021;10:30.
333. Kang JH, Kim BS, Uhm TG, Lee SH, Lee GR, Park CS, et al. Gamma-secretase inhibitor reduces allergic pulmonary inflammation by modulating Th1 and Th2 responses. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 May 15;179(10):875–82.
334. He Y, Xu H, Li C, Zhang X, Zhou P, Xiao X, et al. Nicastrin/miR-30a-3p/RAB31 Axis Regulates Keratinocyte Differentiation by Impairing EGFR Signaling in Familial Acne Inversa. *J Invest Dermatol.* 2019 Jan;139(1):124–34.
335. Nigro E, Polito R, Babino G, Mattera E, Fulgione E, Ragozzino G, et al. Adiponectin Contributes to the Inflammatory Milieu in Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Pract Concept.* 2022 Nov;12(4):e2022157.
336. Molnar J, Mallonee CJ, Stanisic D, Homme RP, George AK, Singh M, et al. Hidradenitis Suppurativa and 1-Carbon Metabolism: Role of Gut Microbiome, Matrix Metalloproteinases, and Hyperhomocysteinemia. *Front Immunol.* 2020 Aug 19;11:1730.
337. Tsaousi A, Witte E, Witte K, Röwert-Huber HJ, Volk HD, Sterry W, et al. MMP8 Is Increased in Lesions and Blood of Acne Inversa Patients: A Potential Link to Skin Destruction and Metabolic Alterations. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:4097574.
338. Caley MP, Martins VLC, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2015 Apr;4(4):225–34.
339. Frew JW, Navrazhina K. No evidence that impaired Notch signalling differentiates hidradenitis suppurativa from other inflammatory skin diseases. *Br J Dermatol.* 2020 Apr;182(4):1042–3.
340. Blok JL, Li K, Brodmerkel C, Jonkman MF, Horváth B. Gene expression profiling of skin and blood in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2016 Jun;174(6):1392–4.
341. Hessam S, Gambichler T, Skrygan M, Scholl L, Sand M, Meyer T, et al. Increased expression profile of NCSTN, Notch and PI3K/AKT3 in hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021 Jan;35(1):203–10.
342. Singla DK, Wang J, Singla R. Primary human monocytes differentiate into M2 macrophages and involve Notch-1 pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017 Mar;95(3):288–94.
343. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):427–37.
344. Watt FM, Estrach S, Ambler CA. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Apr;20(2):171–9.
345. Ma L, Xue H, Qi R, Wang Y, Yuan L. Effect of  $\gamma$ -secretase inhibitor on Th17 cell differentiation and function of mouse psoriasis-like skin inflammation. *J Transl Med.* 2018 Mar 10;16(1):59.

346. Gutierrez A, Look AT. NOTCH and PI3K-AKT pathways intertwined. *Cancer Cell*. 2007 Nov;12(5):411–3.
347. Nanba D, Toki F, Barrandon Y, Higashiyama S. Recent advances in the epidermal growth factor receptor/ligand system biology on skin homeostasis and keratinocyte stem cell regulation. *J Dermatol Sci*. 2013 Nov;72(2):81–6.
348. Rabeony H, Petit-Paris I, Garnier J, Barrault C, Pedretti N, Guilloteau K, et al. Inhibition of keratinocyte differentiation by the synergistic effect of IL-17A, IL-22, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  and oncostatin M. *PLoS One*. 2014;9(7):e101937.
349. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2006 May;36(5):1309–23.
350. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Mar 15;174(6):3695–702.
351. Wu Y, Liu L, Bian C, Diao Q, Nisar MF, Jiang X, et al. MicroRNA let-7b inhibits keratinocyte differentiation by targeting IL-6 mediated ERK signaling in psoriasis. *Cell Commun Signal*. 2018 Dec;16(1):58.
352. Witte-Händel E, Wolk K, Tsaousi A, Irmer ML, Mößner R, Shomroni O, et al. The IL-1 Pathway Is Hyperactive in Hidradenitis Suppurativa and Contributes to Skin Infiltration and Destruction. *J Invest Dermatol*. 2019 Jun;139(6):1294–305.
353. Wang WM, Jin HZ. [Interleukin-6 in Psoriasis]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2018 Apr 28;40(2):284–8.
354. He Y, Li C, Xu H, Duan Z, Liu Y, Zeng R, et al. AKT-dependent hyperproliferation of keratinocytes in familial hidradenitis suppurativa with a NCSTN mutation: a potential role of defective miR-100-5p. *Br J Dermatol*. 2020 Feb;182(2):500–2.
355. Kozera EK, Frew JW. The pathogenesis of hidradenitis suppurativa: Evolving paradigms in a complex disease. *Dermatol Rev*. 2022 Apr;3(2):39–49.
356. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):416–21.
357. Lee J, Basak JM, Demehri S, Kopan R. Bi-compartmental communication contributes to the opposite proliferative behavior of Notch1-deficient hair follicle and epidermal keratinocytes. *Dev Camb Engl*. 2007 Aug;134(15):2795–806.
358. Tu CL, Celli A, Mauro T, Chang W. Calcium-Sensing Receptor Regulates Epidermal Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling and Re-Epithelialization after Wounding. *J Invest Dermatol*. 2019 Apr;139(4):919–29.
359. Swindell WR, Sarkar MK, Liang Y, Xing X, Baliwag J, Elder JT, et al. RNA-seq identifies a diminished differentiation gene signature in primary monolayer keratinocytes grown from lesional and uninvolved psoriatic skin. *Sci Rep*. 2017 Dec 22;7(1):18045.
360. Reichelt J, Furstenberger G, Magin TM. Loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, increased keratinocyte turnover, and decreased tumor formation in mice. *J Invest Dermatol*. 2004 Nov;123(5):973–81.

361. Maretzky T, Evers A, Zhou W, Swendeman SL, Wong PM, Rafii S, et al. Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat Commun.* 2011;2:229.
362. Wikan N, Hankittichai P, Thaklaewphan P, Potikanond S, Nimlamool W. Oxyresveratrol Inhibits TNF- $\alpha$ -Stimulated Cell Proliferation in Human Immortalized Keratinocytes (HaCaT) by Suppressing AKT Activation. *Pharmaceutics.* 2021 Dec 28;14(1):63.
363. Furue K, Ito T, Tsuji G, Kadono T, Furue M. Psoriasis and the TNF/IL23/IL17 axis. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr.* 2019 Aug;154(4):418–24.
364. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines.* 2020 Apr 30;8(5):101.
365. Taniguchi K, Arima K, Masuoka M, Ohta S, Shiraishi H, Ontsuka K, et al. Periostin Controls Keratinocyte Proliferation and Differentiation by Interacting with the Paracrine IL-1 $\alpha$ /IL-6 Loop. *J Invest Dermatol.* 2014 May;134(5):1295–304.
366. Jin L, Kashyap MP, Chen Y, Khan J, Guo Y, Chen JQ, et al. Mechanism underlying follicular hyperproliferation and oncogenesis in hidradenitis suppurativa. *iScience.* 2023 Jun;26(6):106896.
367. Lowry MB, Guo C, Zhang Y, Fantacone ML, Logan IE, Campbell Y, et al. A mouse model for vitamin D-induced human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020 Apr;198:105552.
368. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol.* 2003 Mar;120(3):379–89.
369. Banerjee A, McNish S, Shanmugam VK. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is Elevated in Wound Exudate from Hidradenitis Suppurativa. *Immunol Invest.* 2017 Feb;46(2):149–58.
370. Ledger EVK, Mesnage S, Edwards AM. Human serum triggers antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun.* 2022 Apr 19;13(1):2041.
371. Ardon CB, Wang C, Prens EP, van Straalen KR. Noninvasive assessment of cytokine and antimicrobial peptide levels in hidradenitis suppurativa using transdermal analysis patches. *Br J Dermatol.* 2021 Feb;184(2):343–5.
372. Schlapbach C, Yawalkar N, Hunger RE. Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Jul;61(1):58–65.
373. Coates M, Mariottoni P, Corcoran DL, Kirshner HF, Jaleel T, Brown DA, et al. The skin transcriptome in hidradenitis suppurativa uncovers an antimicrobial and sweat gland gene signature which has distinct overlap with wounded skin. *PLOS ONE.* 2019 May 6;14(5):e0216249.
374. Supp DM, Karpinski AC, Boyce ST. Expression of human beta-defensins HBD-1, HBD-2, and HBD-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes. *Burns J Int Soc Burn Inj.* 2004 Nov;30(7):643–8.
375. Navrazhina K, Garcet S, Frew JW, Zheng X, Coats I, Guttman-Yassky E, et al. The inflammatory proteome of hidradenitis suppurativa skin is more expansive than that of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 2022 Feb;86(2):322–30.

376. Kim YJ, Hong CK, Seo SJ. Regulation of Human Beta-Defensin 3(hBD-3) in Human Keratinocyte(HaCaT) Cell Lines. *Ann Dermatol*. 2003;15(1):1.
377. Raziyeveva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*. 2021 May 8;11(5):700.
378. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Jun;1867(6):118677.
379. Lima AL, Karl I, Giner T, Poppe H, Schmidt M, Presser D, et al. Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2016 Mar;174(3):514–21.
380. Batycka-Baran A, Baran W, Nowicka-Suszko D, Koziol-Galczyńska M, Bieniek A, Matusiak Ł, et al. Serum Concentration and Skin Expression of S100A7 (Psoriasin) in Patients Suffering from Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Basel Switz*. 2021;237(5):733–9.
381. Morizane S, Gallo RL. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol*. 2012 Mar;39(3):225–30.
382. Zackular JP, Chazin WJ, Skaar EP. Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem*. 2015 Jul 31;290(31):18991–8.
383. Schitteck B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun*. 2012;4(4):349–60.
384. Rieg S, Seeber S, Steffen H, Humeny A, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *J Invest Dermatol*. 2006 Feb;126(2):354–65.
385. Senyürek I, Paulmann M, Sinnberg T, Kalbacher H, Deeg M, Gutschmann T, et al. Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2499–509.
386. Rieg S, Garbe C, Sauer B, Kalbacher H, Schitteck B. Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br J Dermatol*. 2004 Sep;151(3):534–9.
387. de Oliveira ASLE, Bloise G, Moltrasio C, Coelho A, Agrelli A, Moura R, et al. Transcriptome Meta-Analysis Confirms the Hidradenitis Suppurativa Pathogenic Triad: Upregulated Inflammation, Altered Epithelial Organization, and Dysregulated Metabolic Signaling. *Biomolecules*. 2022 Sep 25;12(10):1371.
388. Tricarico PM, Gratton R, Santos-Silva CAD, Moura RRD, Ura B, Sommella E, et al. A rare loss-of-function genetic mutation suggest a role of dermcidin deficiency in hidradenitis suppurativa pathogenesis. *Front Immunol*. 2022 Dec 5;13:1060547.
389. Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2009 Feb;160(2):243–9.
390. Rademacher F, Gläser R, Harder J. Antimicrobial peptides and proteins: Interaction with the skin microbiota. *Exp Dermatol*. 2021;30(10):1496–508.
391. Harder J, Schroder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29;277(48):46779–84.

392. Gambichler T, Hessam S, Skrygan M, Bakirtzi M, Kasakovski D, Bechara FG. NOD2 signalling in hidradenitis suppurativa. *Clin Exp Dermatol*. 2021 Dec;46(8):1488–94.
393. Kopfnagel V, Wagenknecht S, Harder J, Hofmann K, Kleine M, Buch A, et al. RNase 7 Strongly Promotes TLR9-Mediated DNA Sensing by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Invest Dermatol*. 2018 Apr;138(4):872–81.
394. Banas M, Zabieglo K, Kasetty G, Kapinska-Mrowiecka M, Borowczyk J, Drukala J, et al. Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *PLoS One*. 2013;8(3):e58709.
395. Sochal M, Fichna J, Gabryelska A, Talar-Wojnarowska R, Białasiewicz P, Małecka-Wojcieszko E. Serum Levels of Chemerin in Patients with Inflammatory Bowel Disease as an Indicator of Anti-TNF Treatment Efficacy. *J Clin Med*. 2021 Oct 8;10(19):4615.
396. Tekely E, Szostakiewicz-Grabek B, Krasowska D, Chodorowska G. Serum levels of chemerin and pigment epithelium-derived factor in patients with psoriasis. *Postępy Nauk Med [Internet]*. 2018 Jan [cited 2023 Oct 4];31(1A). Available from: <http://www.czytelniamedyczna.pl/6346,serum-levels-of-chemerin-and-pigment-epithelium-derived-factor-in-patients-with-p.html>
397. Bielecki P, Riesenfeld SJ, Hütter JC, Torlai Triglia E, Kowalczyk MS, Ricardo-Gonzalez RR, et al. Skin-resident innate lymphoid cells converge on a pathogenic effector state. *Nature*. 2021 Apr;592(7852):128–32.
398. Petrasca A, Hambly R, Molloy O, Kearns S, Moran B, Smith CM, et al. Innate lymphoid cell (ILC) subsets are enriched in the skin of patients with hidradenitis suppurativa. Chitta S, editor. *PLOS ONE*. 2023 Feb 13;18(2):e0281688.
399. Kobayashi T, Voisin B, Kim DY, Kennedy EA, Jo JH, Shih HY, et al. Homeostatic Control of Sebaceous Glands by Innate Lymphoid Cells Regulates Commensal Bacteria Equilibrium. *Cell*. 2019 Feb 21;176(5):982-997.e16.
400. Acharyya S, Sharma SM, Cheng AS, Ladner KJ, He W, Kline W, et al. TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2010 Aug 30;5(8):e12479.
401. Kamp S, Fiehn AM, Stenderup K, Rosada C, Pakkenberg B, Kemp K, et al. Hidradenitis suppurativa: a disease of the absent sebaceous gland? Sebaceous gland number and volume are significantly reduced in uninvolved hair follicles from patients with hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2011 May;164(5):1017–22.
402. Szabó K, Tax G, Kis K, Szegedi K, Teodorescu-Brinzeu DG, Diószegi C, et al. Interleukin-1A +4845(G> T) polymorphism is a factor predisposing to acne vulgaris. *Tissue Antigens*. 2010 Nov;76(5):411–5.
403. Tsang M, Dawid IB. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2004 Apr 6;2004(228):pe17.
404. Schick E, Kaufmann R, Rück A, Hainzl A, Boehncke WH. Influence of activation and differentiation of cells on the effectiveness of photodynamic therapy. *Acta Derm Venereol*. 1995 Jul;75(4):276–9.
405. Cantisani C, Paolino G, Faina V, Frascani F, Cantoresi F, Bianchini D, et al. Overview on Topical 5-ALA Photodynamic Therapy Use for Non Melanoma Skin Cancers. *Int J Photoenergy*. 2014 Mar 26;2014:e304862.

406. Zhang C, Gong T, Wang J, Chou A, Jiang JJ. Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid Is Sufficient for Photodynamic Therapy on Vocal Folds. *The Laryngoscope*. 2019;129(2):E80–6.
407. Champeau M, Jary D, Vignion-Dewalle AS, Mordon S, de Lassalle EM, Vignoud S, et al. Introduction of a model of skin lesions on rats and testing of dissolving microneedles containing 5-aminolevulinic acid. *Int J Pharm*. 2021 Feb;594:120115.
408. Caffarel-Salvador E, Kearney MC, Mairs R, Gallo L, Stewart SA, Brady AJ, et al. Methylene Blue-Loaded Dissolving Microneedles: Potential Use in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy of Infected Wounds. *Pharmaceutics*. 2015 Sep 28;7(4):397–412.
409. Genina EA, Bashkatov AN, Tuchin VV. Methylene blue diffusion in skin tissue. In: Wang RK, Hebden JC, Priezzhev AV, Tuchin VV, editors. 2004 [cited 2023 Oct 13]. p. 315–23. Available from: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=847022>
410. Dragicevic-Curic N, Fahr A. Liposomes in topical photodynamic therapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012 Aug;9(8):1015–32.
411. Fadel M, Salah M, Samy N, Mona S. Liposomal methylene blue hydrogel for selective photodynamic therapy of acne vulgaris. *J Drugs Dermatol JDD*. 2009 Nov;8(11):983–90.
412. Mofteh NH, Ibrahim SM, Wahba NH. Intense pulsed light versus photodynamic therapy using liposomal methylene blue gel for the treatment of truncal acne vulgaris: a comparative randomized split body study. *Arch Dermatol Res*. 2016 May;308(4):263–8.
413. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015 Apr 13;27(4):450–61.
414. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Apr 9;33(4):547–62.
415. Chang CH, Qiu J, O’Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*. 2015 Sep 10;162(6):1229–41.
416. Herbel C, Patsoukis N, Bardhan K, Seth P, Weaver JD, Boussiotis VA. Clinical significance of T cell metabolic reprogramming in cancer. *Clin Transl Med*. 2016 Dec;5(1):29.
417. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun*. 2015 Mar 26;6:6692.
418. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity*. 2016 Aug 16;45(2):358–73.
419. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):955–72.
420. O’Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep;16(9):553–65.

421. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):60–5.
422. Callahan MK, Wolchok JD. Recruit or Reboot? How Does Anti-PD-1 Therapy Change Tumor-Infiltrating Lymphocytes? *Cancer Cell*. 2019 Sep 16;36(3):215–7.
423. Coyle C, Cafferty FH, Vale C, Langley RE. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Dec;27(12):2184–95.
424. Xu H, Chen K, Jia X, Tian Y, Dai Y, Li D, et al. Metformin Use Is Associated With Better Survival of Breast Cancer Patients With Diabetes: A Meta-Analysis. *The Oncologist*. 2015 Nov;20(11):1236–44.
425. Kordes S, Pollak MN, Zwinderman AH, Mathôt RA, Weterman MJ, Beeker A, et al. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015 Jul;16(7):839–47.
426. Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, Banchemereau R, Chen YJJ, Chitre AS, et al. Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):274–8.
427. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med*. 2019 Aug;25(8):1251–9.
428. Yamaguchi K, Mishima K, Ohmura H, Hanamura F, Ito M, Nakano M, et al. Activation of central/effector memory T cells and T-helper 1 polarization in malignant melanoma patients treated with anti-programmed death-1 antibody. *Cancer Sci*. 2018 Oct;109(10):3032–42.
429. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2930–40.
430. Yang Z, Qi Y, Lai N, Zhang J, Chen Z, Liu M, et al. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF- $\beta$ 1. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2018 Jan 4;37(1):1.
431. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*. 2017 May 9;19(6):1189–201.
432. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Aug 1;28(8):1988–95.
433. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, Iizuka H, Uehara J, Otsuka F, et al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci*. 2017 May;108(5):1022–31.
434. Pflieger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis*. 2015 Jul 30;6(7):e1835.
435. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive

- Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*. 2016 Aug 16;45(2):374–88.
436. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, et al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity*. 2016 Aug 16;45(2):389–401.
437. Saunte DML, Jemec GBE. Hidradenitis Suppurativa: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 2017 Nov 28;318(20):2019–32.
438. Mader JS, Ewen C, Hancock REW, Bleackley RC. The Human Cathelicidin, LL-37, Induces Granzyme-mediated Apoptosis in Regulatory T Cells: *J Immunother*. 2011 Apr;34(3):229–35.
439. Chen W, Wang X, Yan X, Yu Z, Zhang J, Han S. The emerging role of exosomes in the pathogenesis, prognosis and treatment of necrotizing enterocolitis. *Am J Transl Res*. 2020;12(11):7020–33.
440. Tavasolian F, Moghaddam AS, Rohani F, Abdollahi E, Janzamin E, Momtazi-Borojeni AA, et al. Exosomes: Effectual players in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2020 Jun;19(6):102511.
441. Carrasco E, Soto-Herederó G, Mittelbrunn M. The Role of Extracellular Vesicles in Cutaneous Remodeling and Hair Follicle Dynamics. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 5;20(11):2758.
442. Jiang J, Zhang Y, Indra AK, Ganguli-Indra G, Le MN, Wang H, et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-eluting nanofibrous dressings induce endogenous antimicrobial peptide expression. *Nanomed*. 2018;13(12):1417–32.
443. Song DW, Kim SH, Kim HH, Lee KH, Ki CS, Park YH. Multi-biofunction of antimicrobial peptide-immobilized silk fibroin nanofiber membrane: Implications for wound healing. *Acta Biomater*. 2016 15;39:146–55.
444. de Boer OJ, Krebbers G, Mackaaij C, Florquin S, de Rie MA, van der Wal AC, et al. Comparison of Two Different Immunohistochemical Quadruple Staining Approaches to Identify Innate Lymphoid Cells in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2020 Feb 1;68(2):127–38.
445. Takahashi T, Yamasaki K. Psoriasis and Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan;21(18):6791.
446. Kenshi Y, Richard LG. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol EJD*. 2008;18(1):11–21.
447. Heilborn JD, Weber G, Grönberg A, Dieterich C, Stähle M. Topical treatment with the vitamin D analogue calcipotriol enhances the upregulation of the antimicrobial protein hCAP18/LL-37 during wounding in human skin in vivo. *Exp Dermatol*. 2010 Apr;19(4):332–8.
448. Song DW, Kim SH, Kim HH, Lee KH, Ki CS, Park YH. Multi-biofunction of antimicrobial peptide-immobilized silk fibroin nanofiber membrane: Implications for wound healing. *Acta Biomater*. 2016 15;39:146–55.
449. Moorcroft SCT, Roach L, Jayne DG, Ong ZY, Evans SD. Nanoparticle-Loaded Hydrogel for the Light-Activated Release and Photothermal Enhancement of Antimicrobial Peptides. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Jun 3;12(22):24544–54.

## Résumé de la thèse

---

L'hidradénite suppurée (HS) est une dermatose chronique, débilite et suppurative des plis. Sa physiopathologie reste mal comprise et seule la chirurgie est curative au prix d'exérèses parfois délabrantes. Les études sont limitées du fait de l'absence de modèle animal de la maladie, de son hétérogénéité et de son caractère multifactoriel. Plusieurs études ont montré le rôle de la dysbiose cutanée dans l'inflammation chronique de la maladie pouvant être causée par une altération de sécrétion de peptides antimicrobiens (PAMs) liée au dysfonctionnement kératinocytaire. La thérapie photodynamique (PDT) a montré un rationnel dans le traitement des dermatoses inflammatoires. Cependant la faible pénétrance du PS limite l'action thérapeutique et donc sa pertinence dans l'HS due aux trajets fistuleux parfois profonds.

La première partie des résultats a permis de caractériser notre modèle *in vitro* de lignée kératinocytaire humain immortalisé HaCaT, muté sur le gène de la Nicastrine (modèle HS), où nous observons des troubles de la différenciation kératinocytaire notamment morphologique et protéique par rapport à la lignée sauvage. Dans un second temps, nous avons évalué le sécrétome de nos milieux de culture, où nous observons la présence de cytokines pro-inflammatoires de la voie T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17 (IL-1 $\beta$ , IL-17a, IL-23 et IFN- $\gamma$ ) ainsi qu'un défaut de sécrétion IL-10 dans notre modèle KO à l'état basal par rapport à la lignée sauvage ce qui pourrait participer au déséquilibre de la réponse inflammatoire. Par ailleurs, nous montrons un changement du profil d'expression des marqueurs de différenciation kératinocytaire, dans notre modèle *in vitro* d'HS, exposé à une inflammation induite (TNF- $\alpha$  + IL-6 + LPS), qui s'apparente à un profil de kératinocytes de la couche basale, caractérisé par une capacité proliférative élevée et une survie cellulaire prolongée. Ces propriétés pourraient être la cause de l'acanthose épidermique décrite dans l'HS qui est responsable de l'occlusion folliculaire ainsi que des cicatrices hypertrophiques caractéristiques de la maladie. Nous observons, à partir de test de blessure, que notre lignée HaCaT KO présente une meilleure capacité de cicatrisation que la lignée WT et que l'induction de la différenciation augmente cette capacité. Les caractéristiques présentées par notre lignée HaCaT KO s'apparentent à un état d'activation kératinocytaire décrit en particulier lors du processus de cicatrisation où les kératinocytes suivent une voie de différenciation épithéliale alternative leur permettant d'acquérir des capacités de migration et de prolifération.

Dans un second temps, nous avons testé l'effet de la PDT sur notre modèle *in*

*vitro*. Nous observons une plus grande efficacité et sélectivité de la PDT au BdM sur notre lignée HaCaT KO par rapport à la PDT au 5-ALA. Nous avons également obtenu, en parallèle, l'autorisation du comité de protection des personnes pour la réalisation de l'étude clinique ImoHS afin de pouvoir évaluer la réponse immunitaire locale et systémique, à partir de prélèvements sanguins et d'explants cutanés issus de patients HS. Dans ce cadre, nous avons mis au point un nouveau dispositif d'illumination de PDT pour le traitement d'explants cutanés humains (modèle *ex vivo*). Nous avons également mis au point et validé notre stratégie d'analyse d'étude des sous-groupes des cellules lymphoïdes innées par cytométrie de flux à partir du sang de donneur sain.

Le projet de thèse a permis de mieux caractériser le modèle *in vitro* d'HS et l'impact de la différenciation et de l'inflammation sur les HaCaT KO. Nous avons également mis en évidence l'efficacité de la PDT au BdM sur notre modèle *in vitro* d'HS. L'autorisation obtenue pour la mise en place de l'étude clinique ImoHS, nous permettra par son côté translationnel, de valider nos résultats obtenus sur un modèle *ex vivo*.

## **Abstract of thesis**

---

Hidradenitis suppurativa (HS) is a chronic, debilitating and suppurative dermatosis affecting the folds. Its pathophysiology remains poorly understood, and only surgery is curative, although it can cause significant tissue damage. Studies are limited by the absence of animal models of the disease, its heterogeneity and multifactorial nature. Several studies have demonstrated the role of cutaneous dysbiosis in the chronic inflammation of the disease, which may be caused by altered secretion of antimicrobial peptides (AMPs) linked to keratinocyte dysfunction. Photodynamic therapy (PDT) has been shown to be a rational treatment for inflammatory dermatoses. However, the low penetrance of the photosensitizer (PS) limits its therapeutic action and therefore its relevance in HS due to deep fistulous tracts.

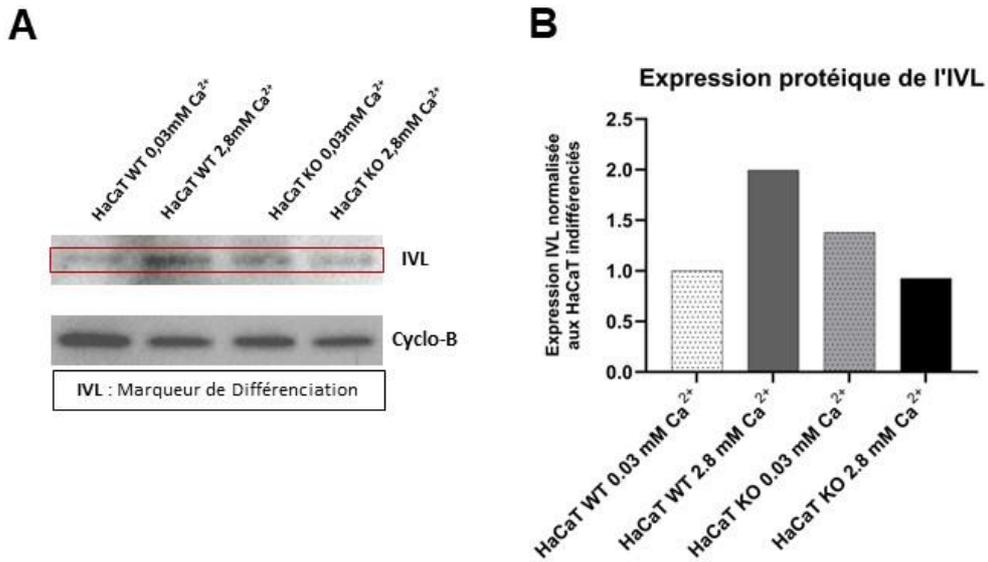
The first part of the results allowed us to characterize our in vitro model of the immortalized human keratinocyte line HaCaT, mutated on the Nicastrin gene (HS model), where we observe disturbances in morphological and protein keratinocyte differentiation compared with the wild-type line. Secondly, we assessed the secretome of our culture media, where we observed the presence of pro-inflammatory cytokines of the TH1 and TH17 pathways (IL-1 $\beta$ , IL-17a, IL-23 and IFN- $\gamma$ ) as well as a defect in IL-10 secretion in our KO control model compared with the wild-type line, which could be involved in the imbalance of the inflammatory response. Furthermore, we show a change in the expression profile of keratinocyte differentiation markers, in our in vitro HS model, exposed to induced inflammation (TNF- $\alpha$  + IL-6 + LPS), which resembles a basal layer keratinocyte profile, characterized by high proliferative capacity and prolonged cell survival. These properties could be the cause of the epidermal acanthosis described in HS, which is responsible for the follicular occlusion and hypertrophic scarring characteristic of the disease. Based on wounding tests, we have observed that our HaCaT KO line has a better wound healing capacity than the WT line, and that induction of differentiation enhances this capacity. The characteristics displayed by our HaCaT KO line are like a state of keratinocyte activation described during the healing process, where keratinocytes follow an alternative epithelial differentiation pathway enabling them to acquire migration and proliferation capacities.

Secondly, we tested the effect of PDT on our in vitro model. We observed greater efficacy and selectivity of methylene blue PDT on our HaCaT KO line, compared with 5-ALA PDT. At the same time, we obtained the authorization of the

French Committee for the Protection of Individuals to conduct the ImoHS clinical study, to evaluate the local and systemic immune response, using blood samples and skin explants from HS patients. In this context, we have developed a new PDT illumination device for the treatment of human skin explants (ex vivo model). We also developed and validated our analysis strategy for studying innate lymphoid cell subgroups by flow cytometry from healthy donor blood.

The thesis project enabled us to better characterize the in vitro HS model and the impact of differentiation and inflammation on HaCaT KOs. We also demonstrated the efficacy of methylene blue PDT on our in vitro HS model. The authorization obtained to set up the ImoHS clinical trial will enable us, through its translational aspect, to validate our results obtained on an ex vivo model.

## Figures supplémentaires



### **Figure S1 : Caractérisation de l'état de différenciation du modèle *in vitro* HaCaT WT et KO.**

**A.** Analyse de l'expression protéique de l'IVL par Western Blot chez nos lignées WT et KO. **B.** Quantification relative de la protéine IVL chez nos lignées WT et KO par rapport aux HaCaT WT indifférenciés par Western Blot.



# **ANNEXES**



## CASE REPORT

### Successful combined antibiotic therapy with oral clindamycin and oral rifampicin for pyoderma gangrenosum in patient with PASH syndrome



Marie Lamiaux, DA,<sup>a</sup> Fadia Dabouz, MD,<sup>a</sup> Maud Wantz, MD,<sup>a</sup> Damien Lebas, MD,<sup>a</sup> Audrey Lasek, MD,<sup>a</sup> Domitille Courivaud, MD,<sup>a</sup> and Philippe Modiano, PhD<sup>a,b</sup>  
Lille, France

**Key words:** biotherapy; clindamycin; hidradenitis suppurativa; PASH syndrome; pyoderma gangrenosum; rifampicin.

#### INTRODUCTION

Pyoderma gangrenosum (PG) is a neutrophilic dermatitis, the prevalence of which is unknown. The only reported incidence in the literature estimates that there are 3 to 10 cases per million annually in the United Kingdom.<sup>1</sup> The association with digestive tract and inflammatory rheumatic disease, neoplasia, and endocrinopathies is well known.<sup>2</sup>

New autoinflammatory syndromes with PG have been described: PAPA syndrome, combining PG with pyogenic sterile arthritis and cystic acne; PASH syndrome, combining PG with cystic acne and hidradenitis suppurativa (HS); and PAPASH syndrome, combining PG with pyogenic sterile arthritis, acne, and HS.<sup>3</sup>

PAPA and PAPASH syndromes arise from mutations in the coding region of the proline-serine-threonine-phosphatase interacting protein 1 gene (*PSTPIP1*) resulting in the loss of inhibitory effect on the NALP3 inflammasome with production of interleukin (IL)-1 $\beta$ . For PASH syndrome, the only known anomaly is an increase in the number of CCTG repetitions in the *PSTPIP1* promoter, with no known functional impact.<sup>4</sup>

First-line treatment for PG is generally based on systemic corticosteroid therapy or antibiotics with an anti-inflammatory action (eg, dapsone and tetracyclines) or immunosuppressive drugs (eg, azathioprine, cyclosporine, and mycophenolate mofetil). Also introduced recently are anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  agents, anti-IL-1 (anakinra), and

#### Abbreviations used:

HS:	hidradenitis suppurativa
IL:	interleukin
PAPA:	pyoderma gangrenosum with pyogenic sterile arthritis and cystic acne
PAPASH:	pyoderma gangrenosum with pyogenic sterile arthritis, acne, and hidradenitis suppurativa
PASH:	pyoderma gangrenosum with cystic acne and hidradenitis suppurativa
PG:	pyoderma gangrenosum

finally anti-IL-12-IL-23 (ustekinumab) and anti-IL-17 (ixekizumab).

Studies investigating PASH syndrome found that cyclosporine and dapsone and biotherapy using anti-tumor necrosis factor- $\alpha$ <sup>5</sup> and anti-IL-1 (anakinra)<sup>1</sup> are effective. The clinical course is, however, marked by the risk of repeated relapses and resistance to conventional treatments for PG. Furthermore, any proposed therapeutic strategy should be effective against all 3 entities (ie, PG, HS, and cystic acne).

#### CASE REPORT

We report the case of a 59-year-old man with PASH syndrome without a *PSTPIP1* mutation. The patient had cystic acne since adolescence and HS since the age of 22. In 2013, he noted the appearance of an ulcer on the lateral aspect of his right leg that developed rapidly, progressively, and

From the Department of Dermatology, St Vincent de Paul Hospital<sup>a</sup> and Lille Catholic University.<sup>b</sup>

Funding sources: None.

Conflicts of interest: None declared.

Correspondence to: Marie Lamiaux, DA, Service de dermatologie, Centre Hospitalier St Vincent de Paul, Boulevard de Belfort, 59020 Lille, France. E-mail: marie.lamiaux@etu.univ-lille2.fr.

JAAD Case Reports 2018;4:17-21.

2352-5126

© 2017 by the American Academy of Dermatology, Inc. Published by Elsevier, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jidcr.2017.05.005>

## Annexe 2 : Article scientifique publié dans Archives of Clinical and Medical Case Reports

----- Message transféré -----

De : Sophia Bennet - Fortune Journals <[fortunejournals@gmail.com](mailto:fortunejournals@gmail.com)>

À : [nadira.delhem@univ-lille.fr](mailto:nadira.delhem@univ-lille.fr)

Cc : Fortune Journals <[contactfortunejournals@gmail.com](mailto:contactfortunejournals@gmail.com)>

Date : lundi 31 juillet 2023 à 11:15 +02:00

Objet : Reg: Article acceptance

Dear Nadira Delhem,

Greetings.

Your article entitled "Early Modification of the Immunometabolism in Patients with Meta-static Melanoma treated by Anti-PD-1 Immunotherapy", has been accepted for publication in the *Archives of Clinical and Medical Case Reports*. Please pay the publication charges by using card or bank transfer. We will send you the galley proof within 24 hours after making the payment.

[https://invoice.stripe.com/i/acct\\_1G1q42FBnXXO7b5w/live\\_YWNjdF8xR0lxNDJGQm5YWE83YjV3LF9PTWJMMjdZbXREUUVVIU9kTGFEb0U2VIY0T2k0SVZILDgxMzM1NjM10200Tuk9spQc?s=db](https://invoice.stripe.com/i/acct_1G1q42FBnXXO7b5w/live_YWNjdF8xR0lxNDJGQm5YWE83YjV3LF9PTWJMMjdZbXREUUVVIU9kTGFEb0U2VIY0T2k0SVZILDgxMzM1NjM10200Tuk9spQc?s=db)

Best Regards  
Sophia Bennet

### *Early Modification of the Immunometabolism in Patients with Meta-static Melanoma treated by Anti-PD-1 Immunotherapy*

Marie Lamiaux <sup>1\*</sup>, Guillaume Paul Grolez\*, Paola Corazao <sup>2</sup>, Olivier Morales <sup>1,3†</sup>, Olivier Ernst<sup>4</sup>, Philippe Marchetti <sup>3</sup>, Jérôme Kluza <sup>3</sup>, Laurent Mortier <sup>1,2\*</sup> and Nadira Delhem <sup>1\*†</sup>

**1** INSERM, CHU-Lille, U1189-ONCOTHAI-Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology, Univ-Lille, F-59000 Lille, France.

**2** Department of Dermatology, Claude Huriez hospital, CHU Lille, 59000 Lille, France

**3** INSERM UMR9020-UMR-S 1277 – Canther – Cancer Heterogeneity, PlasScity and Resistance to Thera-pies, F-59000, Lille,

**4** Department of Radiology, Claude Huriez hospital, CHU Lille, 59000 Lille, France

\* Equally contributed author

† Correspondence: [nadira.delhem@univ-lille.fr](mailto:nadira.delhem@univ-lille.fr) or [olivier.morales@cnrs.fr](mailto:olivier.morales@cnrs.fr); Tel.: ND +33(0)320965230, OM +33(0)320965231

#### **Abstract:**

**Background:** Currently, 60 to 70% of patients treated with anti-PD1 for metastatic melanoma have innate or acquired resistance under immunotherapy. However, new data demonstrate a link between metabolic changes and the acquisition of immune cell functions and could be used as a potential biomarker of the antitumour response.

**Methods:** This is a prospective and translational pilot study conducted in the Dermatology Department of Lille University Hospital. All included patients with advanced melanoma were treated with anti-PD-1 immunotherapy. Blood samples were taken before and 3 weeks after the first cycle of anti-PD-1. Tumour response was

assessed after 3 and 6 months of immunotherapy. **Results:** Patients were enrolled from March 2018 to March 2019. After 3 weeks of anti-PD-1, we found an early increase in reserve respiratory capacity in patients who responded to immunotherapy, while non-responders or patients with stable disease showed no changes. Interestingly, we also identified early changes in the OCR/ECAR ratio from one cycle of anti-PD-1 using patient PBMCs, which correlated linearly and significantly with tumour response at 6 months ( $p = 0.045$ ). **Conclusions:** Evaluation of the OCR/ECAR ratio from patient PBMCs could be used as a potential marker of early response to anti-PD-1 immunotherapy. It would help evaluate new protocols such as combinations or sequential treatments in melanoma, or even be applied in other types of cancers treated with anti-PD-1.

**Keywords:** Immunometabolism; Metastatic Melanoma; anti-PD-1; Immunotherapy

## 1. Introduction

Immune checkpoint inhibitors have revolutionised the prognosis of metastatic melanoma. Currently, anti-PD-1 immunotherapy is offered as a first-line treatment, alone or in combination. Unfortunately, only 30-40% of patients initially respond to treatment and some develop acquired resistance<sup>413</sup>. To date, there is no biomarker that predicts the response to PD-1 immunotherapy in melanoma. However, this is a critical element that would prevent patients from receiving inappropriate treatment, especially since anti-PD-1 immunotherapy is sometimes associated with severe toxicities. This time saving and efficiency in therapeutic care would also have a positive impact on healthcare costs.

Anti-PD-1 immunotherapy targets the inhibitory synapse between cancer cells expressing PD-L1 and T cells expressing the co-inhibitor PD-1 receptor in order to restore an anti-tumour response. It has been shown that the differentiation of T cells and the acquisition of their effector function depend on their ability to reprogram their metabolism. Indeed, following an activating signal, the T cell acquires an anabolic metabolism to ensure cell proliferation and cytokine production through aerobic glycolysis (Warburg effect), allowing a rapid supply of ATP<sup>414</sup>. In the tumour microenvironment (TME), effector T cells will therefore compete with cancer cells for the same nutrient which is glucose<sup>415</sup>. In addition, T cells chronically exposed to tumour antigens will overexpress PD-1 and other inhibitory receptors, leading to an exhausted state<sup>416</sup>. PD-1 inhibitors can reverse this dysfunctional state. Indeed, anti-PD-1 has been shown in experimental studies to increase the glycolytic capacity and

effector functions of TILs <sup>415,417</sup>. However, this effect depends on the PD-1 expression level in T cells. In the case of high PD-1 expression, the metabolic changes are too pronounced and the high oxidative stress will prevent the resumption of anabolic activity and block the effective capacities of T cells, even in the case of PD-1 inhibition <sup>418</sup>. PD-1 appears to be a key marker of the metabolic state of T cells and therefore reflects their functional capacity. It is also expressed on various immune cells such as NK cells, NKT cells, B cells, macrophages and some dendritic cell subsets during immune activation <sup>419</sup>. An increase in glycolysis has also been demonstrated when these different types of immune cells are activated <sup>420</sup>. It is therefore a hallmark of metabolic change during the process of immune cell activation and a true vector of the effector immune response. Recent studies have shown a correlation between the phenotypic changes of circulating T cells and the response to anti-PD-1 immunotherapy <sup>421</sup>. In addition, during anti-PD-1 treatment, tumour infiltrating lymphocytes present different clones than before treatment, indicating recruitment from peripheral blood <sup>422</sup>. Few studies have been based on the search for predictive factors in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); this is an easily achievable and renewable gesture during treatment in clinical practice with simple and rapid laboratory techniques. Therefore, we aimed to evaluate the early modifications of PD-1 pathway inhibitors on the immune and metabolic profile of PBMCs from patients with metastatic melanoma in order to identify a predictive marker of anti-tumour response.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Study design and patients**

This monocentric and prospective clinical trial, NCT02828202, started in March 2018 at the dermatology department of the University Hospital of Lille. Eligible patients were aged 18 years or older with unresectable stage III or IV melanoma treated with first-line PD-1 immunotherapy. Patients enrolled in the protocol provided written consent for the use of their clinical data in this study, including serum and blood markers. This study was the subject of an amendment to the Melbase (<https://melbase.aphp.fr/Melbase/>) project and received a favourable opinion from the Data Protection Committee.

Human whole blood samples were collected in 3 tubes of 8 mL each containing sodium heparin to isolate and analyse PBMCs before treatment initiation (T0) and then at 3 weeks (T1), 3 months (T2), 6 months (T3) and 1 year (T4) after treatment initiation (Fig. 1A). Immunotherapy doses (nivolumab 3mg/kg every 2 weeks or pembrolizumab

2mg/kg every 3 weeks) and clinical morphological assessments (computed tomography/CT scan and brain magnetic resonance imaging/MRI every 3 months) were performed according to the recommendations of the High Authority of Health.

## **2.2. Flow Cytometry Assays**

Blood was half diluted in phosphate-buffered saline (PBS) without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and then separated on a gradient of lymphocyte separation medium (MSL) (Eurobio, Les Ullis, France) by centrifugation at room temperature (RT) without brake. The plasma was rescued and preserved at -80°C until further use. The PBMC ring was then collected and washed twice in PBS before manual cell counting on Thoma cells under an inverted microscope (Eclipse TS100, Nikon, Amstelveen, The Netherlands). Cell viability was checked using trypan blue (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cell suspension was incubated with human FcR blocking reagent (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) for 10 minutes at RT and protected from light. Fresh PBMCs were then incubated for 15 minutes at RT and stained with fluorescence-conjugated anti-human monoclonal antibodies (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany):

- T cells markers: CD3 [phycoerythrin (PE)-Vio770], CD4 [VioBlue], CD8 [VioGreen];
- Immune activation markers: CD25 [VioBright-FITC], CD69 [PE Vio 770], CCR7 [PE];
- Inducible regulatory T cells markers: CD4 [VioBlue], CD18 [FITC], CD49b [PE-Vio770].

The use of control isotypes eliminated the need for cellular autofluorescence. Analysis was performed on live cells using a fluorescent deoxyriboNucleic acid (DNA): 7-aminoactinomycin D (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a Canto II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Data acquisition was performed using Diva software and these data were analysed using FlowJo Software version 2.9.0 (Ashland, OR, USA).

## **2.3. Seahorse Metabolic Assays**

75,000 cells per well were seeded in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 20% glucose, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate and then plated on the plate (FluxPaks, Agilent Seahorse XF24 kit, Les Ullis, France ) previously coated with Cell-tak (Corning, Borre, France). Two consecutive centrifugations were performed (1 min, 450 rpm, then plate

inversion and recovery 1 min, at 650 rpm, at RT). In vitro oxygen consumption and extracellular acidification rates were measured using the Seahorse XFe96 analyser. First, three basal measurements of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were performed (3-0-3 mix-wait-measure cycle). Oligomycin (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was then injected at 1  $\mu$ M. Then, a first injection of carbonyl cyanide-4-phenylhydrazone/FCCP (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 0.55  $\mu$ M was performed, followed by a second FCCP injection at a final concentration of 1.16  $\mu$ M. Finally, an injection combining 100  $\mu$ M rotenone and 1.0  $\mu$ M antimycin A (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) was made. 2 measurements were taken after each injection.

#### **2.4. Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)**

The sandwich ELISA was used to quantify cytokine levels associated with the Th1 (IL-2, IFN $\gamma$ ) and immunosuppressive (IL-10, TGF $\beta$ /Transforming Growth Factor Beta) responses. ELISA kits for the detection of each cytokine were purchased from BD (BD Pharmingen <sup>TM</sup>, San Jose, CA, USA). Assays were performed in triplicate with plasma sample added to each well according to the manufacturer's instructions. On each plate, an 11-point standard range curve was performed by half training of the recombinant cytokine (BD Pharmingen <sup>TM</sup>, San Jose, CA, USA) with a maximum concentration of 2500  $\mu$ g/ml. Plates were read using a Multiskan spectrophotometer at 492 nm powered by Ascent<sup>TM</sup> Software v2.06 (Multiskan RC Thermo Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Protein concentrations were expressed in pg/mL.

#### **2.5. Statistical analysis**

We used Student's t-test to evaluate the correlation coefficient between the OCR/ECAR ratio of patients' PBMCs after one cycle of anti-PD-1 and the 6-month tumour response to immunotherapy according to RECIST criteria version 1.1. Statistical significance was defined as  $p \leq 0.05$ . All analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism (version 8.0) for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA).

### **3. Results**

#### **3.1. Patient and Biological characteristics**

### **3.1.1. Patient characteristics**

This pilot study included five patients between 03/2018 and 03/2019 at the Dermatology Clinic, University and Hospital Centre of Lille. All patients gave written informed consent. Our study focused on early changes under immunotherapy and included only T0 and T1 (Figure 1A). Regarding patient characteristics (Figure 1B), the mean age was 65.2 years, with a single younger patient aged 40 years, and the sex ratio was 3:2 (3 females and 2 males). One patient had type 2 diabetes treated with oral hypoglycaemic agents and 2 patients had dyslipidaemia treated with statins. Regarding tumour characteristics (Figure 1C), four patients had cutaneous melanoma (2 superficial spreading melanoma and 2 nodular melanoma) and in one patient the primitive was unknown. All patients had advanced metastatic melanoma with 4 patients at stage M1c or M1d. All patients received first-line immunotherapy with anti-PD-1, four patients received pembrolizumab and one patient received nivolumab.

### **3.1.2. Biological characteristics**

Regarding serum and blood markers (Figure 1D), C-reactive protein was elevated to 105 mg/L (norm < 5 mg/L) at T0 in P2 and returned to a subnormal level at T1. There was mild initial lymphopenia in 3 patients (P1, P3, and P5) with near normalisation at T1. P1 and P2 had a high initial monocyte count (highest norm at 710/mm<sup>3</sup>). At T1, this increase was accentuated in P1, whereas the monocyte count was normalised in P2. The initial level of lactate dehydrogenase was high at P2, P4 and P5. This level was normalised in P2 and P4 at T1, whereas an increase was observed in P1 and P5 3 weeks after the start of immunotherapy.

## **3.2. Early modification of immune monitoring following the introduction of anti-PD-1 immunotherapy**

We divided the patients into 3 groups according to their tumour response to immunotherapy at 6 months based on RECIST 1.1 criteria, i.e. tumour response, stable disease or tumour progression. The responder group corresponded to P2 and P3, the non-responder group included P1 and P5, while P4 was part of the stable disease group. Looking at the frequency of the initial lymphocyte populations, we see that they represent about 40% of the PBMCs in the responder group and are mainly represented by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Figure 2A and 2B). In T1, after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy, the frequency of lymphocyte populations in the responder group is stable or even shows a slight increase. In the non-responder group, the initial

frequency of lymphocyte populations is lower or similar to that of the responder group. However, at T1, this proportion either remains low or shows a significant decrease after one cycle of immunotherapy. Indeed, P1 showed a significant decrease of almost half of its lymphocyte population 20.5% versus 40.7% (Figure 2A), in particular CD3+CD4+ 13.28% versus 29.75% (Figure 2B). While P5 had a low lymphocyte count of 20% at T0, this did not change after the start of immunotherapy (Figure 2A). P4 in the stable disease group shows a different profile with a low initial lymphocyte count but a marked increase after anti-PD-1 treatment. CD3+CD8+ T cells presents also a higher rate at T1 in the stable patient group whereas it remains stable in the responder group who presented the highest rate at T0 and in the non-responder one (Figure 2C). Looking at the membrane markers of T-cell activation (Figure 3), we found that the non-responder group showed an overall stability of the early (CD25 and CD69) and late (CCR7) activation markers after anti-PD-1 treatment compared to T0. While P2 and P4 showed an increase of the early activation marker (CD25) after one anti-PD-1 cycle and stability of the other markers (CCR7 and CD69) compared to T0. Analysis of the CD25 marker at P3 cannot be interpreted. Thus, there were early changes in the frequency of lymphocyte populations and expansion capacity after one anti-PD-1 cycle. However, we didn't see any early change in the expression of lymphocyte activation markers after one cycle of immunotherapy.

Analysis of the cytokine profile (Figure 4) revealed that at P1 the plasma concentration of TGF $\beta$  increased strongly by a factor of 4 after one cycle of immunotherapy (T0: 692, 69  $\mu$ g/ml, T1: 3740. 31  $\mu$ g/ml) associated with moderate decreases in the effector cytokines INF $\gamma$  (T0: 85.36  $\mu$ g/ml, T1: 73.73  $\mu$ g/ml) and IL-2 (T0: 1652.10  $\mu$ g/ml, T1: 1118.20  $\mu$ g/ml). IL-10 increased slightly with a concentration of 11.04  $\mu$ g/ml before and 16.46  $\mu$ g/ml after treatment, while P2 showed a decrease in plasma TGF $\beta$  concentration between T0 and T1 from 1544.38  $\mu$ g/ml to 1077.61  $\mu$ g/ml. For the cytokines IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-10, no clear change in plasma concentration was observed before and after a cycle of anti-PD-1. The secretoma analyses of the other three patients (P3, P4 and P5) did not show a cytokine profile associated with response to anti-PD-1 immunotherapy. The maintenance or even the expansion of the lymphocyte populations has been observed after a single course of anti-PD-1 immunotherapy in responder patients. However, no early change in the production of cytokines has been demonstrated in particular for the immunostimulatory cytokine IFN $\gamma$ .

In contrast, in non-responders, the first cycle of immunotherapy does not appear to restore an immune response. Indeed, there is a decrease in T lymphocyte populations,

a lack of change in lymphocyte activation markers and a high plasma level of the immuno-suppressive cytokine TGB $\beta$ .

### **3.3. Immunometabolism assessment**

#### **3.3.1. Modification of the metabolic profile of immune populations under anti-PD-1 immunotherapy**

We performed a metabolic evaluation of patient PBMCs before and after a cycle of anti-PD-1 immunotherapy (Figure 5). We measured the Oxygen Consumption Rate (OCR), which is an indicator of oxygen consumption and reflects the activity of oxidative phosphorylation, and the Extracellular Acidification Ratio (ECAR), which represents the acidification of the extracellular medium and allows indirect measurement of cellular glycolytic activity. In non-responding patients, the evolution of the initial OCR rate after immunotherapy treatment is reversed. Indeed, for P1 there is a significant increase of +16.64% of basal OCR in T1 with 282.11 pmol.min<sup>-1</sup> compared to an average basal rate of 235.17 pmol.min<sup>-1</sup> (Figure 5AB). Whereas P5 shows a decrease of -26.37% (235.80 pmol.min<sup>-1</sup> at T0 and 173.61 pmol.min<sup>-1</sup> at T1) (Figure 5AB). Furthermore, when PBMCs were exposed to increasing concentrations of FCCPs, a decoupling agent of the mitochondrial respiratory chain to assess the maximum respiratory capacity of the cells, no improvement was observed at T1 compared to T0 for P1 or even a decrease in this capacity between T1 and T0 for P5 (Figure 5A). In terms of ECAR, P1 and P5 show a decrease of almost half at T1 with a decrease of -41.24% and -60.33% respectively compared to T0 (Figure 5C). Thus, the OCR/ECAR ratio of progressors doubles after a single cycle of immunotherapy compared to T0, suggesting an increase in the oxidative phosphorylation activity of PBMCs from immuno-therapy patients (Figure 5D).

On the contrary, a significant increase in ECAR rate was observed in responders after a single cycle of immunotherapy with +43.76% and +61.11% at T1 for P2 and P3, respectively (Figure 5C). The basal OCR rate shows a moderate but significant decrease at T1 for P2 with a mean basal rate of 274.46 pmol.min<sup>-1</sup> at T0 compared to 258.73 pmol.min<sup>-1</sup> at T1 and a more marked decrease for P3 with a mean basal rate of 326.71 pmol.min<sup>-1</sup> compared to 211.33 pmol.min<sup>-1</sup> at T1 (Figure 5AB). When FCCP is added to PBMCs at increasing concentrations, no improvement in maximal respiratory capacity is observed after immunotherapy treatment for P1, whereas P5 shows a marked increase in this capacity at T1 compared to T0 (Figure 5A). The OCR/ECAR ratio showed a significant decrease of more than half of the initial ratio

with -58.95% and -62.5% for P2 and P3 respectively after a single immunotherapy cycle (Figure 5D). Thus, it appears that PBMCs from responder patients modified their metabolic programme in favour of glycolysis after a single cycle of immunotherapy, while maintaining oxidative phosphorylation activity. This cellular metabolic profile corresponds to that of an immune activation profile.

Looking at the profile of P4, whose disease is stable, we see that the basal OCR rate is stable between T0 and T1, as is the maximal respiratory capacity after the addition of FCCP (Figure 5AB). However, the rate of ECAR more than doubled between T1 and T0 with a rate of 66.50 mpH.min<sup>-1</sup> and 29.11 mpH.min<sup>-1</sup> respectively (Figure 5C). The OCR/ECAR ratio shows a slight decrease after immunotherapy treatment of -26.27% compared to T0.

Moreover, we calculated the Maximum Respiratory Capacity and the Spare Capacity for each patient at the different time points. No evident profile was observed except for the responders where both indicators increased upon treatment (Figure S1).

In contrast, the PBMCs of the non-responding patient maintained oxidative phosphorylation as the main source of bioenergy. The immune cells did not enter the glycolysis pathway after an anti-PD-1 cycle, which is the main metabolic pathway during immune activation. Thus, it appears that the PBMCs of the responder group had metabolic changes necessary for cellular activation and acquisition of effector function, whereas the PBMCs of the non-responder group did not show metabolic changes after a single cycle of anti-PD-1. Patient 4 shows an intermediate metabolic profile with a slight modification of the OCR/ECAR ratio towards a tendency to activate glycolysis and maintain oxidative phosphorylation.

A CT scan assessment of tumour response to immunotherapy was performed at baseline, 3 months and 6 months after the start of treatment (Figure S2), the response was defined according to RECIST version 1.1 criteria (Figure 6). At 3 months, P1 (progressor) showed tumour progression with a +40% increase in tumour volume (Figure 6A). At 6 months, tumour progression worsened with a tumour increase of +60% (Figure 6A), while P2 (responder) showed tumour stability at 3 months with a tumour volume decrease of +20% (Figure 6A). The evolution of P2 at 6 months was favourable with a partial response and a tumour volume loss of -30% (Figure 6A).

Comparing our results obtained on the metabolic evolution of PBMCs and the tumour response under immunotherapy, there appears to be a linear and significant correlation between changes in the OCR/ECAR ratio of PBMCs after one cycle of immunotherapy and the best overall tumour response at 6 months in patients with metastatic

melanoma with  $p = 0.0455$  (Figure 6B). It appears that early changes in immune cell metabolism after a single cycle of anti-PD-1 immunotherapy may correlate with the anti-tumour response to immunotherapy in melanoma.

#### 4. Discussion

We conducted a pilot study to identify early immunometabolic markers of response to anti-PD-1 immunotherapy in patients with metastatic melanoma. Of the 5 patients, one was younger and belonged to the responder group. Patient 1 had metformin-treated diabetes but was in the non-responder group. Metformin has indeed been the subject of several publications in the oncology community, as this molecule could have an anti-tumour effect in addition to its hypoglycaemic action. Several clinical trials suggest that metformin improves the prognosis of cancer patients via the AMP kinase pathway and its effect on mitochondrial oxidative phosphorylation <sup>423,424</sup>. However, other studies have refuted the effect of metformin on improving patient survival <sup>425</sup>. At present, the relationship between metformin and cancer prognosis remains controversial. We have shown an early change in the frequency of peripheral lymphocyte populations after a single cycle of anti-PD-1 immunotherapy. Indeed, stable or responder patients on anti-PD-1 have shown an early expansion of both CD4+ and CD8+ lymphocyte populations. While non-responders/progressors have shown stability or even a decrease in their CD3+ population following a cycle of anti-PD-1 immunotherapy.

We have chosen to perform our analyses on patient peripheral blood in order to avoid the often-invasive intratumoral sampling and to facilitate integration into clinical practice. A recent study has shown that the lymphocyte clonotypes found in the tumour and non-mal adjacent tissue can also be detected in peripheral blood <sup>426</sup>. They suggest that intratumoral T cells, particularly in responding patients, are reconstituted from non-depleted cells from sites outside the tumour <sup>426</sup>. Indeed, the Yost team found that the majority of TILs had different TCRs after anti-PD-1 treatment compared to before treatment, suggesting T cell recruitment <sup>427</sup>. A significant number of these new tumour-specific lymphocytes involved in anti-PD-1 immunotherapy have also been shown to originate from the peripheral blood <sup>422,427</sup>, and it has also been shown that anti-PD-1 can modify the immune populations of the peripheral blood, in particular by revitalising CD4+ and CD8+ T lymphocytes, particularly with a "memory" or "central memory" phenotype <sup>428</sup>. Consequently, anti-PD-1 immunotherapy would have a role in the recruitment of new tumour-specific T cells, rather than in boosting the effector capacity of pre-existing TIL, whose activation and chronic exhaustion severely limit their

regenerative capacity.

Looking at the cytokine changes, responding patients maintained a stable plasma IFN $\gamma$  concentration, while TGF $\beta$  concentration decreased after one cycle of anti-PD-1, which tends to favour an anti-tumour response. Conversely, non-responding or stable patients showed a decrease in plasma IFN $\gamma$  levels and high TGF $\beta$  levels after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy, revealing an immunosuppressive profile. One team has shown that IFN $\gamma$  can induce the expression of several genes that are necessary but not sufficient for clinical response to anti-PD-1<sup>429</sup>. In addition, TGF $\beta$  can be secreted by melanoma cells to evade the immune system and promote cancer progression<sup>430</sup>. These data do not apply to patient 5 who, despite tumour progression, showed an increase in the plasma concentration of IFN $\gamma$  and a near-zero level of TGF $\beta$  after a cycle of immunotherapy. This can be explained by the paradoxical role of IFN $\gamma$ , which is able to directly regulate the ligands PD-L1 and PD-L2 in tumour, immune, stromal cells and even on tumour exosomes<sup>431</sup>, thus promoting the inhibitory synapse with PD-1 expressed on TILs, resulting in a downregulation of the cytotoxic response, also called feedback loop. Other studies have shown that plasma cytokine levels may correlate with the response to immune control inhibitors such as IL-8 in melanoma<sup>432</sup>. It has also been shown that initial levels of IFN $\gamma$ , IL-6 and IL-10 are higher in non-responders to nivolumab<sup>433</sup>. However, no cytokine biomarker is currently used and validated in clinical practice to predict anti-PD-1 response. In our cohort, no marker of cytokine response to anti-PD-1 immunotherapy was identified.

We have shown a significant increase in the respiratory reserve capacity of PBMCs following a cycle of anti-PD-1 immunotherapy in responder patients. Respiratory reserve capacity is the difference between the basal respiratory rate and the maximal respiratory rate; it measures the metabolic capacity of the cell to meet the additional energy demands associated with various stresses such as physical activity, infection, etc. It is an important cellular bioenergetic marker that is sensitive to the presence or absence of stress. It is an essential cellular bioenergetic marker that is more sensitive than maximal respiratory capacity. It has been shown that the higher the reserve capacity, the better the cell survival in the event of hypoxia<sup>434</sup>. The effector function of T cells in chronic diseases such as cancer has been shown to be maintained in the long term by mitochondrial activity. It appears that it is the sustained activation of the intracellular Akt signalling pathway by the tumour microenvironment that is responsible for the suppression of OXPHOS within T lymphocytes, leading to a decrease in reserve respiratory capacity<sup>435</sup>. As a result, the T lymphocyte is no longer able to adapt to

different stresses and is unable to respond even after stimulation with anti-PD-1 due to lack of energy resources. We have therefore shown that there is a significant increase in the reserve respiratory capacity of PBMCs in patients who respond to anti-PD-1 immunotherapy. This demonstrates the early ability of immune cells to respond to stimulation by the immune checkpoint inhibitor and correlates with the clinical anti-tumour response assessed at 6 months.

In the 5 patients, we found an early and linear correlation between the OCR/ECAR ratio measured in PBMCs before and after a cycle of anti-PD-1 immunotherapy and the best tumour response achieved during treatment. It has been shown that during acute infection, alterations in T cell bioenergetics occur early with reduced glucose utilisation despite activation of anabolic pathways. This metabolic dysfunction has been linked to the PD-1 signalling pathway<sup>418</sup>. When antigenic stimulation becomes chronic (cancer/infection), PD-1 expression is higher on T cells associated with an established exhausted phenotype. In this situation, it has been shown that inhibition of PD-1 does not restore the metabolic pathways of the cell associated with the accumulation of other factors. The cell is thus maintained in a state of irreversible dysfunction<sup>436</sup>.

Using the Seahorse Extracellular Flux Analyser technique, it is possible to measure the activity of glycolysis and oxidative phosphorylation in real time and evaluate the bioenergetics of PBMCs before and after treatment. We have shown that the lower the OCR/ECAR ratio, the more it reflects the anabolic metabolism of the immune cells, supporting their effector function. We can assess early, after a single cycle of anti-PD-1 immunotherapy, the ability of the latter to activate immune populations and induce an anti-tumour response. There appears to be a linear correlation between changes in PBMC metabolism, including the induction of anabolic metabolism, which correlates with an anti-tumour response. Consequently, the variable response of patients to anti-PD-1 immunotherapy could be explained by the ability of immune cells to reprogram their metabolism. In fact, at an advanced stage of exhaustion, the cells are no longer able to meet their bioenergetic needs and the major metabolic stress they are under does not allow them to restore their effector functions, despite the stimulation provided by immunotherapy. Furthermore, this technique would be easily applicable in clinical practice. Thus, performing this evaluation in a larger patient population could provide a threshold for the OCR/ECAR ratio that could determine the response to anti-PD-1 immunotherapy after only one cycle in metastatic melanoma. This study could also be used to assess the response of melanoma to RAF- and MEK-targeted therapies. If

validated, these predictive biomarkers could be used to evaluate a new therapeutic protocol, such as sequential or combination immunotherapy and targeted therapies in melanoma and, on a larger scale, in other cancers treated with anti-PD-1 immunotherapy.

**Supplementary Materials:** Figure S1: Analysis of changes in other metabolic markers in immune populations before and after a cycle of anti-PD-1 immunotherapy. And Figure S2: CT scan of tumour response from target lesions according to RECIST criteria version 1.1, initial assessment and 6 months of onset of anti-PD1 immunotherapy.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.D. and L.M.; methodology, G.P.G., P.C., O.M., J.K. and P.M.; validation, N.D. and L.M.; formal analysis, M.L., G.P.G., P.C., O.E. and J.K.; investigation, M.L., G.P.G. and O.M.; resources, P.M., L.M., O. E.; data curation, M.L., G.P.G and P. C.; writing—original draft preparation, M.L., G. P. G., P.C., O. M., L.M. and N. D. ; writing—review and editing O. M., L.M. and N. D.; supervision, L.M. and N. D.; project administration, L.M. and N. D.; funding acquisition, L.M. and N. D.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

**Funding:** This research was funded by Canceropôle Nord-Ouest, CHRU Lille, CLIP2 Lille and Novartis. The APC was funded by ONCOTHA1 research unit.

**Institutional Review Board Statement:** “The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Claude Huriez hospital, CHU Lille (clinical trial, NCT02828202, February 15, 2019). This study was the subject of an amendment to the Melbase (<https://melbase.aphp.fr/Melbase/>) project and received a favourable opinion from the Data Protection Committee”

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.”

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to

ethical reasons.

**Acknowledgments:** We thank our colleagues at U1189-ONCOTHA1-Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology who provided an overview and expertise that greatly helped the research, although they may not agree with all the interpretations/conclusions of this document. We thank the team of Professor Marchetti, INSERM UMR9020-UMR-S 1277, for the help on the metabolic part with the Seahorse technique. We also thank the entire Melbase (<https://melbase.aphp.fr/Melbase/>) project team, whose study is part of an amendment.

**Conflicts of Interest:** “The authors declare no conflict of interest.”

## References

1. Topalian, S.L.; Drake, C.G.; Pardoll, D.M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 450–461, doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001.
2. Thommen, D.S.; Schumacher, T.N. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 547–562, doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012.
3. Chang, C.-H.; Qiu, J.; O’Sullivan, D.; Buck, M.D.; Noguchi, T.; Curtis, J.D.; Chen, Q.; Gindin, M.; Gubin, M.M.; van der Windt, G.J.W.; et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **2015**, *162*, 1229–1241, doi:10.1016/j.cell.2015.08.016.
4. Herbel, C.; Patsoukis, N.; Bardhan, K.; Seth, P.; Weaver, J.D.; Boussiotis, V.A. Clinical Significance of T Cell Metabolic Reprogramming in Cancer. *Clin Transl Med* **2016**, *5*, 29, doi:10.1186/s40169-016-0110-9.
5. Patsoukis, N.; Bardhan, K.; Chatterjee, P.; Sari, D.; Liu, B.; Bell, L.N.; Karoly, E.D.; Freeman, G.J.; Petkova, V.; Seth, P.; et al. PD-1 Alters T-Cell Metabolic Reprogramming by Inhibiting Glycolysis and Promoting Lipolysis and Fatty Acid Oxidation. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6692, doi:10.1038/ncomms7692.
6. Bengsch, B.; Johnson, A.L.; Kurachi, M.; Odorizzi, P.M.; Pauken, K.E.; Attanasio, J.; Stelekati, E.; McLane, L.M.; Paley, M.A.; Delgoffe, G.M.; et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* **2016**, *45*, 358–373, doi:10.1016/j.immuni.2016.07.008.
7. Schildberg, F.A.; Klein, S.R.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* **2016**, *44*, 955–972, doi:10.1016/j.immuni.2016.05.002.
8. O’Neill, L.A.J.; Kishton, R.J.; Rathmell, J. A Guide to Immunometabolism for

Immunologists. *Nat Rev Immunol* **2016**, *16*, 553–565, doi:10.1038/nri.2016.70.

9. Huang, A.C.; Postow, M.A.; Orlowski, R.J.; Mick, R.; Bengsch, B.; Manne, S.; Xu, W.; Harmon, S.; Giles, J.R.; Wenz, B.; et al. T-Cell Invigoration to Tumour Burden Ratio Associated with Anti-PD-1 Response. *Nature* **2017**, *545*, 60–65, doi:10.1038/nature22079.
10. Callahan, M.K.; Wolchok, J.D. Recruit or Reboot? How Does Anti-PD-1 Therapy Change Tumor-Infiltrating Lymphocytes? *Cancer Cell* **2019**, *36*, 215–217, doi:10.1016/j.ccell.2019.08.009.
11. Coyle, C.; Cafferty, F.H.; Vale, C.; Langley, R.E. Metformin as an Adjuvant Treatment for Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Oncol* **2016**, *27*, 2184–2195, doi:10.1093/annonc/mdw410.
12. Xu, H.; Chen, K.; Jia, X.; Tian, Y.; Dai, Y.; Li, D.; Xie, J.; Tao, M.; Mao, Y. Metformin Use Is Associated With Better Survival of Breast Cancer Patients With Diabetes: A Meta-Analysis. *Oncologist* **2015**, *20*, 1236–1244, doi:10.1634/theoncologist.2015-0096.
13. Kordes, S.; Pollak, M.N.; Zwinderman, A.H.; Mathôt, R.A.; Weterman, M.J.; Beeker, A.; Punt, C.J.; Richel, D.J.; Wilmink, J.W. Metformin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *Lancet Oncol* **2015**, *16*, 839–847, doi:10.1016/S1470-2045(15)00027-3.
14. Wu, T.D.; Madireddi, S.; de Almeida, P.E.; Banchereau, R.; Chen, Y.-J.J.; Chitre, A.S.; Chiang, E.Y.; Iftikhar, H.; O’Gorman, W.E.; Au-Yeung, A.; et al. Peripheral T Cell Expansion Predicts Tumour Infiltration and Clinical Response. *Nature* **2020**, *579*, 274–278, doi:10.1038/s41586-020-2056-8.
15. Yost, K.E.; Satpathy, A.T.; Wells, D.K.; Qi, Y.; Wang, C.; Kageyama, R.; McNamara, K.L.; Granja, J.M.; Sarin, K.Y.; Brown, R.A.; et al. Clonal Replacement of Tumor-Specific T Cells Following PD-1 Blockade. *Nat Med* **2019**, *25*, 1251–1259, doi:10.1038/s41591-019-0522-3.
16. Yamaguchi, K.; Mishima, K.; Ohmura, H.; Hanamura, F.; Ito, M.; Nakano, M.; Tsuchihashi, K.; Ota, S.-I.; Wada, N.; Uchi, H.; et al. Activation of Central/Effector Memory T Cells and T-Helper 1 Polarization in Malignant Melanoma Patients Treated with Anti-Programmed Death-1 Antibody. *Cancer Sci* **2018**, *109*, 3032–3042, doi:10.1111/cas.13758.
17. Ayers, M.; Lunceford, J.; Nebozhyn, M.; Murphy, E.; Loboda, A.; Kaufman, D.R.; Albright, A.; Cheng, J.D.; Kang, S.P.; Shankaran, V.; et al. IFN- $\gamma$ -Related MRNA Profile Predicts Clinical Response to PD-1 Blockade. *Journal of Clinical Investigation* **2017**, *127*, 2930–2940, doi:10.1172/JCI91190.
18. Yang, Z.; Qi, Y.; Lai, N.; Zhang, J.; Chen, Z.; Liu, M.; Zhang, W.; Luo, R.; Kang, S. Notch1 Signaling in Melanoma Cells Promoted Tumor-Induced Immunosuppression via Upregulation of TGF-B1. *J Exp Clin Cancer Res* **2018**, *37*, 1, doi:10.1186/s13046-017-0664-4.
19. Garcia-Diaz, A.; Shin, D.S.; Moreno, B.H.; Saco, J.; Escuin-Ordinas, H.;

- Rodriguez, G.A.; Zaretsky, J.M.; Sun, L.; Hugo, W.; Wang, X.; et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* **2017**, *19*, 1189–1201, doi:10.1016/j.celrep.2017.04.031.
20. Sanmamed, M.F.; Perez-Gracia, J.L.; Schalper, K.A.; Fusco, J.P.; Gonzalez, A.; Rodriguez-Ruiz, M.E.; Oñate, C.; Perez, G.; Alfaro, C.; Martín-Algarra, S.; et al. Changes in Plasma Interleukin-8 (IL-8) Levels Reflect and Predict Response to Anti-PD-1 Treatment in Melanoma and Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Ann Oncol* **2017**, *28*, 1988–1995, doi:10.1093/annonc/mdx190.
21. Yamazaki, N.; Kiyohara, Y.; Uhara, H.; Iizuka, H.; Uehara, J.; Otsuka, F.; Fujisawa, Y.; Takenouchi, T.; Isei, T.; Iwatsuki, K.; et al. Cytokine Biomarkers to Predict Antitumor Responses to Nivolumab Suggested in a Phase 2 Study for Advanced Melanoma. *Cancer Sci* **2017**, *108*, 1022–1031, doi:10.1111/cas.13226.
22. Pflieger, J.; He, M.; Abdellatif, M. Mitochondrial Complex II Is a Source of the Reserve Respiratory Capacity That Is Regulated by Metabolic Sensors and Promotes Cell Survival. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1835, doi:10.1038/cddis.2015.202.
23. Scharping, N.E.; Menk, A.V.; Moreci, R.S.; Whetstone, R.D.; Dadey, R.E.; Watkins, S.C.; Ferris, R.L.; Delgoffe, G.M. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* **2016**, *45*, 374–388, doi:10.1016/j.immuni.2016.07.009.
24. Schietinger, A.; Philip, M.; Krisnawan, V.E.; Chiu, E.Y.; Delrow, J.J.; Basom, R.S.; Lauer, P.; Brockstedt, D.G.; Knoblaugh, S.E.; Hämmerling, G.J.; et al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* **2016**, *45*, 389–401, doi:10.1016/j.immuni.2016.07.011.

## Figure Legends

**Figure 1: Chronology of the study procedure and clinicobiological characteristics of the patients.** Timeline for the clinical study of blood sampling times and CT evaluations at the initiation of anti-PD-1 immunotherapy (A). Patient characteristics (B). Table of type and extent of melanoma (C). Table of patient biological data (D).

**Figure 2: Analysis of T-cells profile before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy.** Flow cytometry data comparing the modification of CD3+ (A), CD3+CD4+ (B) and CD3+CD8+ (C) T-cells between T0 and T1 in the responders group, the stable disease group and the non-responders group.

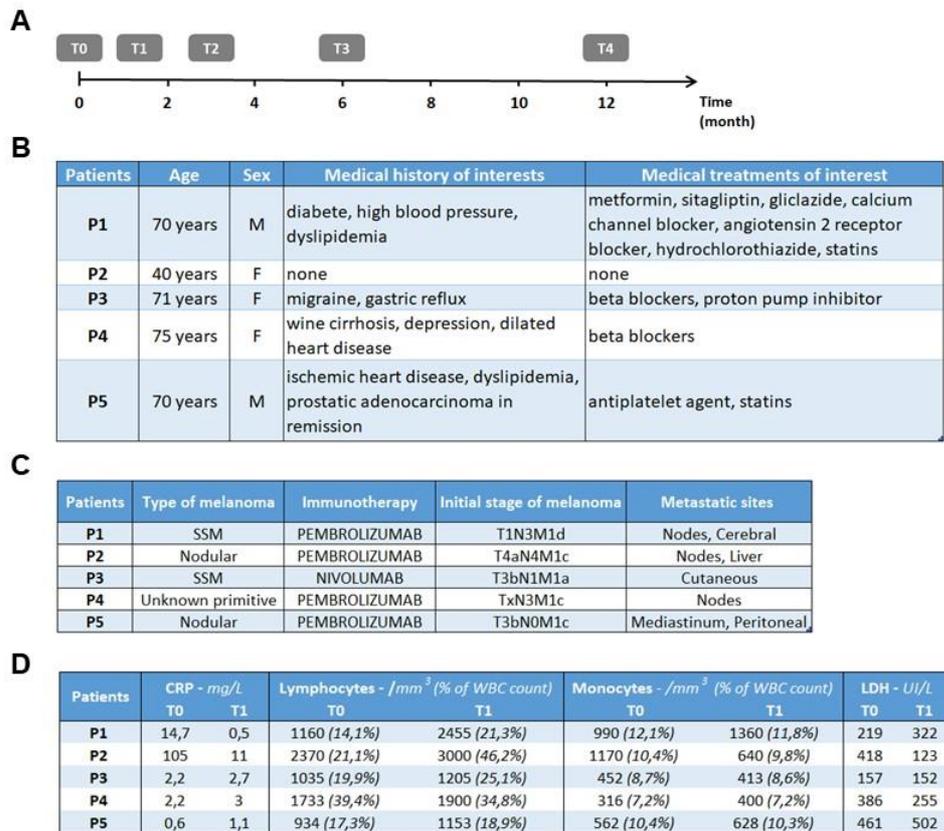
**Figure 3: Analysis of modification of T-cells activation markers before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy.** Flow cytometry data comparing the modification of CD69, CCR7 and CD25 activation state markers in the CD3+CD4+ T-cells (A) and CD3+CD8+ T-cells (B) between T0 and T1 in each group.

**Figure 4: Analysis of modification the cytokine levels in plasma before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy.** DAS-ELISA data comparing the modification of IFN $\gamma$  (A), IL-2 (B), IL-10 (C) and TGF $\beta$  (D) between T0 and T1 in the responders group, the stable disease group and the non-responders group.

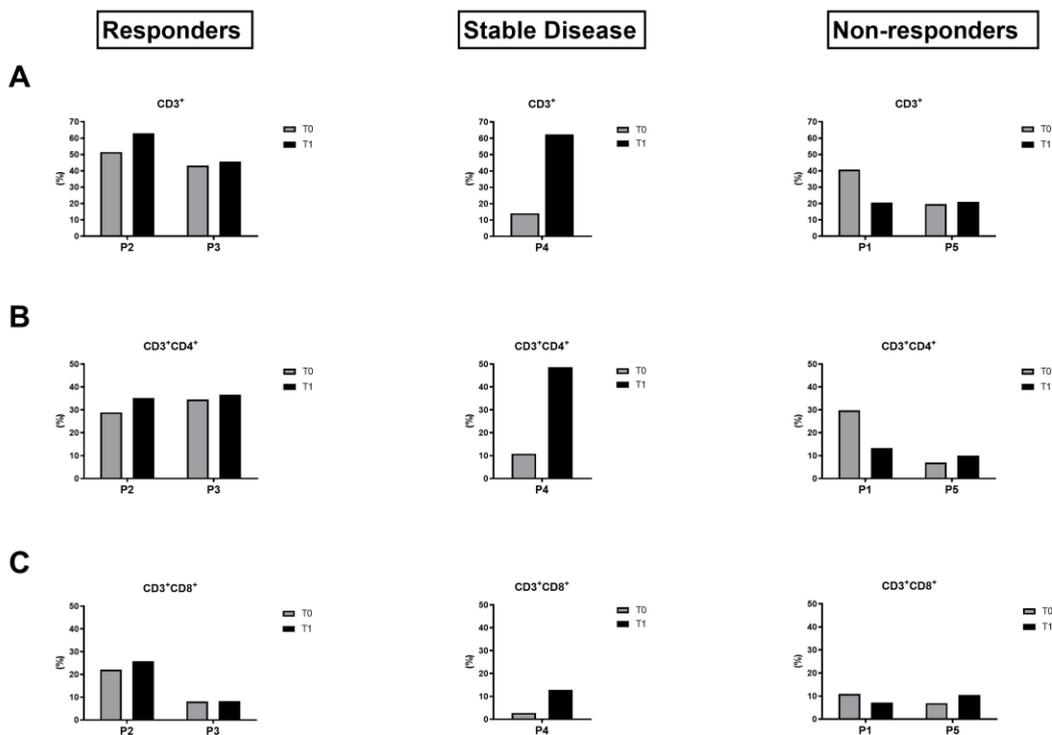
**Figure 5: Analysis of the metabolic changes of immune populations before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy.** Kinetic OCR response of PBMCs to oligomycin (1  $\mu$ M), FCCP at low concentration (0,55  $\mu$ M), FCCP at high concentration (1,16  $\mu$ M) and rotenone/antimycin A (100  $\mu$ M/1  $\mu$ M) in each group (A). The initial OCR rate (B), the initial ECAR rate (C) and the OCR / ECAR ratio (D) was calculated before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy in each group. The experiment was done in triplicate, each data representing mean  $\pm$  SD, \*\*\*p < 0,001, n=21.

**Figure 6: Analysis of the correlation between the evolution of the tumour response and the metabolic modifications of the immune populations under anti-PD-1 immunotherapy.** (A) Calculation of the tumour response of target lesions according to RECIST version 1.1 criteria, initial evaluation then at 3 months and 6 months of start of anti-PD-1 immunotherapy in each group. (B) Results of regression analysis between fold change ratio OCR/ECAR at T0 and T1 and the best overall response (BOR) with calculation of the linear correlation coefficient.

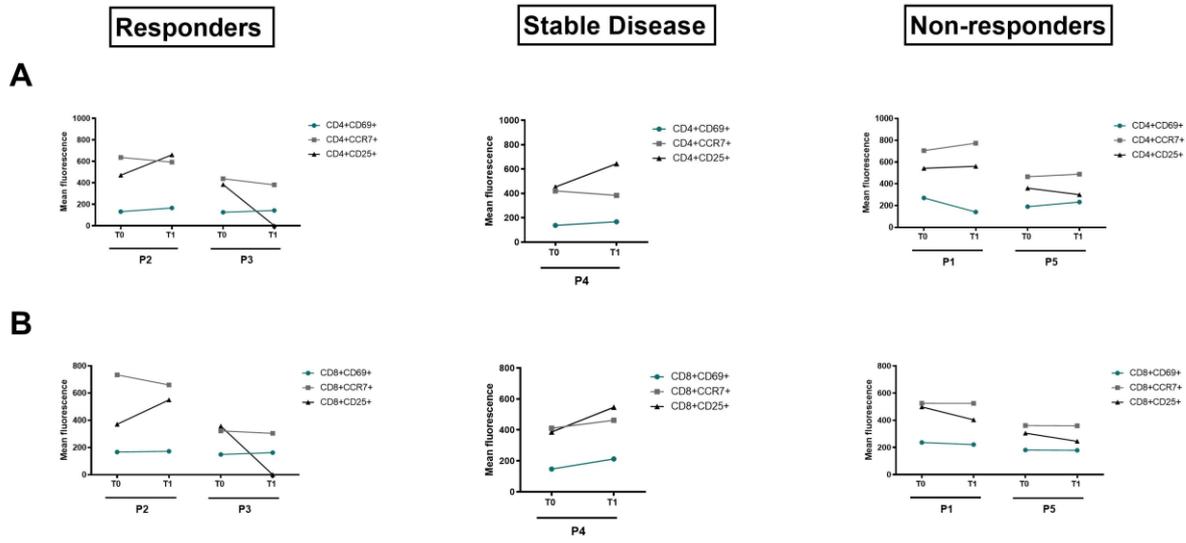
**Figure 1.**



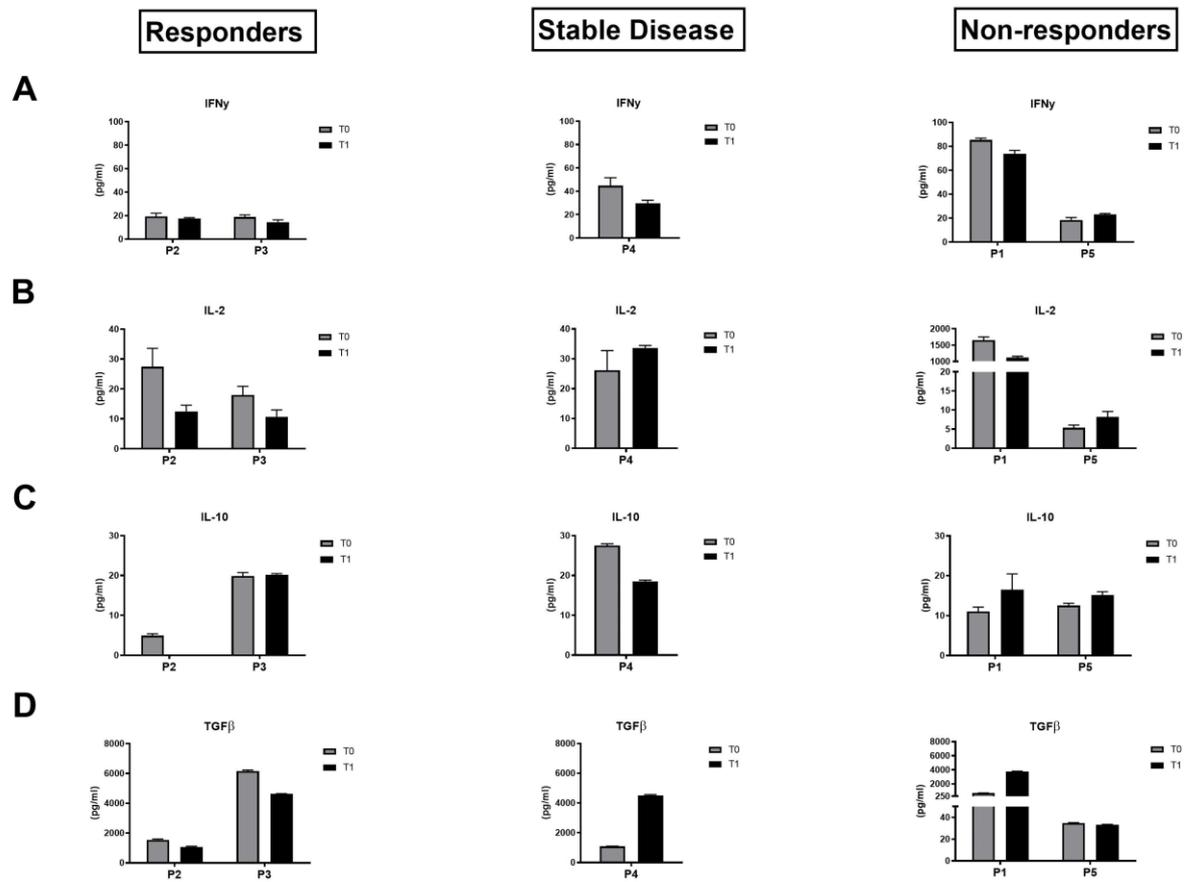
**Figure 2.**



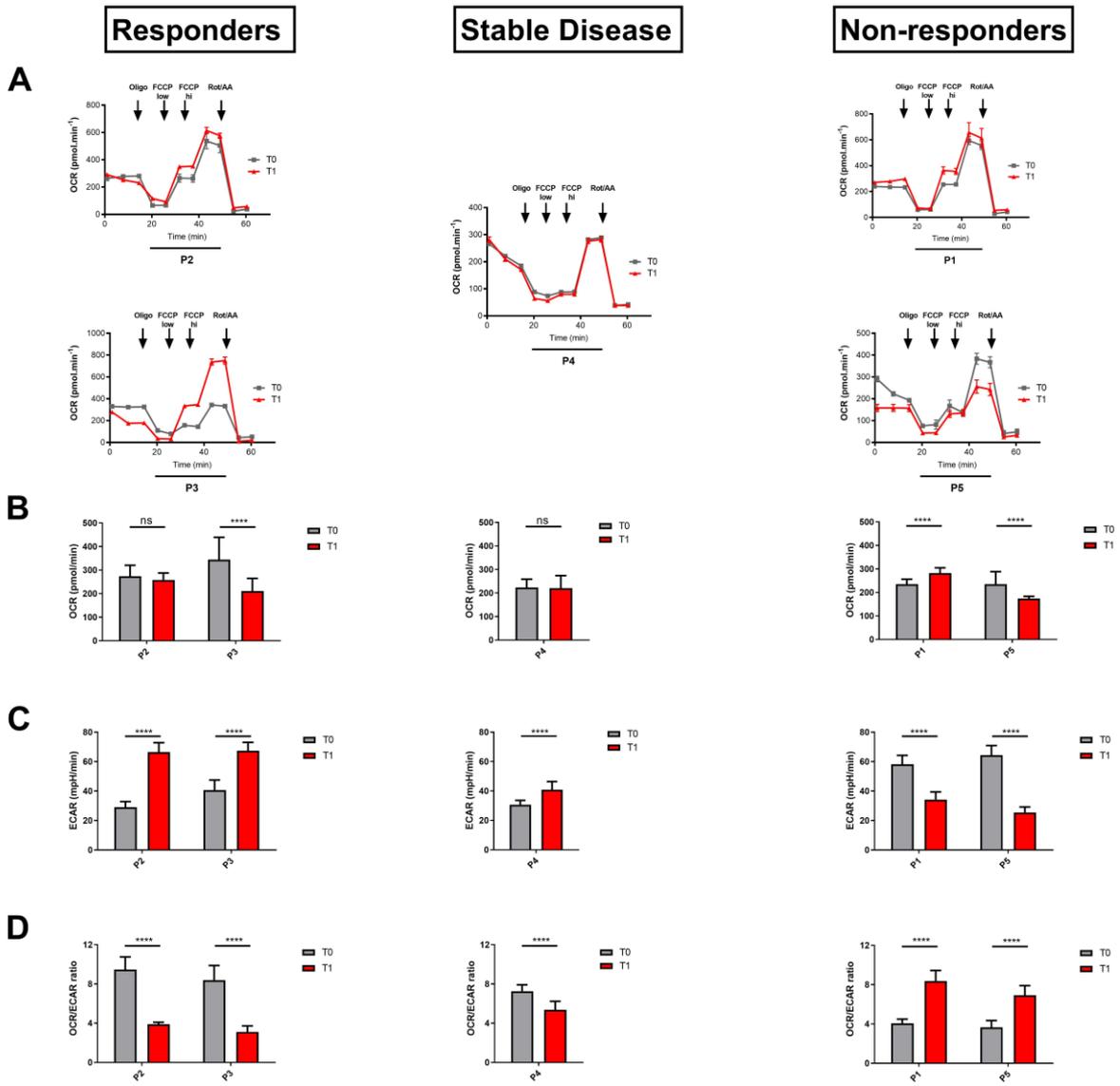
**Figure 3.**



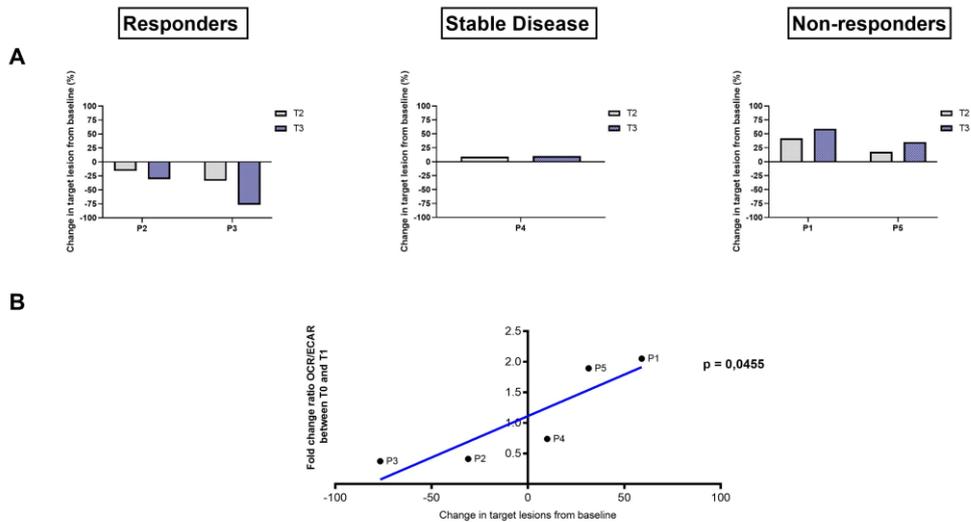
**Figure 4.**



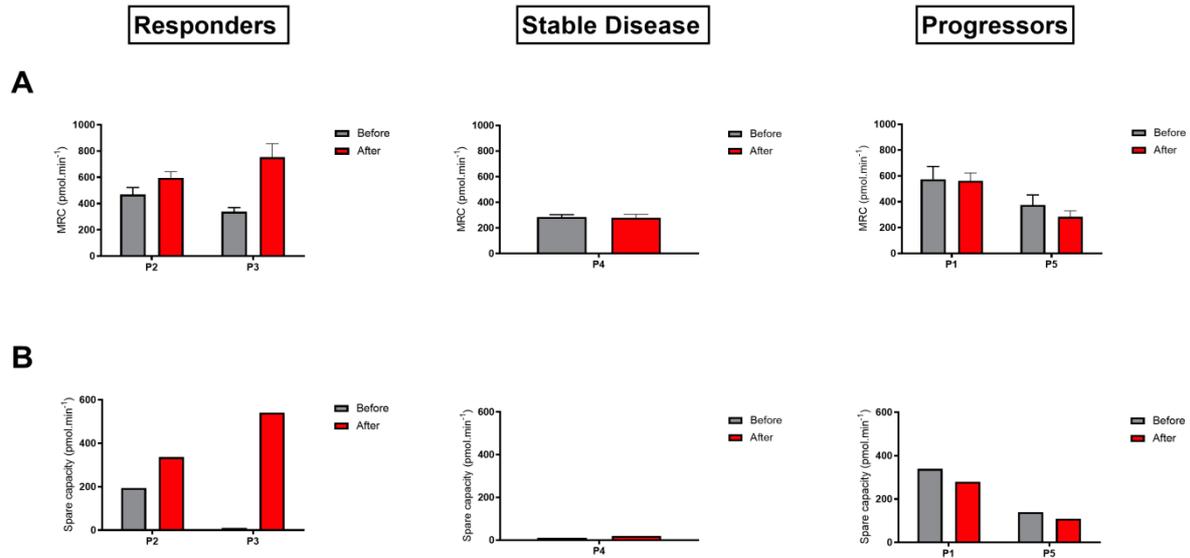
**Figure 5.**



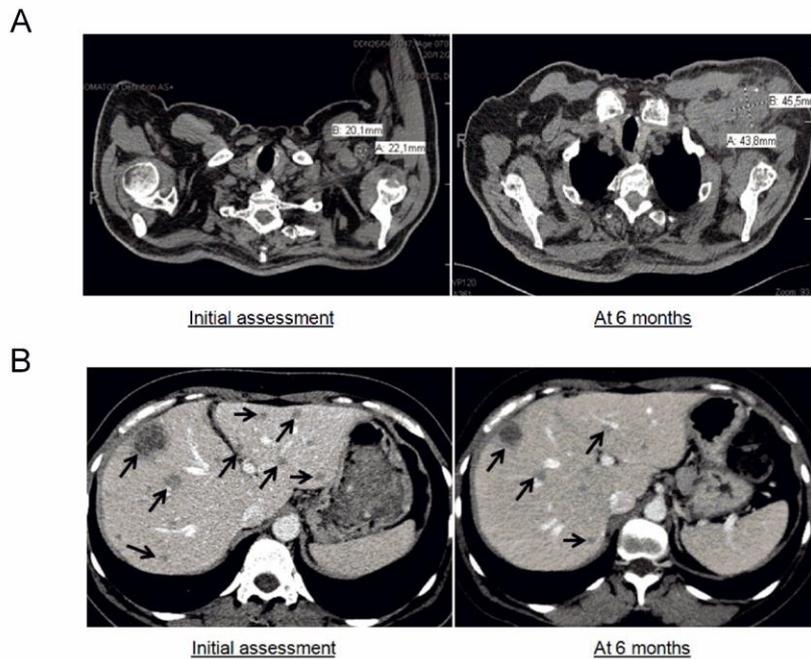
**Figure 6.**



## Supplementary Figures



**Figure S1: Analysis of changes in other metabolic markers in immune populations before and after a cycle of anti-PD-1 immunotherapy.** Maximal respiratory capacity (A) and spare respiratory capacity (B) was calculated in each group before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. The experiment was done in triplicate, each data representing mean  $\pm$  SD, \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n=21$ .



**Figure S2: CT scan of tumour response from target lesions according to RECIST criteria version 1.1, initial assessment and 6 months of onset of anti-PD1 immunotherapy, in (A) patient 1 and (B) patient 2.**

## **Annexe 3 : Protocole de recherche clinique ImoHS**

### **IMOHS**

**Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite  
suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie  
thérapeutique**

#### **Contexte de l'Etude**

##### Rationnel et justification bibliographique :

L'hidradénite suppurée (HS) encore appelée Maladie de Verneuil, est une dermatose inflammatoire chronique du follicule pileux se localisant principalement aux plis cutanés (axillaires, inguinaux, sous-mammaire, interfessier). La maladie se caractérise par des douleurs, des nodules inflammatoires, des abcès, des fistules et des cicatrices hypertrophiques « en corde » qui altèrent considérablement la qualité de vie des patients. L'évolution peut se faire vers une limitation fonctionnelle voir un handicap physique avec de nombreux arrêts de travail ayant un impact non négligeable sur le plan social et économique. Néanmoins, il s'agit d'une maladie encore méconnue de la communauté médicale entraînant un retard de diagnostic estimé à 7 ans.

Actuellement, les moyens thérapeutiques se limitent principalement à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre dans le but de contrôler les poussées d'hidradénite suppurée. Ce traitement médical est aujourd'hui controversé du fait du risque d'induction de résistance bactérienne. Le traitement chirurgical est le seul à être curatif, mais nécessite des exérèses délabrantes entraînant des conséquences cicatricielles majeures. Malgré la fréquence de cette pathologie estimée entre 1 à 2% de la population générale<sup>437</sup>, sa physiopathologie reste encore mal comprise, ce qui limite les innovations thérapeutiques.

Sur le plan physiopathologique, les données issues de la littérature montrent que l'HS semble être une anomalie primaire de l'unité pilo-sébacée-apocrine, qui provoque une occlusion folliculaire, puis le développement de kystes péri-folliculaires sièges d'une prolifération de bactéries commensales, pour enfin se rompre dans le

derme causant une réponse inflammatoire exagérée. Concernant cette réponse inflammatoire, plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires comme l'IL-1, le TNF $\alpha$ , l'IL-8, mais également plusieurs types cellulaires comme les neutrophiles et les lymphocytes T (LcT) ont été décrites dans cette maladie. Il a été démontré que le ratio entre les cellules Th17 et les cellules T régulatrices CD4+FoxP3+CD127low (T-regs) était fortement dérégulé en faveur des cellules Th17 dans la peau lésionnelle de patients atteints d'HS.<sup>209</sup> Il a également été mis en évidence une augmentation du peptide antimicrobien (PAM), la cathelicidine (LL-37) en intra-lésionnelle.<sup>438</sup> Ce dernier peut induire l'apoptose des T-regs, augmentant d'autant plus le déséquilibre de la balance Th17/T-regs en faveur des Th17 et provoquant une altération de l'homéostasie immunitaire au sein des lésions d'HS<sup>438</sup>.

A l'heure actuelle, peu d'études se sont penchées sur le rôle du système immunitaire régulateur et son implication dans cette maladie.

Au sein du laboratoire, nous nous intéressons également aux exosomes qui jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Il s'agit de nano vésicules extracellulaires de diamètre compris entre 50 et 150 nm et sécrétées par une multitude de types cellulaires. Ils se forment à partir du bourgeonnement vers l'intérieur de la membrane endosomale des corps multi vésiculaires, encapsulant les protéines, les ARN, les lipides et les métabolites. Au fur et à mesure de leur maturation, ils sont transportés vers la membrane plasmique, où ils fusionnent avec elle, et libèrent ce qu'ils contiennent dans l'espace extracellulaire sous forme d'exosomes. Ces exosomes peuvent agir sur des cellules proches ou à distance de leur lieu de sécrétion *via* plusieurs mécanismes et leur contenu est délivré à la cellule réceptrice. Concernant leur rôle dans l'homéostasie immunitaire, il a par exemple été démontré que les exosomes dérivés de DCs immatures ou suppressives influencent l'équilibre entre les LcT pro-inflammatoires et anti-inflammatoires en induisant la différenciation des LcT auxiliaires en T-regs.<sup>439</sup> Ils jouent également un rôle dans les pathologies inflammatoires du même spectre que l'HS telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn, où il a été montré que les exosomes pouvaient être des vecteurs de l'inflammation chronique. Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, les exosomes synoviaux peuvent provoquer une inflammation et une destruction des articulations principalement par la dégradation de la MEC et la production de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 mais également Th17.<sup>440</sup>

Dans le cadre de l'HS, il a récemment été montré à partir de prélèvements chez les patients, qu'il existe une anomalie concernant les cellules souches présentes dans

le bulbe folliculaire. En effet, chez ces patients, il y a une diminution du nombre de cellules souches en quiescence du fait d'une augmentation du taux de réplication de ces dernières.<sup>169</sup> Il a été montré que ces cellules souches multipotentes peuvent produire des exosomes enrichis en ARN contenant des répétitions télomériques. Ces ARN constituent de véritables motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs), et ont été démontré comme pouvant provoquer une réponse immune inflammatoire.<sup>441</sup> En partant de cette observation, nous pouvons nous demander si les anomalies observées chez les cellules souches de follicules pileux des patients atteints d'HS ne seraient pas la source d'exosomes pro-inflammatoires jouant un rôle dans les poussées d'HS.

D'autre part, il a récemment été décrit une population cellulaire appelée les cellules lymphoïdes innées, qui n'ont jamais été étudiées dans la physiopathologie de l'HS. Il existe 3 groupes de cellules lymphoïdes innées : les cellules de type 1, 2 ou 3 produisant respectivement de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-5/ IL-3 et de l'IL-17/IL-22. Nous nous intéressons plus particulièrement au groupe 3 puisqu'elles ont la capacité de sécréter de l'IL-22 et de l'IL-17, jouant ainsi un rôle dans le système de défense contre les bactéries et également dans l'inflammation chronique.<sup>185</sup> Ces cellules s'activent par la présence de pathogènes extracellulaires telles que les bactéries et sécrètent alors de l'IL-17, de l'IL-22 et du GM-CSF dans le but de promouvoir la phagocytose et la sécrétion de PAMs.<sup>185</sup> Au vu de leur fonction nous pensons qu'elles peuvent jouer un rôle déterminant dans cette maladie.

Autre aspect de notre étude, nous nous intéressons également à analyser l'impact de nouvelles stratégies thérapeutiques sur l'hidradénite suppurée. Nous nous intéressons plus particulièrement à l'impact sur l'HS de la thérapie photodynamique (PDT) qui est une technique utilisée depuis longtemps en dermatologie notamment pour le traitement de lésions précancéreuses et cancéreuses. Plus récemment, cette méthode thérapeutique a montré des résultats intéressants sur des dermatoses inflammatoires telles que l'acné avec un effet « antibiotique » montrant une réduction de la quantité de germes, une diminution de l'obstruction folliculaire et de l'hyperkératose, une immunosuppression locale et un effet anti-inflammatoire.<sup>258</sup> Ce traitement comporte 3 composants essentiels : l'application topique d'un photosensibilisateur, l'un des principaux utilisés est l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) qui va être métabolisé principalement dans les cellules inflammatoires et va se transformer par réaction enzymatique en un produit photosensibilisant, la protoporphyrine IX ; une lumière utilisée à la longueur d'onde spécifique du

photosensibilisateur choisi ; et de l'oxygène retrouvée en intracellulaire. Lorsque la lumière atteint les cellules en contact du photosensibilisateur, cela entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène provoquant une mort cellulaire par apoptose et/ou nécrose cellulaire. Plusieurs études ont étudié l'effet de la thérapie photodynamique chez des patients présentant une HS et ont obtenu de bons résultats.<sup>267-270</sup> Plus récemment, l'équipe du Dr. Suárez Valladares MJ a testé l'efficacité d'une technique de PDT intra-lésionnelle sur des patients atteints d'HS grâce à une sonde à fibres optiques (laser intra-lésionnel) permettant de traiter les parois des zones de fistulisation/abcès et a obtenu 29 rémissions complètes sur 38 patients traités.<sup>269</sup> Par ailleurs, il a été développé de nouveaux pansements électrofilaires à base de nanofibres (*electrospinning*) permettant d'intégrer un principe actif. Grâce à ces pansements, une équipe a montré qu'il est possible d'induire la production de PAMs par les kératinocytes lors de l'apposition d'un pansement électrofilaire associé à de la vitamine D sur des plaies cutanées dans des modèles murins et des explants de peau humains.<sup>442</sup> Une autre équipe a réussi à associer un pansement électrofilaire à des PAMs permettant d'avoir une activité antibactérienne, de faciliter la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes mais également de favoriser la différenciation des kératinocytes pouvant donc jouer un rôle dans la cicatrisation.<sup>443</sup> Notre projet de recherche étudiera l'effet de la PDT seule ou optimisée en association avec des PAMs.

La thèse de sciences du Dr Lamiaux cherche à étudier l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'HS et à évaluer une nouvelle stratégie thérapeutique reposant sur la Thérapie Photodynamique (PDT) seule ou en combinaison à des PAMs.

Ce travail implique de mener une étude prospective observationnelle monocentrique de type 3 permettant de recueillir des échantillons sanguins et tissulaires chez des patients atteints d'HS afin d'étudier la modulation du système immunitaire et l'effet d'une nouvelle stratégie thérapeutique. Les résultats seront comparés à des échantillons sanguins provenant de poches sanguines de l'EFS ainsi que des échantillons tissulaires de patients ayant bénéficié d'une abdominoplastie.

Cette étude est composée de 2 étapes : tout d'abord une partie *in vitro*, puis une partie *ex vivo* permettant de valider les résultats obtenus *in vitro* sur des échantillons humains.

### Objectif principal :

Etudier le dysfonctionnement du système immunitaire dans l'HS, notamment sur le versant régulateur, afin d'identifier de nouveaux acteurs de l'HS en comparaison à une population contrôle.

Cette étude sera effectuée tout d'abord *in vitro* sur un modèle expérimental cellulaire, puis *ex vivo* à partir de prélèvements sanguins et tissulaires de patients. La recherche d'un dysfonctionnement sera réalisée en comparaison avec des groupes témoins :

- des poches de sang issues de l'Établissement Français du Sang pour l'étude du système immunitaire périphérique.

- des prélèvements tissulaires de patients témoins bénéficiant d'une abdominoplastie pour l'analyse des infiltrats et de la réponse immunitaire lésionnelle *versus* sains.

### Objectifs secondaires:

1. Rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques par une étude de l'analyse des exosomes à partir de prélèvements sanguins et tissulaires de patients atteints d'HS comparativement aux groupes témoins.
2. Rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques par une étude de la production de PAMs à partir de prélèvements sanguins et tissulaires de patients atteints d'HS comparativement aux groupes témoins.
3. Evaluer *in vitro* la capacité des kératinocytes lésés à restaurer la cicatrisation.
4. Evaluer *in vitro* et *ex vivo* une nouvelle stratégie thérapeutique par Thérapie Photodynamique (PDT) seule et en combinaison à des PAMs sur le modèle d'HS.

### Critère de jugement principal :

Modulation de la réponse immunitaire de patients atteints d'HS *versus* la population contrôle en fonction de :

#### **1.1. Immunophénotypage des cellules immunitaires**

Nous déterminerons par cytométrie la prévalence :

- **Des populations cellulaires** : lymphocyte T (CD3<sup>+</sup>), lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (respectivement CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), lymphocyte B (CD3<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup>), Natural killer (CD335<sup>+</sup>), cellules dendritiques (CD11<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>) et cellules T régulatrices induites et naturelles (respectivement CD4<sup>+</sup>/Lag3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>-</sup>)
- **De l'état d'activation des lymphocytes** : CD4, CD30, CD69, Anti-HLADR, CD152, CD197, CD25, CD8
- **Des populations de cellules lymphoïdes innées** : marqueurs négatifs (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD33, CD15, CD16, CD203c, CD19, CD20, CD34, CD16, CD94, FcεRI) ; marqueurs membranaires de différenciation (CD45, CD56, CD117, CRTH2, CD127, NKp46, NKp44, CD161)

Ainsi, nous pourrions déterminer s'il existe une différence de prévalence et d'activation des populations immunitaires circulantes entre les patients HS et les témoins sains.

## 1.2. Analyse transcriptomique

Nous analyserons s'il existe une différence d'expression relative de gènes d'intérêts sur PBMCs par RTqPCR selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  entre le groupe des patients HS et le groupe témoin sain. Grâce à cette analyse, nous pourrions déterminer les variations d'expression des gènes codant pour :

- des facteurs de transcription et de différenciation des cellules lymphoïdes innées (RORγt, GATA3, Tbx21, CD4, NCR1, NCR2, AHR, CCR6, CD127, IL17F, CSF2, Areg, GM-CSF) ; des T régulateurs (CD25, CTLA-4, FoxP3, GITR, CD45RA,) et des lymphocytes Th17 (RORγt, STAT3) ;
- le profil de sécrétions des cytokines qui sont les principaux médiateurs de la réponse immunitaire et leurs récepteurs (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-26, IL-36, IFNγ, TNFα, IL23-R, IL7-Rα ....) ;
- des chimiokines (IL-8, CXCL1/3/5/8, ADAMTSL5) ;
- des voies de signalisations et récepteurs (Notch, Ahr, tumour necrosis factor receptor (TRAF6), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF-κB), NLRP3, STAT3, JAK-STAT, TLR7, RORγt, C/EBP) ;
- des médiateurs de la réponse régulatrice comme les récepteurs co-inhibiteurs (TIGIT, LAG3, CTLA4) ;

- des peptides antimicrobiens (HNP/human neutrophil peptide 1 à 4, hBD-1 to 4, hCAP18/cathelicidine antimicrobial peptide, DCD, Rnase 7, S100A7, S100A8, S100A9, SLPI/ALP, élafine/SKALP).

### **1.3. Analyse du sécrétome**

Nous déterminerons les concentrations en pg/mL de différentes cytokines dans le sérum des patients HS versus témoins sains grâce à la technique ELISA (Luminex™) afin de pouvoir déterminer les différences d'activation des voies immunitaires :

- Th1/Th2 : GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, TNF- $\alpha$  (*Cytokine 25-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1B, Invitrogen*)
- Th9/Th17/Th22/T-reg : IL-9,IL-10,IL-17A,IL-21,IL-22,IL-23,IL-27 (*Cytokine 25-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1B, Invitrogen*)
- Cytokines inflammatoires: IFN $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-7, IL-15, IL-31, TNF $\beta$  (*Cytokine 25-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1B, Invitrogen*)
- Cytokine immunosuppressive: TGF $\beta$  (*TGF beta 1 Human ProcartaPlex™ Simplex Kit, Invitrogen*)

Critères de jugement secondaires :

#### **1. Prolifération des cellules immunitaire due aux exosomes**

Nous étudierons l'impact des exosomes circulants isolés dans le sang de patients HS ou de témoins sains : évaluation de leur effet sur la prolifération de cellules immunitaires (PBMCs).

#### **2. Dosage des peptides antimicrobiens**

Nous quantifierons par technique ELISA plusieurs peptides antimicrobiens : élafine/SKALP, dermcidin, S100A7/psoriasin, S100A8/calgranulin A, S100A9/calgranulin B, LL-37(cathelicidine), h- $\beta$ d1, h- $\beta$ d2, h- $\beta$ d3, h- $\beta$ d4, ribonucléase 7, SLPI/ALP issus du sérum des patients HS versus les poches de sang (témoin) ainsi que dans les surnageants de tissus lésionnels HS *versus* les tissus d'abdominoplastie (témoin) cultivés en microslices.

Cette analyse est dans le but de déterminer s'il existe un défaut de production de

PAMs chez les patients HS versus témoins sains.

### **3. Capacité de cicatrisation**

Nous évaluerons la capacité à restaurer la cicatrisation dans les modèles *in vitro* HS (lignée HaCaT NCSTN<sup>-/-</sup>) versus le modèle sain (HaCaT *wild type*) par la réalisation de tests de blessure (*wound healing and migration assay, IBIDI*) avec et sans l'ajout de PAMs exogènes faisant défaut dans l'HS.

### **4. Evaluation *in vitro* et *ex vivo* d'une nouvelle stratégie thérapeutique par Thérapie Photodynamique (PDT) seule et en combinaison à des PAMs en fonction de :**

4.1. Viabilité cellulaire par méthode enzymatique de dosage d'ATP (*MTS assay kit, Abcam*) à différents temps de culture.

4.2. Analyse immunohistochimique et en immunofluorescence indirecte pour caractériser la morphologie des tissus, en particulier la caractérisation de l'infiltrat immunitaire et déterminer la présence des T-regs et des ILC3.

4.3. Analyse transcriptomique sur les mêmes gènes décrits ci-dessus par RTqPCR de chimiokines/cytokines et récepteurs.

4.4. Analyse du sécrétome par la technologie Luminex™ afin de pouvoir doser précisément les principales cytokines des voies immunitaires, décrites ci-dessus.

#### Critères d'inclusion des patients atteints d'HS :

- Patients majeurs (≥18 ans)
- Porteur d'une hidradénite suppurée modérée à sévère (grade Hurley ≥2) de phénotype classique ou phénotype glutéal
- Ayant une indication à un traitement chirurgical (indication d'exérèse)
- Naïfs de traitements immunomodulateurs (corticothérapie, biothérapie, apremilast, rétinoïdes) ou immunosuppresseurs (méthotrexate, ciclosporine) dans les 6 mois précédant l'inclusion, hors prise d'antibiotiques
- Ayant donné son accord de participation

- Affilié à la sécurité sociale

Critères de non-inclusion des patients atteints d'HS :

- Immunodépression, une ou des maladies auto-immunes, maladies cancéreuses ou maladies infectieuses aiguës ou chroniques
- Difficulté de compréhension ou de lecture du français
- Patients déjà inclus dans un essai thérapeutique interventionnel
- Patient sous tutelle ou curatelle
- Femme enceinte ou allaitante
- Hidradénite suppurée syndromique, hidradénite suppurée de phénotype folliculaire

Critères d'inclusion des témoins bénéficiant d'une abdominoplastie :

- Patients majeurs ( $\geq 18$  ans)
- Ne présentant pas d'antécédents d'hidradénite suppurée ou de lésions évocatrices d'hidradénite suppurée (abcès à répétition dans les plis, suppuration récurrente dans les plis, drainages répétés dans les zones de plis)
- Ayant une indication à un traitement chirurgical d'abdominoplastie
- Naïfs de traitements immunomodulateurs (corticothérapie, biothérapie, apremilast, rétinoïdes) ou immunosuppresseurs (méthotrexate, ciclosporine) dans les 6 mois précédent l'inclusion, hors prise d'antibiotiques
- Ayant donné son accord de participation
- Affilié à la sécurité sociale

Critères de non-inclusion des témoins bénéficiant d'une abdominoplastie :

- Immunodépression, une ou des maladies auto-immunes, maladies cancéreuses ou maladies infectieuses aiguës ou chroniques
- Difficulté de compréhension ou de lecture du français
- Patients déjà inclus dans un essai thérapeutique interventionnel
- Patient sous tutelle ou curatelle
- Femme enceinte ou allaitante

Nombre de sujets :

Il s'agit de comparer des sérums et des tissus de sujets atteints d'une hidradénite suppurée avec des poches de sang issues de l'EFS et des prélèvements tissulaires

issus d'abdominoplastie de patients ne présentant pas d'hydradénite suppurée afin d'évaluer le rôle du système immunitaire régulateurs et d'identifier de nouveaux acteurs dans cette maladie.

Les données étudiées n'ont jamais été décrites ou très peu dans la littérature, il s'agit donc d'initier de nouveaux résultats tout d'abord sur 10 patients versus 10 donneurs sains (10 poches de sang issues de l'EFS et 10 patients témoins bénéficiant d'abdominoplastie).

Cette étude est totalement exploratoire.

Les patients et témoins inclus dont les prélèvements sanguins et tissulaires ne seront finalement pas disponibles (opération annulée, etc) seront sortis d'étude et remplacés par de nouvelles inclusions ; également en cas de prise de traitements interdits (immunomodulateurs ou immunosuppresseurs) entre l'inclusion et l'opération.

Déroulement :

### **1. Inclusion et réalisation des prélèvements**

**Pour les cas (patients porteurs de HS) :**

L'investigateur proposera l'étude aux patients suivis dans le service de dermatologie de l'Hôpital St Vincent de Paul. Lors d'une consultation de suivi habituelle, il les informera de l'étude, et leur remettra la note d'information spécifique aux cas précisant les objectifs de l'étude, leur implication, et leurs droits. Après un délai de réflexion, l'investigateur recueillera la non-opposition du patient pour sa participation à l'étude. Cette information individuelle et le recueil de la non-opposition seront notifiés par écrit dans le dossier médical du patient.

**Pour les patients ayant donné leur accord de participation, il sera réalisé les actes et examens suivants :**

- un recueil de prélèvements sanguins (3 tubes de 5 mL) selon la prise en charge médicale habituelle, afin de rechercher les comorbidités cardiovasculaires associées à l'HS.
- un prélèvement de 3 tubes EDTA et 2 tubes secs supplémentaires de 5 mL chacun pour les besoins de l'étude.

- le recueil des données sociodémographiques et caractéristiques patient : sexe, âge, poids, taille.
- le recueil des données médicales : antécédents médicaux, tabagisme, antécédents familiaux, âge du début de la maladie, stade de Hurley, score de vie DLQI, score d'intensité IHS4, phénotype de la maladie, traitements mis en place.
- la photographie des lésions cutanées anonymisée (*après obtention d'un consentement écrit du patient*).
- Suite à l'exérèse chirurgicale programmée selon le soin courant, 3 prélèvements tissulaires seront réalisés sur la pièce d'exérèse totale. La pièce d'exérèse totale sera envoyée fraîche au service d'anatomopathologie de l'hôpital Saint-Vincent de Paul, elle sera photographiée, pesée et décrite. Les 3 sites de prélèvements seront identifiés. Nous réaliserons un prélèvement en zone inflammatoire aiguë (nodule, abcès, fistule) ; un prélèvement en zone lésionnelle chronique (cicatrice) de 1 cm<sup>3</sup> et un prélèvement en zone péri-lésionnelle (en marge) de 1 cm<sup>3</sup> sur tissu frais. Bien entendu, les prélèvements seront réalisés en accord et par le Docteur Quinchon, anatomopathologiste, afin de ne pas interférer avec la procédure médicale et diagnostique habituelle. Le Docteur Quinchon, anatomopathologiste, réalisera trois prélèvements en miroir de ceux prélevés pour le projet afin d'avoir une validation histologique des zones de prélèvements et ces prélèvements rentreront dans le cadre de la prise en charge médicale du patient.

**Pour les témoins (patients venant pour abdominoplastie) :**

Le Docteur Dabrowski, chirurgien en charge de l'intervention proposera l'étude aux patients éligibles pris en charge pour une abdominoplastie dans le service de chirurgie viscérale de l'Hôpital Saint-Philibert, GHICL, Lomme. Il les informera de l'étude, et leur remettra la note d'information spécifique aux témoins précisant les objectifs de l'étude, leur implication, et leurs droits. Après un délai de réflexion, l'investigateur recueillera la non-opposition du patient pour sa participation à l'étude.

Cette information individuelle et le recueil de la non-opposition seront notifiés par écrit dans le dossier médical du patient.

**Pour les témoins ayant donné leur accord de participation, il sera réalisé les actes et examens suivants :**

- Le recueil des données sociodémographiques et caractéristiques patient : sexe, âge, poids, taille.

- Le recueil de données biologiques issues du prélèvement sanguin réalisé selon la prise en charge médicale habituelle : nombre de leucocytes, neutrophiles et lymphocytes, CRP
- Suite à l'exérèse chirurgicale programmée selon le soin courant, le Docteur Dabrowski réalisera des photographies de la pièce opératoire avant et après prélèvements. Il réalisera également 3 prélèvements cutanés frais de 1 cm<sup>3</sup> chacun sur la pièce opératoire d'abdominoplastie, deux au centre et un en marge afin d'être homogène par rapport au groupe de patients HS. Les prélèvements sur la pièce d'exérèse des témoins seront directement réalisés au bloc opératoire par le Docteur Dabrowski. La pièce opératoire pourra ainsi par la suite être fixée et acheminée de manière habituelle au laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital Saint-Vincent. Le Docteur Quinchon, anatomopathologiste, réalisera trois prélèvements en miroir de ceux prélevés pour le projet afin d'avoir une validation histologique des zones de prélèvements et ces prélèvements rentreront dans le cadre de la prise en charge médicale du patient.

## **2. Circuit des prélèvements**

### **Prélèvements sanguins pour les patients HS :**

Les prélèvements sanguins des patients seront réalisés par l'IDE du service d'Hôpital de Jour de Saint-Vincent à Lille. Une fois le prélèvement effectué, les tubes seront acheminés vers le laboratoire d'analyse de l'hôpital Saint Philibert afin d'être stockés dans les bonnes conditions de conservation. Les tubes secs devront rester à la verticale pour décantation à 4°C, les tubes EDTA devront être stockés à température ambiante sous agitation jusqu'à ce qu'ils soient collectés le lendemain matin par le transporteur. Le transport des échantillons vers le laboratoire d'analyse (unité Inserm U1189 OncoThAI, R3D3, Institut de Biologie de Lille) se fera par un transporteur agréé dans le transfert de matériaux biologiques et dans les règles assurant l'intégrité des échantillons et la sécurité du personnel. Les tubes seront conditionnés dans un triple emballage type P650 précisant la mention « échantillon biologique non infectieux ».

### **Poches de sang (matériel biologique comparatif) :**

Une convention de cession de produits issus de sang à but non thérapeutique a été signée entre l'EFS et l'IBL. Les poches de sang représentant le groupe témoin seront commandées à l'EFS. Les contre-indications aux recueils de sang émis par l'EFS et

pertinentes dans le cadre de cette étude sont les personnes ayant une maladie chronique, la prise d'antibiotique, la présence de plaies cutanées, la présence d'une infection aiguë ou chronique. L'ensemble des poches sont préalablement testées pour s'assurer de l'absence de maladies transmissibles (VIH, VHB, VHC, syphilis, HTLVI, HTLVII).

Ce dernier s'engage à assurer la traçabilité « Donneur-produit-Cessionnaire » et à respecter les règles d'hémovigilance conformément aux dispositions des articles R 1221.22 et suivants du Code de la Santé Publique. L'EFS est responsable du conditionnement des poches de sang qui sont congelées, l'IBL est mandataire du transport qui doit s'effectuer à une température inférieure ou égale à -20°C (carboglace ou température dirigée).

### **Prélèvements tissulaires :**

Les prélèvements tissulaires des deux groupes seront acheminés à l'IBL par un transporteur agréé, dans un délai maximal de 2 heures après résection. Les prélèvements seront envoyés dans des compresses stériles imbibées de solution physiologique afin d'éviter leur dessèchement, et transportés de manière réfrigérée entre 0 et 5°C afin de ralentir les processus d'autolyse et de fixation.

Ils seront ensuite fixés, dans un délai maximal de 2 à 3 heures après la résection ou mis en culture immédiate.

Toutes les analyses seront réalisées à l'IBL ainsi que la conservation des prélèvements. Les différentes analyses effectuées sur les prélèvements seront réalisées par : le Dr Lamiaux, Dr Guillaume Grolez (Post-doc), Monsieur Bertrand Leroux (assistant ingénieur), Monsieur Mel Diedro (étudiant en Master 2).

### **Devenir des échantillons :**

Les échantillons seront conservés pour une durée totale de 10 ans pour des recherches ultérieures éventuelles. Le délai de conservation dépassée, les échantillons seront détruits.

## **3. Protocole de recherche**

### **1) Immunophénotypage des cellules immunitaires circulantes**

Des cellules mononuclées du sang périphérique humain (PBMCs) seront isolées à partir de prélèvements sanguins de patients atteints d'HS et de prélèvements sanguins de personnes saines obtenus auprès de l'établissement français du sang (EFS). Les PBMCs isolées à partir des prélèvements sanguins seront incubées avec différents anticorps couplés à des fluorochromes afin de pouvoir déterminer, après passage sur cytomètre (ATTUNE NxT™, Thermofisher) la part de lymphocyte T (CD3<sup>+</sup>), de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (respectivement CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), de lymphocyte B (CD3<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup>), de cellules Natural killer (CD335<sup>+</sup>), de cellules dendritiques (CD11<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>) et de cellules T régulatrices induites et naturelles (respectivement CD4<sup>+</sup>/Lag3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>-</sup>) au sein des différents prélèvements. De la même manière, l'état d'activation des lymphocytes circulants sera analysé par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes ciblant spécifiquement les marqueurs membranaires suivant : CD4, CD30, CD69, Anti-HLADR, CD152, CD197, CD25, CD8. Enfin, afin d'étudier spécifiquement les populations de cellules lymphoïdes innées, nous utiliserons des marqueurs négatifs permettant de les différencier des autres populations immunitaires. En effet, elles sont dépourvues des marqueurs de la lignée T (CD3), des macrophages (CD14, CD16, CD33), des cellules de la lignée granulocytaire (CD16, CD203c), de la lignée B (CD19), des cellules souches (CD34) et des mastocytes (FcεRI). L'ensemble de ces marqueurs sera associé à un fluorochrome unique afin d'identifier les populations cellulaires négatives. Puis, afin d'affiner l'analyse phénotypique des cellules lymphoïdes innées, nous utiliserons des anticorps dirigés contre les marqueurs membranaires de différenciation de ces cellules : CD56, CD117, CRTH2, CD127, NKp46.

Cette étude d'immunophénotypage à partir des prélèvements sanguins de patients atteints d'HS permettra de mieux définir le profil immunitaire retrouvé dans l'hidradénite suppurée et ainsi décrypter la modulation immunitaire dans cette pathologie.

## **2) Analyse transcriptomique à partir d'ARN extrait des PBMCs**

Après avoir déterminé le phénotype des populations présentes dans les prélèvements sanguins de patients atteints d'HS, nous nous intéresserons à déterminer l'orientation des réponses immunitaires mise en jeu dans l'HS. Pour cela, nous effectuerons dans

un premier temps une analyse transcriptomique à partir d'ARN extrait des PBMCs préalablement isolées. Cette analyse transcriptomique par RTqPCR nous permettra de quantifier l'expression relative de gènes d'intérêts par la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Grâce à cette analyse, nous pourrions déterminer les variations d'expression des gènes codant pour :

- des facteurs de transcription et de différenciation des cellules lymphoïdes innées (ROR $\gamma$ t, GATA3, Tbx21, CD4, NCR1, NCR2, AHR, CCR6, CD127, IL17F, CSF2, Areg, GM-CSF) ; des T régulateurs (CD25, CTLA-4, FoxP3, GITR, CD45RA,) et des lymphocytes Th17 (ROR $\gamma$ t, STAT3) ;
- le profil de sécrétions des cytokines qui sont les principaux médiateurs de la réponse immunitaire et leurs récepteurs (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-26, IL-36, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL23-R, IL7-R $\alpha$ ) ;
- des chimiokines (IL-8, CXCL1/3/5/8, ADAMTSL5) ;
- des voies de signalisations et récepteurs (Notch, Ahr, tumour necrosis factor receptor (TRAF6), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), NLRP3, STAT3, JAK-STAT, TLR7, ROR $\gamma$ t, C/EBP) ;
- des médiateurs de la réponse régulatrice comme les récepteurs co-inhibiteurs (TIGIT, LAG3, CTLA4) ;
- des peptides antimicrobiens (HNP/*human neutrophil peptide 1 à 4*, hBD-1 to 4, hCAP18/*cathelicidine antimicrobial peptide*, DCD, Rnase 7, S100A7, S100A8, S100A9, SLPI/ALP, élafine/SKALP).

Cette analyse transcriptomique nous permettra d'obtenir une signature d'expression génique des médiateurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire qui sera spécifique à l'hidradénite suppurée.

### **3) Analyse du sécrétome**

En parallèle, de l'analyse transcriptomique, les sérums issus des prélèvements sanguins de patients atteints d'HS et issus des poches de sang saines seront récupérés afin de déterminer les voies d'activation immunitaires impliquées dans l'HS. Ces sérums seront analysés grâce à la technologie Luminex™ afin de pouvoir doser précisément les principales cytokines des voies immunitaires :

- Th1/Th2 : GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, TNF- $\alpha$  (*Cytokine 25-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1B, Invitrogen*)

- Th9/Th17/Th22/T-reg : IL-9, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 (*Cytokine 25-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1B, Invitrogen*)

- Cytokines inflammatoires : IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-7, IL-15, IL-31, TNF- $\beta$  (*Cytokine 25-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1B, Invitrogen*)

- Cytokine immunosuppressive: TGF- $\beta$  (*TGF beta 1 Human ProcartaPlex™ Simplex Kit, Invitrogen*)

L'ensemble des cytokines est analysé à partir du sérum de patients atteints d'HS et sera comparé aux dosages de cytokines présentes dans le sérum de donneurs sains. Cette analyse permettra de déterminer les acteurs de la signalisation immunitaire mise en jeu dans l'HS et ainsi mieux définir de nouveaux acteurs immunitaires impliqués dans l'HS.

#### **4) Mise en place du modèle de coupes tissulaires microscopiques** **« Microslice »**

La mise en place de ce modèle sera faite en collaboration avec l'équipe du Professeur Conti, Hôpital St Antoine à Paris sur les tissus prélevés chez les patients atteints d'un HS ou issus d'une abdominoplastie de patients sains.

Il s'agit, à partir des prélèvements cutanés de patients, de réaliser des coupes de tissus d'un diamètre de 5 mm sur une épaisseur de 250  $\mu$ m, dans des conditions stériles, grâce à un microtome. Ces tranches devront être mises dans un milieu de culture dans les 3 heures suivants l'excision cutanée. Plusieurs analyses seront réalisées sur ces microslices de tissus à différents temps, pour un maximum de temps de culture de 15 jours :

Une mesure de la viabilité cellulaire sera réalisée sur les cellules issues de ces coupes par méthode enzymatique de dosage d'ATP (*MTS assay kit, Abcam*) à différents temps de culture.

Une analyse immunohistochimique et d'immunofluorescence indirecte sera effectuée afin de caractériser la morphologie des tissus (i) par une coloration à l'hématoxyline et

l'éosine, (ii) d'étudier la viabilité tissulaire (*TUNEL assay*, *ThermoFisher*) mais également (iii) d'étudier la prolifération cellulaire au sein des microslices par un marquage nucléaire au Ki67. Ces analyses serviront également pour (iv) identifier la présence des cellules lymphoïdes innées de type 3 (marqueurs négatifs : CD3,CD56 et CD20/CD79a, marqueur positif : ROR $\gamma$ t/facteur de transcription),<sup>444</sup> et pour (v) caractériser l'infiltrat immunitaire inflammatoire/régulateur (CD3,CD4,CD8,FOX-P3, IL-17 et CD25).

De la même manière que pour les PBMCs issus des prélèvements de sang de patients atteints d'une HS, une analyse transcriptomique sera également effectuée à partir d'ARN isolé des microslices de tissus. Lors de cette analyse, l'expression des gènes étudiés dans le versant *in vitro* de ce projet sera également étudiée sur les microslices afin de pouvoir comparer la signature d'expression des gènes d'intérêt entre les cellules immunitaires circulantes et les cellules immunitaires infiltrant le tissu.

Même chose concernant l'analyse du sécrétome, nous étudierons les mêmes cytokines que celles réalisées sur le sérum des patients afin de comparer la réponse immunitaire périphérique à celle présente en intra-lésionnelle.

Nous effectuerons dans un premier temps une analyse transcriptomique à partir d'ARN extrait des PBMCs préalablement isolées. Cette analyse transcriptomique par RTqPCR nous permettra de quantifier l'expression relative de gènes d'intérêts par la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Grâce à cette analyse, nous pourrons déterminer les variations d'expression des gènes codant pour :

- des facteurs de transcription et de différenciation des cellules lymphoïdes innées (ROR $\gamma$ t, GATA3, Tbx21, CD4, NCR1, NCR2, AHR, CCR6, CD127, IL17F, CSF2, Areg, GM-CSF) ; des T régulateurs (CD25, CTLA-4, FoxP3, GITR, CD45RA,) et des lymphocytes Th17 (ROR $\gamma$ t, STAT3) ;
- le profil de sécrétions des cytokines qui sont les principaux médiateurs de la réponse immunitaire et leurs récepteurs (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-26, IL-36, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL23-R, IL7-R $\alpha$ , ...) ;
- des chimiokines (IL-8, CXCL1/3/5/8, ADAMTSL5) ;
- des voies de signalisations et récepteurs (Notch, Ahr, tumour necrosis factor receptor (TRAF6), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), NLRP3, STAT3, JAK-STAT, TLR7, ROR $\gamma$ t, C/EBP) ;

- des médiateurs de la réponse régulatrice comme les récepteurs co-inhibiteurs (TIGIT, LAG3, CTLA4) ;
- des peptides antimicrobiens (HNP/human neutrophil peptide 1 à 4, hBD-1 to 4, hCAP18/cathelicidine antimicrobial peptide, DCD, Rnase 7, S100A7, S100A8, S100A9, SLPI/ALP, élafine/SKALP).

Cette analyse transcriptomique nous permettra d'obtenir une signature d'expression génique des médiateurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire qui sera spécifique à l'hidradénite suppurée.

## **5) Analyse des exosomes**

Après avoir analysé le contenu immunitaire dans le sang des patients atteints d'HS, nous nous intéresserons à un autre acteur de la réponse immunitaire que sont les exosomes. Pour cela, les exosomes seront isolés à partir du plasma issu des prélèvements sanguins de patients atteints d'HS ou de donneur sains par ultracentrifugation sur coussins de sucrose. Les exosomes ainsi isolés seront analysés par la technique TRPS (*Tunable resistive Pulse sensing*) par EXOID™ (*Izon science*) afin d'obtenir la taille et la concentration des exosomes isolés à partir des différents prélèvements sanguins. Nous caractériserons également ces exosomes d'un point de vue morphologique et structurel par microscopie électronique. Le contenu protéique de ces exosomes sera également étudié par Western Blot [mise en évidence de protéines membranaires communes : les tétraspanines (CD63, CD81, CD9) ; protéine de la voie endosomale (TSG-101) ; molécule histocompatibilité de type II/HLA-DR, marqueurs inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$  et NF- $\kappa$ B) et un contrôle négatif Ago2].

Après avoir isolé et caractérisé les exosomes, ceux-ci seront utilisés afin d'étudier leur impact sur l'activation du système immunitaire. Pour cela, des PBMCs issus de donneurs sains seront mises en présence de ces exosomes et une étude de leur prolifération sera effectuée par incorporation de thymidine tritiée (technique de réaction lymphocytaire mixte).

Cette étude permettra de déterminer si les exosomes entraînent une augmentation de la prolifération des cellules immunitaires et valider ainsi l'hypothèse que dans le cadre de l'HS, les exosomes seraient un des vecteurs de la réponse pro-inflammatoire.

## 6) Etude des peptides antimicrobiens

Les kératinocytes épidermiques expriment des peptides antimicrobiens et des inhibiteurs de protéases à sérine, qui influencent la différenciation épidermique. Certains de ces inhibiteurs de protéases à sérine ont également une activité antimicrobienne. Par exemple, le SLPI/ALP (*secretory leukocyte protease inhibitor* ou *antileucoproteïnase*) est exprimé de manière constitutive dans l'épiderme chez l'homme et une expression accrue a été observée dans les épidermes lésés et psoriasiques.<sup>445,446</sup> L'inhibiteur de l'élastase des neutrophiles, élafine/SKALP est sécrété à partir de kératinocytes humains en culture. L'élafine/SKALP a des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, et sa concentration est augmentée dans la peau humaine lésée et dans l'épiderme lésionnel des patients atteints de psoriasis.<sup>445,446</sup> Ainsi, les peptides antimicrobiens et les inhibiteurs de protéases exprimés de manière inductible ou constitutive pourraient, de par leurs fonctions, limiter la dysbiose cutanée et moduler les réactions inflammatoires en inhibant les protéases sécrétées par les cellules immunitaires.

Nous effectuerons un dosage des peptides antimicrobiens (élafine/SKALP, dermcidin, S100A7/psoriasin, S100A8/calgranulin A, S100A9/calgranulin B, LL-37(cathelicidine), h- $\beta$ d1, h- $\beta$ d2, h- $\beta$ d3, h- $\beta$ d4, ribonucléase 7, SLPI/ALP) dans les sérums des patients versus les poches de sang (témoin) ainsi que dans les surnageants des tissus d'HS versus les tissus d'abdominoplastie (témoin) cultivés en microslices. Ce dosage sera réalisé par la technique ELISA à l'aide d'anticorps spécifiques de ces peptides antimicrobiens.

Le but de ce dosage est d'identifier s'il existe un défaut de production de PAMs chez les patients atteints d'HS en comparaison à la production chez les témoins, ce qui pourrait participer à la dysbiose cutanée mais également à la réponse inflammatoire chronique au sein des lésions d'HS. Si ces données sont observées, les PAMs joueraient donc un rôle indirect sur les défauts de cicatrisation observés dans l'HS.<sup>368,447</sup>

C'est pourquoi, nous étudierons *in vitro* la capacité des kératinocytes lésés à restaurer la cicatrisation par un test de migration/test de blessure avec et sans ajout de PAMs (*wound healing and migration assay, IBIDI*).

La finalité de ces tests est de déterminer si, dans le cas où un défaut de PAMs est observé et entraîne un défaut de cicatrisation, une supplémentation en PAMs pourrait palier ces défauts de cicatrisation observés chez les patients atteints d'une HS. En cas de validation de ces données, il sera possible de déterminer une nouvelle stratégie thérapeutique à partir de pansements à base de nanofibres pour une libération prolongée d'une substance active, ici des PAMs, afin d'améliorer la capacité de cicatrisation des plaies d'HS et également d'avoir un effet antimicrobien pour permettre la restauration du microbiote cutané.<sup>442,448,449</sup>

### **7) Evaluation *in vitro* et *ex vivo* une nouvelle stratégie thérapeutique par Thérapie Photodynamique (PDT) seule et en combinaison à des PAMs**

Il s'agit d'utiliser la technique de PDT *in vitro* et sur les microslices de patients atteints d'HS versus les témoins, grâce à l'utilisation d'un photosensibilisateur (5-ALA et le méthylène bleu). Les cellules ou tissus ainsi traités seront ensuite exposés à la longueur d'onde spécifique du photosensibilisateur en présence d'oxygène permettant la production d'espèce réactive d'oxygène préférentielle dans les cellules inflammatoires permettant une réduction de l'inflammation mais ayant également une action antibactérienne.

L'objectif ici est d'évaluer la PDT seule ou avec l'ajout de PAMs afin de déterminer l'action anti-inflammatoire et antimicrobienne de la PDT et si son action peut être optimisée par l'ajout de PAMs.

Les coupes de tissus microscopiques traitées par la PDT seule et/ou associée aux PAMs, seront utilisées pour:

- Analyser la viabilité cellulaire par méthode enzymatique de dosage d'ATP (*MTS assay kit, Abcam*) à différents temps de culture.
- Effectuer une analyse immunohistochimique et en immunofluorescence indirecte pour caractériser la morphologie des tissus, en particulier la caractérisation de l'infiltrat immunitaire et déterminer la présence des T-regs et des ILC3.

- Effectuer une analyse transcriptomique sur les mêmes gènes décrits ci-dessus par RTqPCR de chimiokines/cytokines et récepteurs.
- Analyser le sécrétome par la technologie Luminex™ afin de pouvoir doser précisément les principales cytokines des voies immunitaires, décrites ci-dessus.

#### **4. Calendrier prévisionnel :**

Durée de l'inclusion : 1 an

Durée de participation des sujets : maximum 24 semaines (délai entre l'inclusion et l'intervention chirurgicale)

Durée de l'étude : 2 ans et 6 mois (1 an d'inclusion, 6 mois de participation à l'étude pour les patients et 1 an d'analyse = 6 mois pour les analyses biologiques + 6 mois pour le data management et bio statistiques)

Date prévue de mise en œuvre : octobre 2021

#### **5. Analyse statistique :**

##### **Analyse descriptive des données**

Une analyse descriptive des données sera tout d'abord réalisée : les moyennes, écart-types, médianes et intervalles interquartiles seront calculés pour les données quantitatives ; les effectifs et fréquences pour les variables qualitatives.

##### **Analyse du critère principal**

Les données obtenues par les différentes manipulations sont nombreuses et essentiellement quantitatives. Cette étude étant exploratoire et portant sur un nombre très restreint de patients, l'analyse statistique des données sera essentiellement descriptive selon les modalités présentées ci-dessus.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon pourra être appliqué pour comparer les médianes entre les groupes (HS vs poches, HS vs témoins).

##### **Analyse des critères secondaires**

Les critères secondaires seront analysés essentiellement de la même manière. Le test du Khi-2 ou exact de Fisher sera utilisé pour comparer les proportions entre les groupes.

## Divers

Un seuil de significativité de 5% sera considéré pour toutes les analyses. Aucune correction des p-valeurs ne sera appliquée s'agissant d'une étude exploratoire.

Des analyses complémentaires pourront être réalisées si besoin.

Le logiciel utilisé pour réaliser ces analyses est R.

L'analyse statistique sera réalisée par la cellule de biostatistiques de la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation du GHICL.

**6. Comité de suivi** : oui (comité de suivi de la thèse de science CSI)

**7. Evaluation des bénéfices et des risques liés à la recherche** :

Aucun bénéfice direct n'est attendu pour les patients qui participent à l'étude.

Il n'y a aucun risque surajouté à la prise en charge médicale habituelle du patient inclus à ce projet de recherche.

### III. Traitements de données

#### A. Renseignements administratifs

Nom, titre, et fonction de la personne responsable du traitement automatisé de données :

Groupe des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL)

Laurent DELABY

Directeur Général du GHICL

Nom, titre, et fonction de la personne responsable de la mise en œuvre du traitement automatisé de données :

Groupe des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL)

Dr. Marie Lamiaux

CCA, investigateur principal de l'étude

Nom, titre et fonction de(s) personne(s) qui aura(ont) accès aux données :

Dr. Marie Lamiaux

Pr. Philippe Modiano

Pr. Nadira Delhem

Dr. Guillaume Grolez

Par délégation du promoteur, les membres de la Délégation à la Recherche Clinique

et à l'Innovation du GHICL impliqués dans l'étude : Data-manager, Biostatisticien, Attaché de Recherche Clinique investigateur et Attaché de Recherche Clinique promoteur.

Catégories d'informations recueillies pour les patients :

- Données sociodémographiques : âge, sexe, poids, taille
- Données cliniques : antécédents médicaux, tabagisme, antécédents familiaux, âge du début de la maladie, stade de Hurley, score de vie DLQI, score d'intensité IHS4, phénotype de la maladie, traitements mis en place
- Photographies des lésions cutanées des patients inclus et de la pièce d'exérèse chirurgicale avant et après prélèvements
- Données biologiques : nombre de leucocytes, neutrophiles et lymphocytes, CRP

Catégories d'informations recueillies pour les témoins :

- Données sociodémographiques : âge, sexe, poids, taille
- Photographies de la pièce d'exérèse chirurgicale avant et après prélèvements
- Données biologiques : nombre de leucocytes, neutrophiles et lymphocytes, CRP

**B. Origine et nature des données**

Codage des données :

Code patient : 2 initiales (1<sup>ère</sup> lettre nom et 1<sup>ère</sup> lettre prénom) + numéro d'inclusion

Recueil d'information directement identifiantes (ex : nom, prénom, adresse postale ou mail, n°tel) :

Oui      Non

Table de concordance : La table de concordance sera détenue par le Dr. Marie Lamiaux et conservée dans un endroit sécurisé au sein du service de dermatologie de l'hôpital Saint Vincent de Paul.

Utilisation de données extraites de systèmes d'information existants (ex : PMSI, bases de l'assurance maladie..) : Oui      Non

Utilisation de données extraites de bases d'études déjà réalisées : Oui Non

Constitution d'une nouvelle base de données : Oui      Non

**Si oui, indication du flux de données :**

Les données nécessaires à l'étude (concernant les données sociodémographiques et médicales) seront stockées sur une base de données OpenClinica créée exclusivement pour l'étude et selon le respect des bonnes pratiques cliniques. La base de données sera stockée sur un serveur sécurisé du GHICL, non accessible depuis l'extérieur. L'authentification pour accéder à la base de données se fera par login/mot de passe sécurisé envoyés par mail sécurisé. Le mot de passe contiendra 8 caractères au minimum incluant au moins une minuscule, une majuscule, un chiffre et un symbole. Toutes les connexions et tentatives de connexion seront tracées.

Les données nécessaires à l'étude (concernant les données issues des analyses des échantillons biologiques spécifiques à l'étude) seront stockées sur une base de données Microsoft Excel créée exclusivement pour l'étude et selon le respect des bonnes pratiques cliniques. La base de données sera stockée sur un disque dur externe sécurisé par un mot de passe, et stocké dans un lieu sécurisé avec accès restreint à l'IBL. Seules les personnes autorisées pourront accéder aux données contenues dans la base de données, le fichier sera également protégé par un mot de passe sécurisé à 8 caractères incluant au moins une minuscule, une majuscule, un chiffre et un symbole.

Les deux bases de données seront ensuite fusionnées en fin d'étude, pour permettre l'analyse statistique.

Les transmissions des données entre l'investigateur et les personnes habilitées de la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation se feront uniquement via messagerie sécurisée.

La base des données de l'étude sera la propriété du promoteur (GHICL).

La présentation des résultats du traitement de données ne pourra en aucun cas permettre l'identification directe ou indirecte des personnes concernées.

Toutes les données relatives à la recherche ne devront en aucun cas être transmises à un tiers.

Transfert de données en dehors de l'UE : Oui Non

Conformité à une méthodologie de référence : MR002 MR003

Durée de conservation de la base de données :

La base de données sera conservée sur les serveurs du GHICL pendant une durée de 2 ans après la dernière publication des résultats de la recherche ou en l'absence de publication, jusqu'à la signature du rapport final. Puis la base de données sera

archivée sur support papier ou informatique pour une durée de 15 ans maximum.

#### **IV. Information du patient**

Le médecin, responsable de la recherche, s'engage à informer de manière claire et précise le patient de la recherche, ainsi que ses représentants s'il y a lieu, oralement et en lui remettant une lettre d'information. Cette information individuelle sera notifiée par écrit dans le dossier du patient à l'aide d'un formulaire rempli par le médecin attestant de la non opposition du patient.

L'investigateur s'engage également à répondre aux questions que le patient serait susceptible de se poser. Avant d'autoriser sa participation le patient dispose d'un délai de réflexion afin de prendre connaissance de la lettre d'information.

Différents modes de diffusion sont mis en place au sein du GHICL permettant une information du patient concernant l'utilisation de ses données à des fins de recherche. Dans chaque service une affiche reprenant la mention CNIL et informant les patients sur leurs droits est mise à disposition.

## Annexe 4 : Avis du comité de protection des personnes

### COMITE de PROTECTION des PERSONNES

#### CPP OUEST II - ANGERS

Dr Amélie Lansiaux  
DRCI  
Groupement des Hôpitaux de  
l'Institut Catholique de Lille  
Hôpital Saint-Philibert  
115 Rue du Grand But - BP 249  
59462 Lomme Cedex

**Projet d'étude n°2021/70**  
**21.02270.00015**

Angers, le 12 novembre 2021

Madame,

Vous trouverez ci-joints l'extrait de procès-verbal ainsi que l'**avis favorable** du CPP Ouest II concernant le projet d'étude intitulé :

**«Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie thérapeutique.»**

Vous en souhaitant bonne réception, je vous prie de croire, Madame, en l'expression de mes sentiments dévoués.



Dr Nicole Meslier  
Présidente du CPP Ouest II

## CAHIER D'OBSERVATION TEMOINS

### IMOHS

(CONFIDENTIEL)

« Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie thérapeutique »

N° du protocole : RC-P00111

N° d'enregistrement ID-RCB :

N° TEMOIN :

|\_|\_|\_|\_|

*N° inclusion (par ordre chronologique)*

INITIALES PATIENT :

|\_|\_|-|\_|\_|

*Nom - Prénom*

DATE D'INCLUSION :

|\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

*(= Date de recueil de la non-opposition)*

INVESTIGATEUR :

.....

Promoteur

**Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL)**

Hôpital Saint Philibert

115 rue du Grand But BP 249

59462 Lomme Cedex

Investigateur Principal

Dr. Marie LAMIAUX  
 Chef de clinique  
 Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille  
 Hôpital St Vincent de Paul  
 Service de Dermatologie-Vénérologie  
 Boulevard de Belfort BP 387, 59020 Lille Cedex  
 Téléphone : 03 20 87 75 76  
 Email : lamiaux.marie@ghicl.net

**Informations générales sur le patient**

Date de la visite : .....

Date de naissance (mois/année) : .....

Sexe :  homme    femme

**Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion**

<b><u>Critères d'inclusion des témoins :</u></b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
➤ Patient majeur (≥18 ans)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Ne présentant pas d'antécédents d'hidradénite suppurée ou de lésions évocatrices d'hidradénite suppurée (abcès à répétition dans les plis, suppuration récurrente dans les plis, drainages répétés dans les zones de plis)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Ayant une indication à un traitement chirurgical d'abdominoplastie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Naïfs de traitements immunomodulateurs (corticothérapie, biothérapie, apremilast, rétinoïdes) ou immunosuppresseurs (méthotrexate, ciclosporine) dans les 6 mois précédent l'inclusion, hors prise d'antibiotiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Ayant donné son accord de participation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Affilié à la sécurité sociale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b><u>Critères de non inclusion des témoins :</u></b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
➤ Immunodépression, une ou des maladies auto-immunes, maladies cancéreuses ou maladies infectieuses aiguës ou chroniques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Difficulté de compréhension ou de lecture du français	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

➤ Patient déjà inclus dans un essai thérapeutique interventionnel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Patient sous tutelle ou curatelle	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Femme enceinte ou allaitante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Informations Cliniques et Paracliniques**

**Données Cliniques**

➤ Poids : ..... kilos      Taille : ..... m      IMC :  
..... kg.m<sup>2</sup>

**Chirurgie**

Date de la chirurgie : .....

**Photographies :**

➤ Photographies de la pièce opératoire réalisées (avant et après prélèvements) :  
 oui     non

**Prélèvements tissulaires : 3 prélèvements de 1 cm<sup>3</sup>**

➤ Prélèvements réalisés :  oui     non

**Bilan de fin d'étude**

**Participation du patient**

Le patient a-t-il effectué l'intégralité de l'étude ?  oui     non

Si non, date d'arrêt prématuré : .....

Préciser la raison :

Sortie d'étude :

Prélèvements tissulaires non réalisés

Chirurgie non réalisée

Prise de traitements interdits

Retrait de consentement du patient (*conservation des données déjà recueillies mais opposition pour le recueil de données futures*)

Décès,

• Date : |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

• Cause du décès : .....

Autre,

Préciser : .....

### Déviations au protocole

---

Déviations au protocole :  oui  non

Si oui, préciser :

Patient inclus à tort

Autre,

Préciser : .....

### Validation du CRF

---

Nom de l'investigateur :  oui  non

Date : .....

Signature : .....

# CAHIER D'OBSERVATION PATIENTS

## IMOHS

(CONFIDENTIEL)

« Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie thérapeutique »

N° du protocole : RC-P00111

N° d'enregistrement ID-RCB :

N° PATIENT :

|\_|\_|\_|\_|

*N° inclusion (par ordre chronologique)*

INITIALES PATIENT :

|\_|\_|-|\_|\_|

*Nom - Prénom*

DATE D'INCLUSION :

|\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_|\_|\_|

*(= Date de recueil de la non-opposition)*

INVESTIGATEUR :

.....

### Promoteur

**Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL)**

Hôpital Saint Philibert  
115 rue du Grand But BP 249  
59462 Lomme Cedex

### Investigateur

Dr. Marie LAMIAUX

Chef de clinique  
Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille  
Hôpital St Vincent de Paul  
Service de Dermatologie-Vénérologie  
Boulevard de Belfort BP 387, 59020 Lille Cedex  
Téléphone : 03 20 87 75 76  
Email : lamiaux.marie@ghicl.net

**Informations générales sur le patient**

Date de la visite : .....

Date de naissance (mois/année) : .....

Sexe :  homme  femme

Profession actuelle : .....

- Agriculteurs exploitants
- Artisans, commerçants et chefs d'entreprise
- Cadres et professions intellectuelles supérieures
- Professions Intermédiaires
- Employés
- Ouvriers
- Retraités
- Autres personnes sans activité professionnelle

**Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion**

<b>Critères d'inclusion des patients atteints d'HS :</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
➤ Patient majeur (≥18 ans)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

➤ Porteur d'une HS modérée à sévère (grade Hurley ≥2) de phénotype classique ou phénotype glutéal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Ayant une indication à un traitement chirurgical (indication d'exérèse)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Naïf de traitements immunomodulateurs (corticothérapie, biothérapie, apremilast, rétinoïdes) ou immunosuppresseurs (méthotrexate, ciclosporine) dans les 6 mois précédent l'inclusion, hors prise d'antibiotiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Ayant donné son accord de participation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Affilié à la sécurité sociale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b><u>Critères de non inclusion des patients atteints d'HS :</u></b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
➤ Immunodépression, une ou des maladies auto-immunes, maladies cancéreuses ou maladies infectieuses aiguës ou chroniques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Difficulté de compréhension ou de lecture du français	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Patient déjà inclus dans un essai thérapeutique interventionnel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Patient sous tutelle ou curatelle	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ Femme enceinte ou allaitante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
➤ HS syndromique, HS de phénotype folliculaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Informations Cliniques et Paracliniques

### Comorbidités

- Antécédents personnels :
- Maladies auto-immunes (lupus, polyarthrite rhumatoïde...)  oui  non
  - Maladies auto-inflammatoires (MICI, PASH syndrome...)  oui  non
  - Cancers actifs ou rémission < 5 ans  oui  non
  - Maladies infectieuses aiguës ou chroniques (VIH, VHB, VHC...)  oui  non
- non

- Déficit immunitaire  oui  non
  
- Antécédents familiaux de Maladie de Verneuil :  oui  non
- Antécédents familiaux de MICI :  oui  non
- Antécédents familiaux de rhumatisme inflammatoire :  oui  non
  
- Traitements actuels hors maladie de Verneuil : .....

  - Prise d'antibiotiques (cycline, augmentin, rifampicine-dalacine....)  oui  non
  
  - Prise d'immunomodulateurs (rétinoïdes, biothérapies....)  oui  non
  
  - Prise d'immunosuppresseurs (méthotrexate, ciclosporine....)  oui  non

  
- Tabagisme actif :  oui  non  sevré
  
- si oui, estimation en paquet-année : .....
  
- Prise de cannabis :  oui  non
  
- Poids : ..... kilos      Taille : ..... m      IMC :  
..... kg.m<sup>2</sup>

### Histoire de la maladie

---

- Age de début des poussées d'hidradénite suppurée : .....
  
- Age du diagnostic : .....

### Présentation clinique de la Maladie de Verneuil

---

- Score DLQI : ...../30
- Stade de Hurley :  I     II     III
- Localisation :  axillaire    mammaire    tronc    fessier/glutéal    folliculaire  
 inguinale    visage
- Phénotype clinique :  axillo-mammaire/classique     folliculaire      
fessier/glutéal

IHS4 (points) =  
number of nodules            × 1 +  
number of abscesses        × 2 +  
number of draining tunnels  
(fistulae/sinuses)            × 4

Mild HS:                    ≤ 3 points  
Moderate HS:              4–10 points  
Severe HS:                 ≥ 11 points

➤ Score IHS4 : ..... points

**Traitements antérieurs et dates de début et arrêt du traitement**

---

- Zinc :  oui    non  
si oui, date de dernière prise : .....
- Antibiothérapies courtes (AUGMENTIN, PYOSTACINE, ...):  oui    non  
si oui, date de dernière prise : .....
- Antibiothérapies prolongées :
  - Cyclines :  oui    non  
si oui, date de dernière prise : .....
  - RIFAMPICINE – DALACINE :  oui    non  
si oui, date de dernière prise : .....

▪ Autres :  oui  non

si oui, date de dernière prise : ..... et nom de l'antibiothérapie :  
.....

➤ Injections de KENACORT :  oui  non

si oui date de dernière prise : .....

➤ Lasers :  oui  non

si oui date de dernière prise : .....

➤ Traitements chirurgicaux :  oui  non

si oui date de dernière prise : .....

➤ Rétinoïdes :  oui  non

si oui date de dernière prise : .....

➤ SPIRONOLACTONE :  oui  non

si oui date de dernière prise : .....

➤ Biothérapies :  oui  non

si oui date de dernière prise : .....et nom de la biothérapie :  
.....

### Bilan biologique

Date : .....

**Résultats :**

---

- Leucocytes : ..... G/L
- Neutrophiles : ..... G/L
- Lymphocytes : ..... G/L
- CRP : ..... mg/L

### Prélèvements sanguins

#### 2 Tubes secs 5 mL

- 
- Prélèvements réalisés :  oui  non

#### 3 Tubes EDTA 5 mL

- 
- Prélèvements réalisés :  oui  non

### Chirurgie

Date de la chirurgie : .....

#### Photographies :

- 
- Photographies de la pièce opératoire réalisées :  oui  non

#### Prélèvements tissulaires : 3 prélèvements de 1 cm<sup>3</sup>

- 
- Prélèvements réalisés :  oui  non

### Bilan de fin d'étude

#### Participation du patient

---

Le patient a-t-il effectué l'intégralité de l'étude ?  oui  non

Si non, date d'arrêt prématuré : .....

Préciser la raison :

Sortie d'étude :

Prélèvements sanguins ou tissulaires non réalisés

Chirurgie non réalisée

Prise de traitements interdits

Retrait de consentement du patient (*conservation des données déjà recueillies mais opposition pour le recueil de données futures*)

Décès,

• Date : |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

• Cause du décès : .....

Autre,

Préciser : .....

### Déviations au protocole

---

Déviatio(n)s au protocole :  oui  non

Si oui, préciser :

Patient inclus à tort

Autre,

Préciser : .....

### Validation du CRF

---

Nom de l'investigateur :  oui  non

Date : .....

Signature : .....

## **Annexe 6 : Notice d'information pour les patients et témoins**

### **NOTICE D'INFORMATION DESTINEE AU PARTICIPANT**

#### **« IMOHS »**

**Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite suppurée  
et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie thérapeutique**

**Numéro de protocole :** RC-P00111

Numéro IDRCB : XXX

**Promoteur / Responsable de traitement :** Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), Hôpital Saint Philibert, 115 rue du Grand But, 59462 LOMME Cedex, représenté par son Directeur Général Monsieur Laurent DELABY, représentant du responsable de traitement

**Investigateur principal :** Dr Marie LAMIAUX, Hôpital Saint Vincent de Paul, Service Dermatologie-Vénérologie, Boulevard de Belfort, 59020 LILLE Cedex

Madame, Monsieur,

Il vous est proposé de participer, **en tant que témoin**, à une étude organisée par le Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille intitulée « **IMOHS : Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie thérapeutique** ».

Nous vous proposons de lire attentivement cette lettre d'information dont le but est de répondre aux questions que vous seriez susceptible de vous poser.

Avant d'autoriser votre participation, vous disposez d'un délai de réflexion afin de prendre connaissance de ce document.

Vous pourrez à tout moment durant la recherche, vous adresser à votre médecin pour lui poser toute question complémentaire.

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude, sans que cela n'affecte votre prise en charge habituelle par l'équipe de soins ni vos relations avec l'équipe médicale.

## **OBJECTIF DE LA RECHERCHE**

L'Hidradénite suppurée (HS), encore appelé Maladie de Verneuil, est une maladie inflammatoire chronique de la peau se localisant principalement dans les plis cutanés. La maladie se caractérise par des douleurs, des nodules inflammatoires, des abcès, des fistules et des cicatrices hypertrophiques (en relief). Cette maladie est encore mal connue et les moyens thérapeutiques sont limités, avec principalement l'utilisation d'antibiotiques dans le but de contrôler les poussées, ou encore la chirurgie pour les formes les plus évoluées.

L'objectif de cette recherche est d'étudier le dysfonctionnement du système immunitaire chez les patients atteints d'HS, et de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Cette étude pourra nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de cette maladie dans le but de pouvoir améliorer la prise en charge des patients.

## **DEROULEMENT DE LA RECHERCHE**

Il s'agit d'une étude portant sur l'analyse et la comparaison de prélèvements sanguins et tissulaires, provenant de patients atteints d'HS et de sujets témoins non porteurs d'HS.

Vous n'aurez pas besoin de vous déplacer spécifiquement à l'hôpital pour cette recherche.

Tout d'abord, vous effectuerez une première visite pendant laquelle votre médecin recueillera votre accord de participation (cette visite aura lieu en même temps que l'une de vos consultations habituelles). Il recueillera ensuite vos données sociodémographiques (âge, sexe, poids et taille).

Dans le cadre de votre prise en charge, vous allez bénéficier d'une chirurgie (abdominoplastie).

A la suite de votre chirurgie, des prélèvements seront réalisés sur la pièce opératoire afin de réaliser des analyses supplémentaires dans le cadre de cette étude.

Les échantillons tissulaires qui seront analysés seront comparés à des échantillons tissulaires provenant de patients atteints de la Maladie de Verneuil.

Cette recherche ne comporte pas de visite de suivi supplémentaire.

### **VOTRE PARTICIPATION A LA RECHERCHE**

Votre participation consistera à donner votre accord pour l'utilisation des données sociodémographiques recueillies, pour le prélèvement d'échantillons tissulaires sur la pièce opératoire ainsi que pour la réalisation d'analyses supplémentaires sur les échantillons tissulaires prélevés.

La durée de votre participation à cette recherche est de 6 mois maximum (de la 1<sup>ère</sup> visite jusqu'au jour de la chirurgie).

### **BENEFICES POSSIBLES**

Il n'y a aucun bénéfice direct pour vous à participer à cette étude mais celle-ci permettra d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de la Maladie de Verneuil et ainsi de développer de nouveaux traitements et d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cette maladie.

### **EFFETS INDESIRABLES ET CONTRAINTES PREVISIBLES**

Cette recherche ne présente aucun risque pour vous, autre que ceux liés aux soins.

### **PRISE EN CHARGE EN CAS DE REFUS DE PARTICIPATION**

Votre refus de participation ne modifiera en rien votre prise en charge habituelle.

### **CONDITIONS DE PARTICIPATION**

Vous n'êtes pas autorisé à participer à une autre recherche clinique interventionnelle durant le temps de cette recherche.

Si vous l'acceptez, votre médecin traitant sera informé de votre participation à cette recherche.

## DECISION DE PARTICIPER A LA RECHERCHE

Vous êtes libre de décider de participer ou non à cette recherche. Vous pouvez refuser ou vous retirer de la recherche à tout moment sans avoir à donner la raison de votre décision. Ni vos relations avec l'équipe médicale, ni votre prise en charge ne seront affectées par votre décision. Dans ce cas, veuillez contacter les personnes en charge de ce projet (voir les contacts en fin de document).

Votre participation à la recherche sera sans frais pour vous et vous ne recevrez aucune indemnité pour cette participation. Avant d'accepter de participer, vous disposez d'un délai de réflexion afin de prendre connaissance de ce document. Vous pourrez à tout moment, vous adresser à votre médecin pour lui poser toute question complémentaire.

## CONFIDENTIALITE ET PROTECTION DES PATIENTS

### ➤ Recueil et utilisation des données (Données codées)

Dans le cadre de cette étude à laquelle le GHICL vous propose de participer, un traitement de vos données va être mis en œuvre pour permettre la conduite de l'étude et l'analyse des résultats de la recherche.

Des données sociodémographiques (âge, sexe, poids et taille) seront collectées, ainsi que les données issues des analyses de vos échantillons biologiques.

La finalité du traitement des données est l'étude du dysfonctionnement du système immunitaire chez les patients atteints d'HS, et la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La base juridique du recueil et du traitement des données est la mission d'intérêt public, au sens de l'article 6-1-e) du Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD) n°2016/679 du 27 avril 2016.

Ces données médicales et personnelles vous concernant, nécessaires à l'étude seront collectées par votre médecin et seront utilisées conformément à votre accord de participation ainsi qu'aux lois et à la réglementation en vigueur.

Afin de protéger votre vie privée, ces données de santé à caractère personnel seront codées, c'est-à-dire identifiées par un numéro de code et vos initiales (sans votre nom, ni prénom), avant d'être transmises au promoteur de cette étude : le GHICL. Seul votre médecin pourra faire le lien entre vos données codées, vous et votre dossier médical.

Votre nom et toute autre donnée permettant de vous identifier seront conservés au sein de votre établissement de santé et resteront confidentiels.

Dans le cadre de cette recherche, ces données seront accessibles par le promoteur ou partagées avec des personnes agissant pour son compte, ou avec ses partenaires de recherche qui sont localisés en France ou sur le territoire de l'Union Européenne. Les données ne feront pas l'objet d'un transfert hors du territoire de l'Union Européenne.

Vos données codées pourront également être consultées par les autorités sanitaires habilitées pour vérifier la bonne conduite de l'étude, ou par toute autre personne requise par la loi.

Ces données pourront également être utilisées dans des publications relatives à l'étude proposée mais resteront codées **sans que jamais** votre identité n'apparaisse dans un rapport d'étude ou une publication.

Les données collectées sont susceptibles d'être réutilisées pour des recherches ultérieures et d'autres finalités que celles exposées dans cette note d'information.

Si vous l'acceptez, vos prélèvements biologiques seront conservés pour une durée de 10 ans après la fin de l'étude IMOHS afin de constituer une collection biologique. Cette collection biologique pourra être utilisée dans le cadre de recherches ultérieures. Vous pouvez demander, à tout moment, à ce que vos échantillons soient détruits. Les échantillons prélevés ne permettront pas de vous identifier dans la mesure où ils seront conservés avec une étiquette d'identification codée. Ces recherches pourront être menées, en respectant votre anonymat, au sein des laboratoires du GHICL ou d'un organisme de recherche partenaire. N'auront accès à vos échantillons que le personnel de laboratoire, les représentants des autorités administratives, le promoteur et ses représentants. Le délai de conservation dépassé, les échantillons seront détruits.

➤ **Accès à votre dossier médical**

En acceptant de participer à l'étude, vous autorisez le promoteur, les personnes agissant pour son compte, ses collaborateurs ou partenaires de recherche, les représentants des autorités sanitaires françaises, ou toute autre personne requise par la loi, à consulter votre dossier médical, pour vérifier la bonne conduite de l'étude. Votre dossier médical sera conservé à l'hôpital et restera confidentiel.

➤ **Vos droits concernant vos données**

En application du Règlement Général sur la Protection des Données n°2016/679 du

27 avril 2016 (titre II « Traitements relevant du régime de protection des données à caractère personnel prévu par le règlement (UE) 2016/679 du 27 avril 2016 », chapitre II « Droits de la personne concernée »), de la loi n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée le 12 décembre 2018 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification de vos données personnelles, vous pouvez demander de vous les faire communiquer, ou qu'elles soient rectifiées ou complétées. Vous disposez également du droit de vous opposer à tout moment au traitement de ces données et, dans certains cas, de demander la limitation du traitement de ces données ou leur effacement. Il faut entendre par droit d'opposition, le droit dont vous disposez d'une part à retirer votre accord initialement donné pour la récolte et le traitement de vos données et d'autre part le droit de vous opposer à ce que les données déjà récoltées soient exploitées.

A ce titre, nous vous informons qu'en cas de retrait de votre accord au traitement de vos données, le retrait de votre accord n'aura d'effet que pour les données récoltées postérieurement à ce retrait. En effet, les données déjà collectées seront conservées afin de ne pas mettre en péril la recherche.

La mission d'intérêt public de cette recherche ne vous permet pas de faire valoir votre droit à la portabilité de vos données (c'est-à-dire de demander à récupérer vos données afin qu'elles soient transmises à un autre responsable de traitement).

Vous pouvez accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à toute donnée de l'étude vous concernant en application des dispositions L .1111-7 du Code la Santé Publique. Cependant, certaines de ces informations pourraient n'être disponibles qu'en fin d'étude.

Vos droits concernant vos données s'exercent auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude. Vous pouvez en discuter avec lui. Vous pouvez également contacter le représentant du Délégué à la Protection des Données (DPO) recherche du promoteur à l'adresse suivante : [contact.dpo@ghicl.net](mailto:contact.dpo@ghicl.net), DPO – Secrétariat DRCl, Hôpital Saint-Philibert – Rue du Grand But, BP 249 – 59462 LOMME CEDEX.

Si vous estimez, après nous avoir contactés, que vos droits concernant la réglementation relative à la protection des données ne sont pas respectés, vous pouvez adresser une réclamation auprès de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) : <https://www.cnil.fr/fr/plaintes/>, ou par voie postale : 3 place de Fontenoy, TSA 80715, 75334 PARIS CEDEX 07, téléphone : +33 (0)1 53 73 22 22. Pour plus d'informations sur vos droits, vous pouvez consulter : <https://www.cnil.fr/>.

➤ **La durée de conservation des données**

Vos données seront conservées pendant une durée de 2 ans après la dernière publication des résultats de la recherche ou en l'absence de publication, jusqu'à la signature du rapport final puis archivées pour une période de 15 ans maximum conformément à la réglementation applicable.

➤ **Les autorisations réglementaires**

Conformément à la réglementation en matière de recherche non-interventionnelle, ce protocole a été envoyé pour avis au Comité de Protection des Personnes (Nom du CPP) après tirage au sort. Celui-ci a rendu un avis favorable le XX/XX/20XX. Ce protocole a été transmis pour information à l'Autorité Compétente (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé - ANSM) le XX/XX/20XX.

Enfin, le protocole de recherche est conforme à la méthodologie de référence MR 003 édictée par la CNIL concernant le traitement des données.

Si vous avez des questions concernant l'étude ou vos droits, vous pouvez contacter votre médecin.

<b>RESULTATS DE LA RECHERCHE</b>
----------------------------------

Une fois la recherche terminée, les données collectées seront traitées et analysées par du personnel qualifié pour cette tâche. La confidentialité des données sera respectée.

A l'issue de la recherche, si vous le souhaitez, vous pourrez également être informé(e) des résultats globaux de l'étude lorsque ceux-ci seront disponibles en vous adressant au médecin en charge de la recherche.

<b>CONTACT POUR PLUS D'INFORMATIONS</b>
---

Si vous avez une question quelconque concernant cette recherche, ou si vous souhaitez vous opposer à l'utilisation de vos données, n'hésitez pas à vous adresser au médecin en charge de la recherche :

Dr Marie LAMIAUX, Tél : 03 20 87 75 76

Vous pouvez aussi contacter le Pr Philippe Modiano, Tél : 03 20 87 75 76

## Annexe 7 : Formulaire de recueil de non opposition

### FORMULAIRE DE RECUEIL DE NON OPPOSITION

« IMOHS »

**Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite  
suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie  
thérapeutique**

**RC-P00111**

Je soussigné(e) Dr/Pr \_\_\_\_\_ atteste que Monsieur,  
Madame (Nom, Prénom) \_\_\_\_\_ a été  
informé(e) de la nature et des objectifs du protocole de recherche intitulé « **IMOHS :  
Etude de l'immunomodulation de la réponse immunitaire dans l'Hidradénite  
suppurée et Evaluation in vitro et ex vivo d'une nouvelle stratégie  
thérapeutique** » et avoir répondu à toutes les questions qu'il/elle pouvait se poser.

- J'atteste lui avoir remis un exemplaire de la lettre d'information après lui avoir précisé oralement la finalité de la recherche.
- J'atteste lui avoir détaillé, qu'en application du Règlement Général sur la Protection des Données n°2016/679 et de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés dans sa version modifiée (loi n° 78-17 du 6 janvier 1978), les droits relatifs à ses données personnelles, ses droits d'accès, de rectification, d'opposition, de portabilité et dans certains cas de limitation ou de suppression, s'exercent à tout moment. J'atteste lui avoir communiqué les coordonnées des personnes auprès desquelles ces droits peuvent être exercés.
- J'atteste l'avoir informé qu'il pourrait avoir accès aux résultats globaux de l'étude.

- Je m'engage à traiter les données de manière confidentielles en application de la Loi en vigueur.

J'ai ainsi recueilli son :  Opposition  Non opposition

Information du médecin traitant de la participation du patient à cette recherche :

Le patient exprime son :  Opposition  Non opposition

Date d'information du patient : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Date et Signature du médecin : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_



## Liste de mes publications

- Costedoat I, Wallaert M, Gaultier A, Vasseur R, Vanhaecke C, Viguier M, Marie-Christine Ferrier le Bouëdec, Adrien Coutu, **Marie Lamiaux** et al. Multicenter prospective observational study of dupilumab-induced ocular events in atopic dermatitis patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2023 May;37(5):1056–63.
- Merger M, Modiano P, Gosset P, Benchoukroun S, **Lamiaux M**. Syndrome VEXAS, une présentation cutanée atypique. *Ann Dermatol Vénéréologie - FMC*. 2022 Nov;2(8):A280.
- Séméria L, **Lamiaux M**, Quinchon JF, Modiano P. Anti-p200 pemphigoid mimicking erythema multiforme. *JAAD Case Rep*. 2022 Mar;21:157–9.
- Beauvais D, Karleskind O, Loridant S, Nyga R, **Lamiaux M**, Moreau A-S, et al. Potential Role of Tocilizumab in Severe Gastrointestinal Barrier Damage after CAR T-Cell Therapy. *J Microbiol Immunol Infect*. févr 2021;S1684118221000499.
- **Lamiaux M**, Corazao P, Moralès O, De Schutter C, Gilbert D, Kluza J, Ghiringelli F, et al. Impact of MAPKinase inhibitors and anti-PD1s on the homeostasis and metabolic profile of the immune cells of patients presenting a metastatic melanoma. *The key moments in dermatology*, 4<sup>th</sup> edition. June 2019
- **Lamiaux M**, Scalbert C, Lepasant P, Desmedt E, Templier C, Dziwniel V, et al. Severe skin toxicity with organ damage under the combination of targeted therapy following immunotherapy in metastatic melanoma. *Melanoma Res*. October 2018.
- **Lamiaux M**, Dabouz F, Wantz M, Lebas D, Lasek A, Courivaud D, et al. Successful combined antibiotic therapy with oral clindamycin and oral rifampicin for pyoderma gangrenosum in patient with PASH syndrome. *JAAD Case Rep*. January 2018.