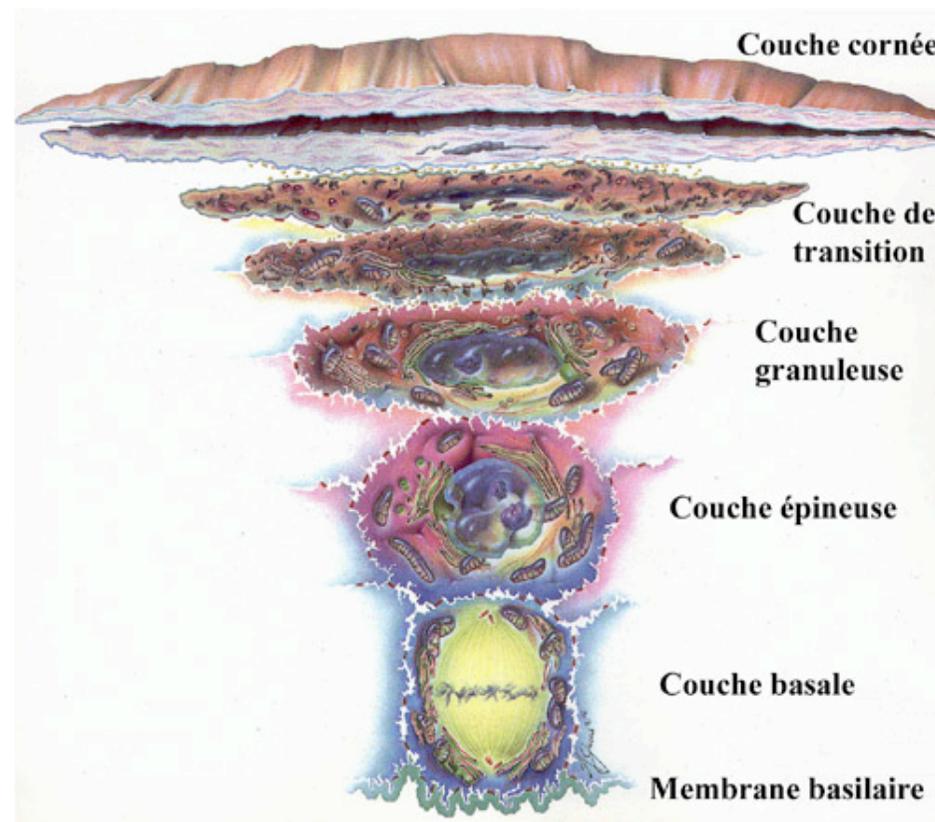




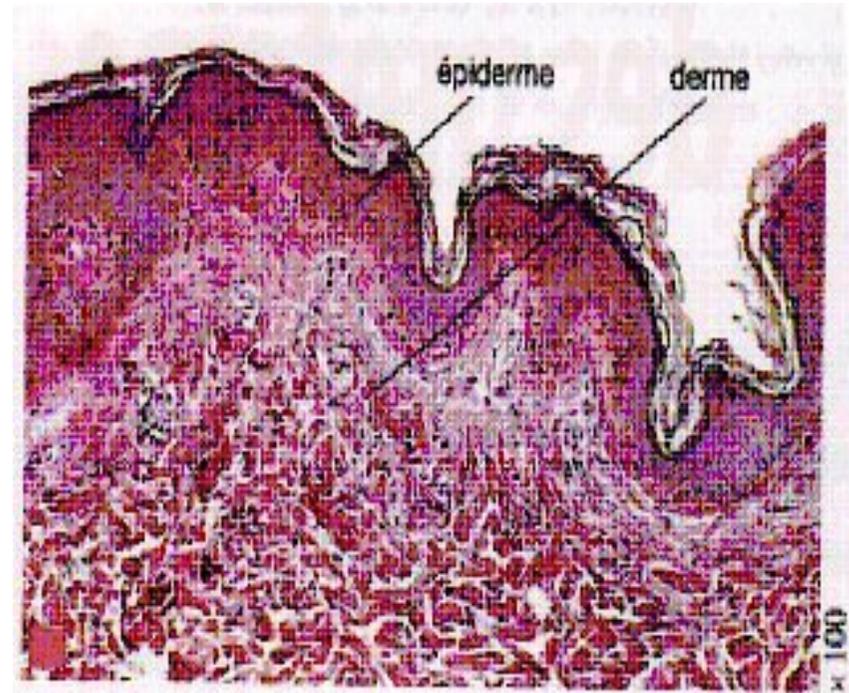
La barrière cutanée: l'autre grande interface avec le monde microbien, commensalisme et pathogénicité



Leçon no 4  
Philippe Sansonetti

(modifié d'après Geras, 1990)

## La peau en quelques chiffres



La peau est un organe composé de  **$2 \times 10^{12}$**  (2000 milliards) de cellules formant plusieurs couches très cohérentes.

Elle intègre **6** barrières en une.

Elle a une surface de **1,75 à 2m<sup>2</sup>** pour environ **5kg** chez l'adulte.

Elle est formée de **3** parties : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

# La barrière cutanée, intégration de barrières multiples

Barrière mécanique (résistance aux agressions mécaniques et traumatismes)

Barrière imperméable (prévient la perte d'eau et d'électrolytes et empêche la pénétration d'irritants, allergènes et toxiques)

Barrière aux rayons UV (protection anti-solaire et anti-tumorale)

Barrière aux agents oxydants (protège les lipides des membranes cellulaires contre le stress oxydatif toxique)

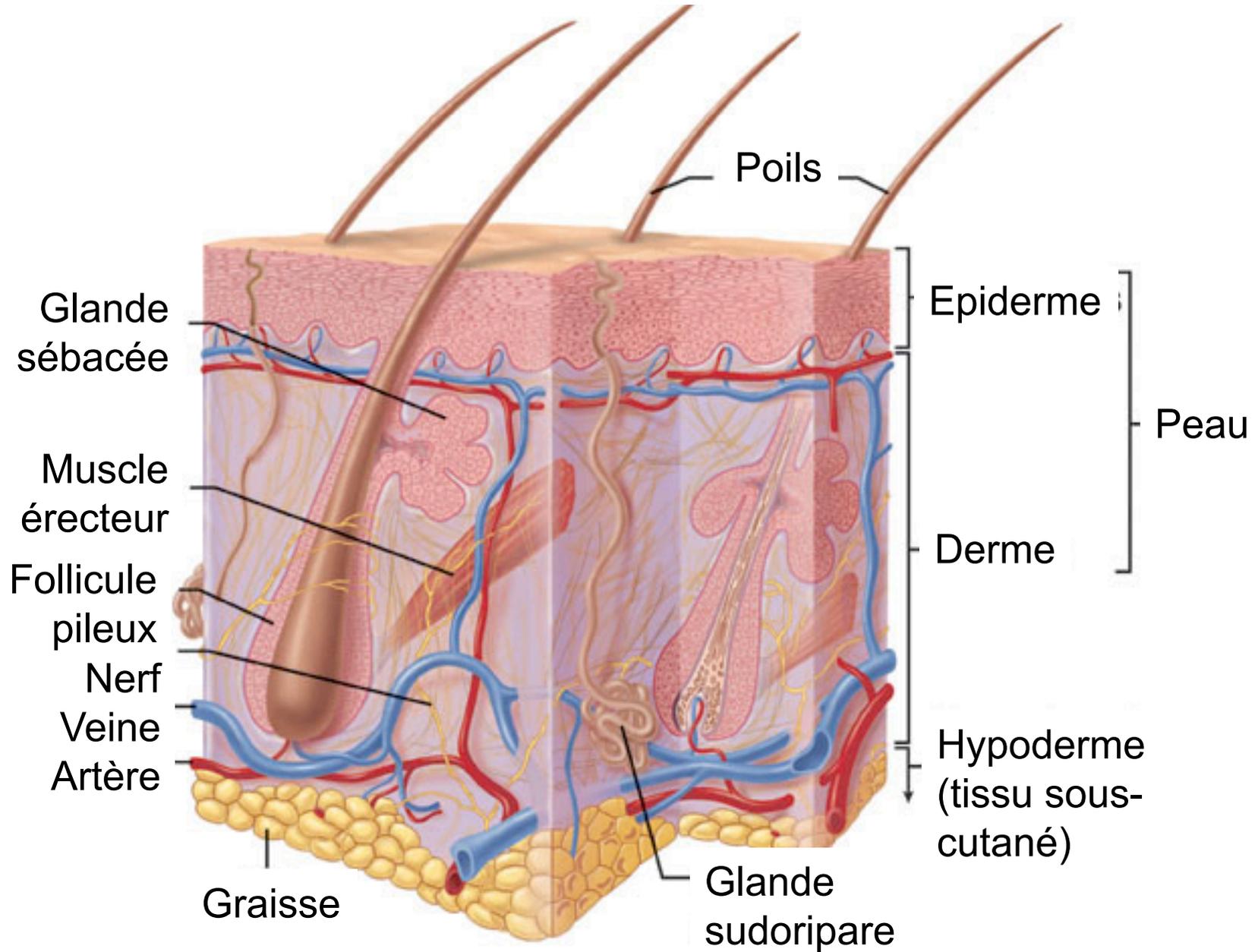
Barrière thermique (isolation thermique)

## **Barrière immunologique et antiinfectieuse**

(orchestre la protection des surfaces externes de l'hôte – 1,75 m<sup>2</sup> chez un adulte de corpulence normale – contre les agressions infectieuses)

- barrière physique
- perception des microorganismes agresseurs,
- développement d'une réponse innée: production de facteurs antimicrobiens et recrutement de cellules inflammatoires comme les polynucléaires neutrophiles
- recrutement de cellules présentatrices d'antigènes (DC)

# Organisation générale de la peau



**L'extraordinaire résistance de la peau nécessite, pour le succès d'une infection, la survenue d'une lésion préalable favorisant l'accès des pathogènes aux tissus profonds:**

**1 – Porte d'entrée épidermique**

Brûlure, morsure, pique, abrasion, pose de matériel étranger, pathologie dermatologique (maladie bulleuse, vésicules infectieuses)  
chirurgie, escarres/ulcérations (diabète, neuropathies)

**2 – Porte d'entrée folliculaire**

- Microorganisme endogène composant le microbiote cutané (staphylocoques)
- Microorganisme exogène (*P. aeruginosa*/folliculite des jacuzzi)

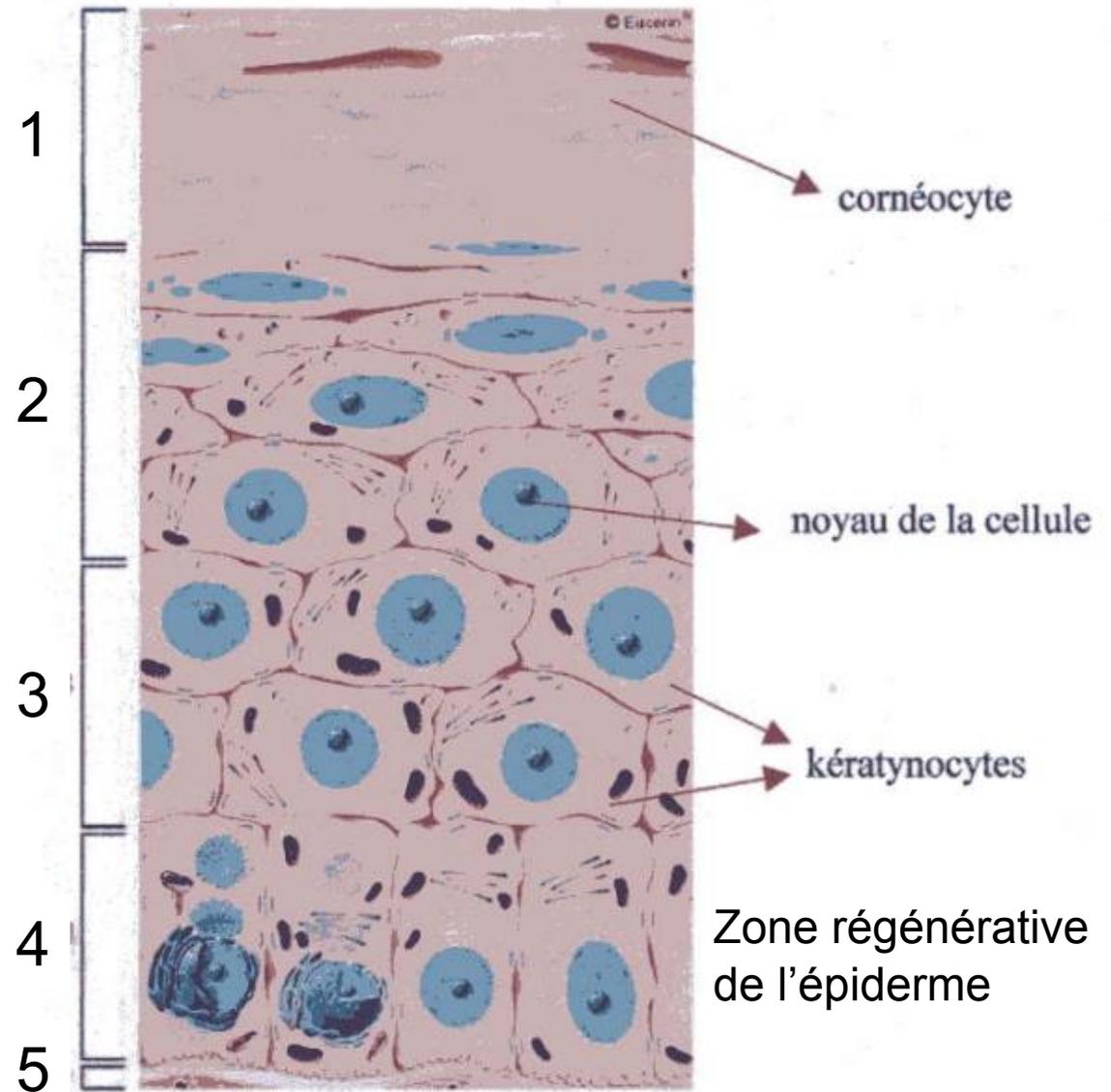
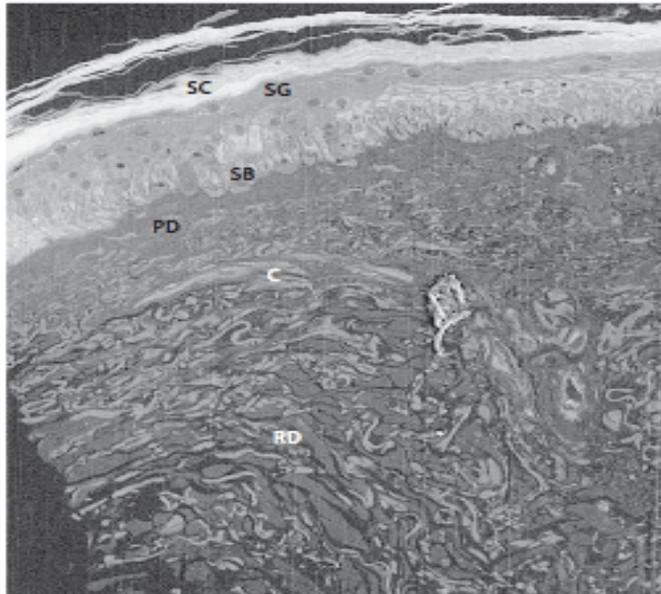
**3 – Rupture, dislocation du striatum corneum par infection endogène**

- Hématogène (virus varicelleux)
- Neurogène (HSV1)

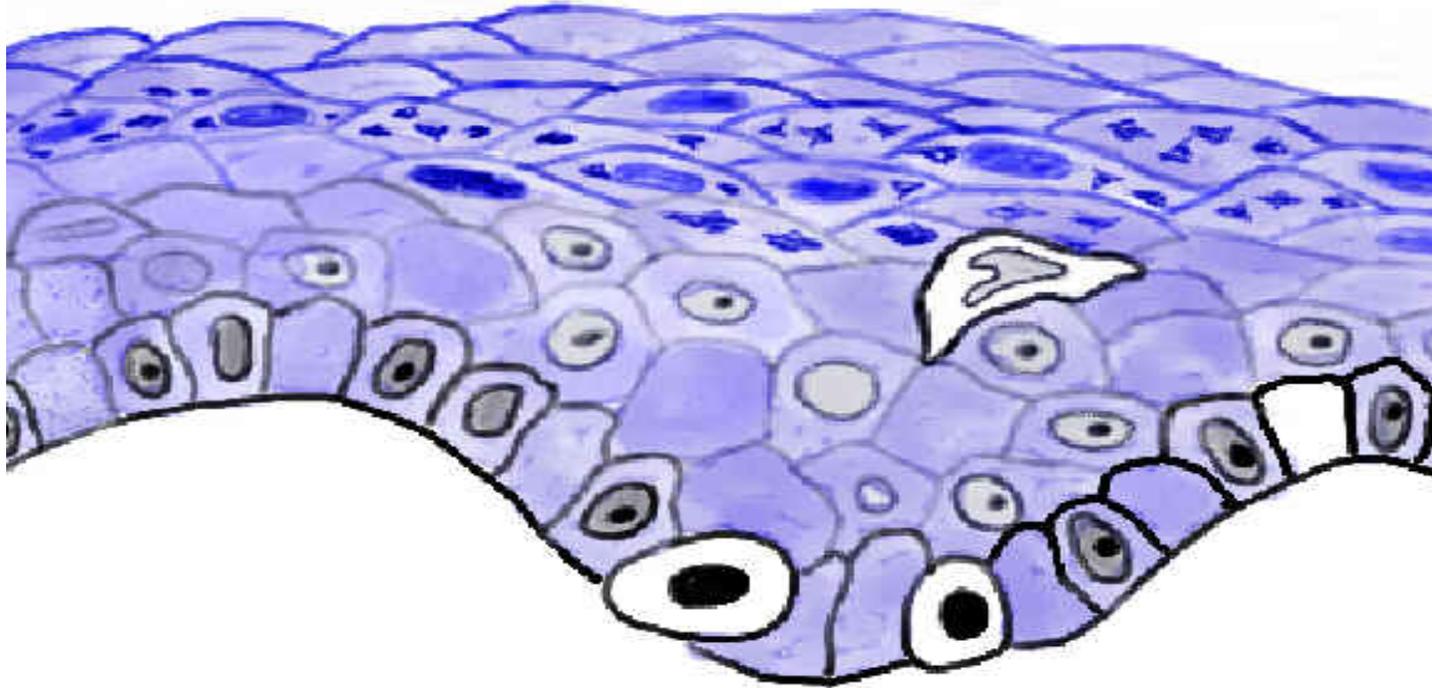
**4 – Diffusion lymphatique latérale et profonde (*Streptococcus pyogenes* et érysipèle.**

**5 – Diffusion hématogène** (ecthyma gangréneux des septicémies à *P. aeruginosa*, purpura fulminans des septicémies à *Neisseria meningitidis*, endocardite à streptocoques « d'Osler »). **Barrière contournée.**

- 1 : **stratum corneum**  
(couche cornée, cellules énuclées)
- 2 : **stratum granulosum**  
(couche granuleuse)
- 3 : **stratum spinosum**  
(couche muqueuse)
- 4 : **stratum basale ou germinativum** (couche basilaire/germinative)
- 5 : jonction avec le derme/membrane basilaire



# Fonctions de barrière des kératinocytes



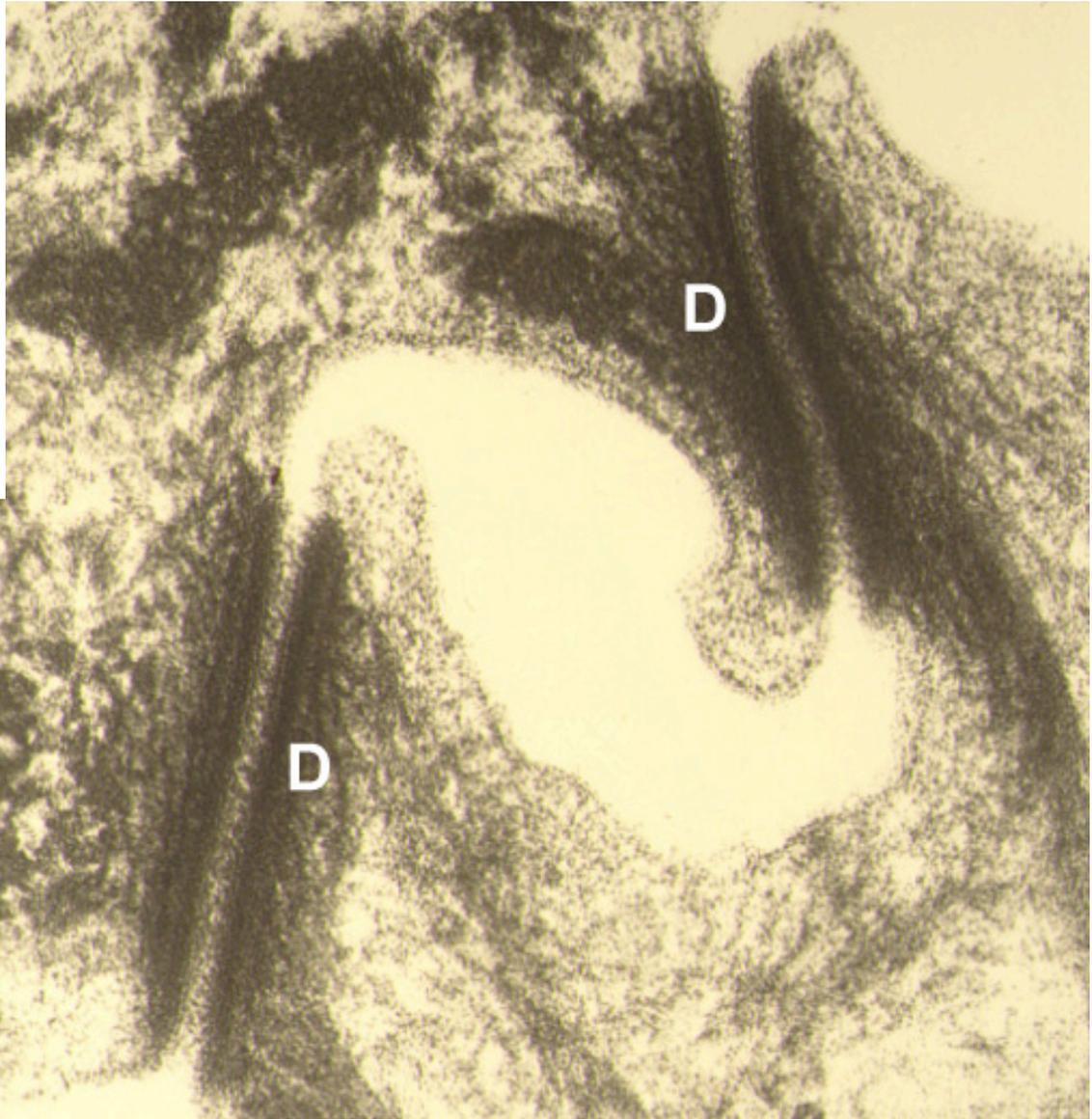
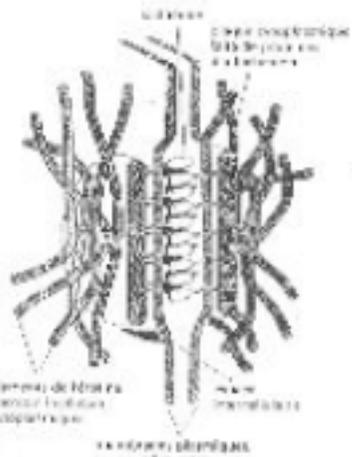
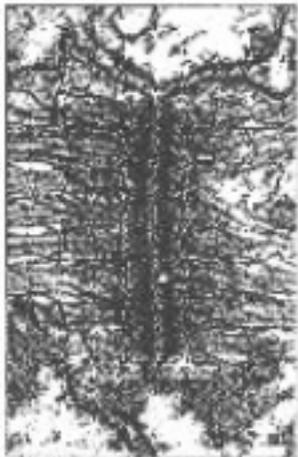
Les kératinocytes ont « classiquement » trois grandes fonctions en rapport avec des structures morphologiquement individualisables.

1 - Ils assurent la cohésion de l'épiderme par leur cytosquelette et les systèmes de jonction-adhésion qu'ils établissent entre eux (desmosomes) ou avec la matrice extracellulaire (hémi-desmosomes)

2 – Ils forment une barrière entre milieu extérieur et milieu intérieur au niveau du stratum corneum.

3 – Ils protègent l'organisme des radiations lumineuses grâce aux mélanosomes de stade IV qu'ils phagocytent à partir des mélanocytes.

---



D = Desmosomes

Kératinocytes

# les filaments intermédiaires (kératine) dans les cellules épithéliales

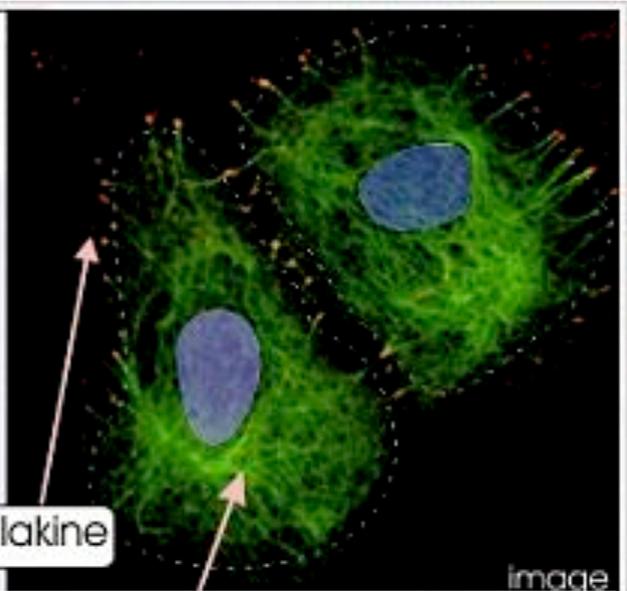
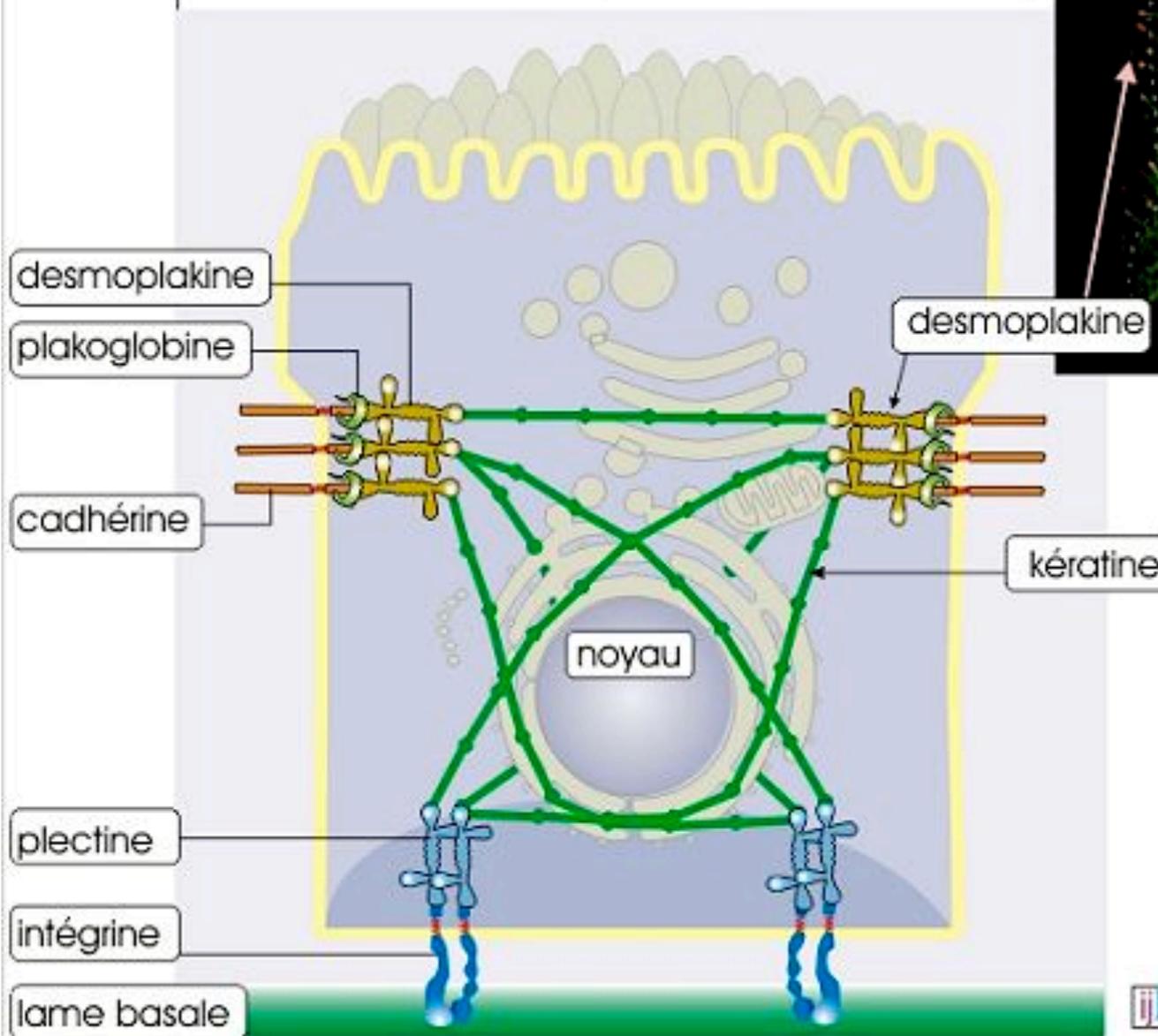
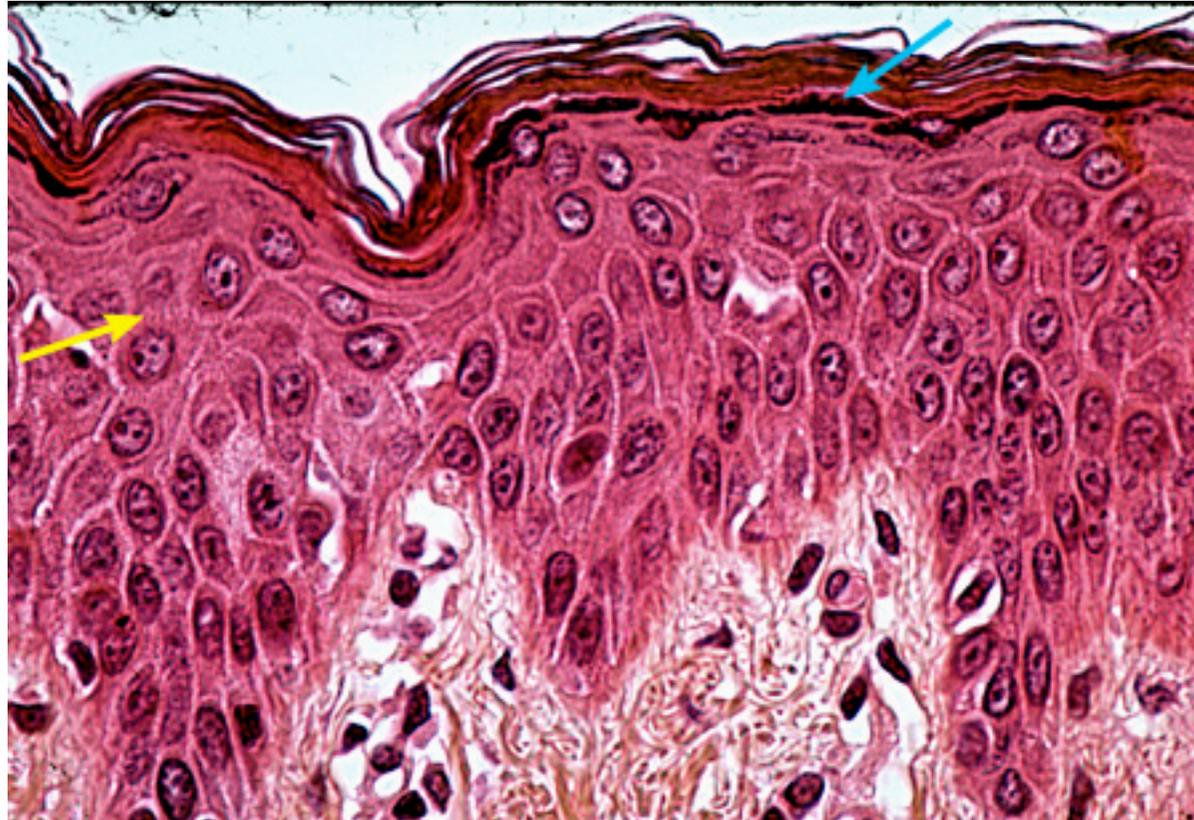


Image  
Windoffer et  
Leube,  
Mainz

vue de  
dessus  
(kératine verte  
desmoplakine brun/  
rouge)

## Matérialisation de l'adhésion intercellulaire: les « épines » des kératinocytes

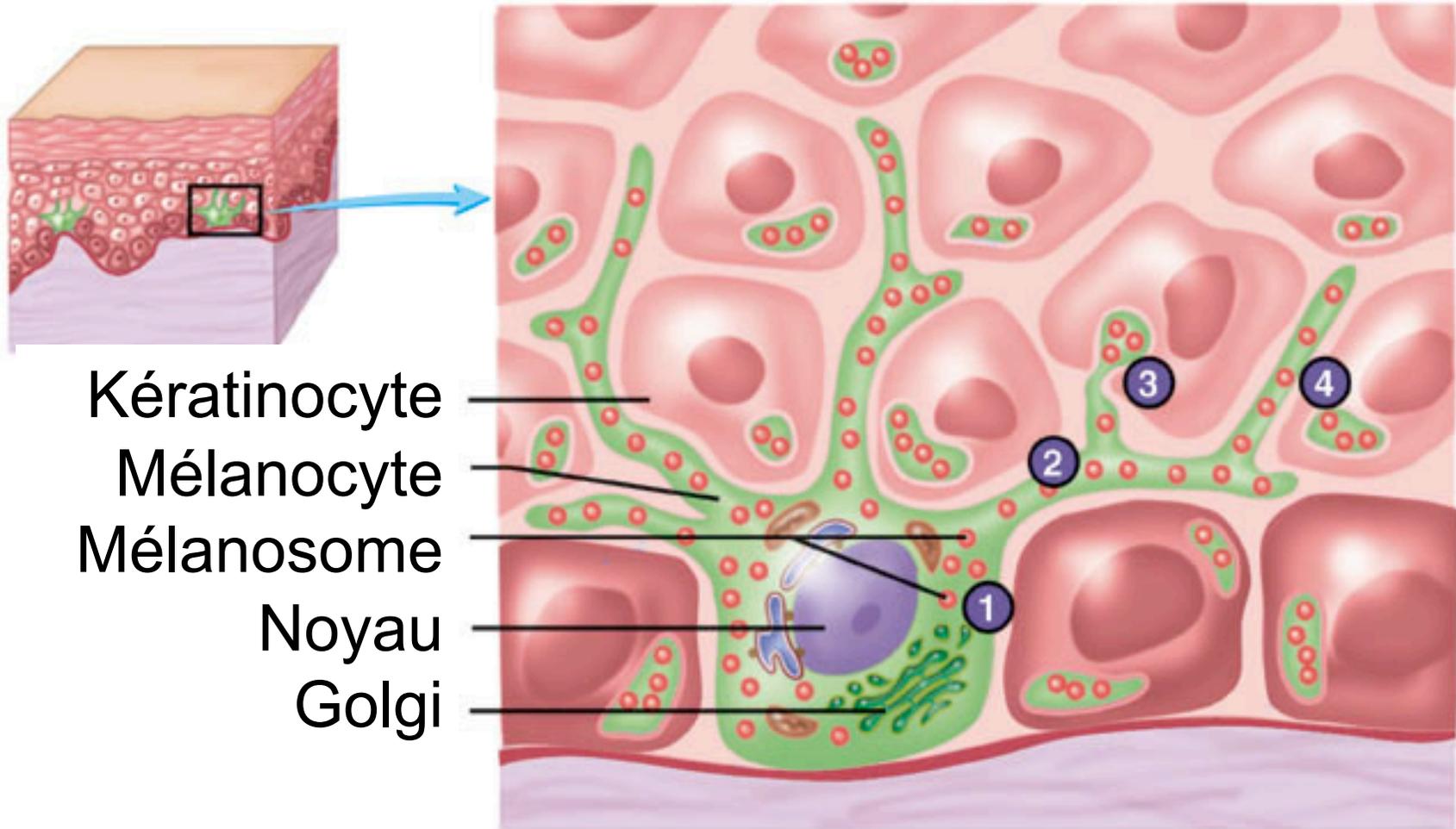


Flèche jaune : ponts intercellulaires, correspondant à l'emplacement des desmosomes

Flèche bleue claire : une cellule du stratum granulosum

# Mécanismes de pigmentation cutanée

## Un lien inattendu avec l'immunité (Syndrome de Griscelli)



Le transport du mélanosome du Golgi vers la membrane cellulaire du mélanocyte avant exocytose nécessite une migration sur les microtubules puis un transfert sur le cytosquelette d'actine sous-cortical dépendant d'un complexe associant Rab27A Slac2-a et Myosine Va. Les mutations dans rab27A causent albinisme ET déficit immunitaire car le transport des perforines des cellules NK dépend aussi de Rab27A.

# Cellules impliquées/recrutées dans la fonction cutanée de barrière immunologique de l'épiderme

1 – **En place**: kératinocytes (barrière physique et production d'effecteurs antimicrobiens: défensines et cathélicidine)

2 – **Mobilisées/recrutées localement du derme/épiderme**:

- Mastocytes (dermique, enzymes protéolytiques, chimioattractants, IL-4)
- Cellules dendritiques (DC), cellules de Langerhans( épidermiques), DC interstitielles (dermiques)

3 – **Recrutées par diapédèse/migration-gradients chimioattractants**:

- Plaquettes (libération massive de médiateurs entraînant aggrégation plaquettaire (thromboxane A<sub>2</sub>, histamine), vaso-constriction (sérotonine, ADP), chimio-attraction des polynucléaires et des macrophages (acide arachidonique, PDGF, PF-4, TGF)
- Polynucléaires neutrophiles (ROS, NET, enzymes protéolytiques, phagocytose)
- Macrophages (phagocytose, médiateurs de l'inflammation et de la réparation tissulaire, IL-12)
- Lymphocytes T (IFN $\gamma$ , médiateurs réponse immunitaire innée et adaptative)

# **Kératinocytes et Cellules de Langerhans: un système intégré de défense de l'épiderme (1)**

**Les kératinocytes** sont plus que qu'un obstacle mécanique à la progression des microorganismes dans l'épiderme.

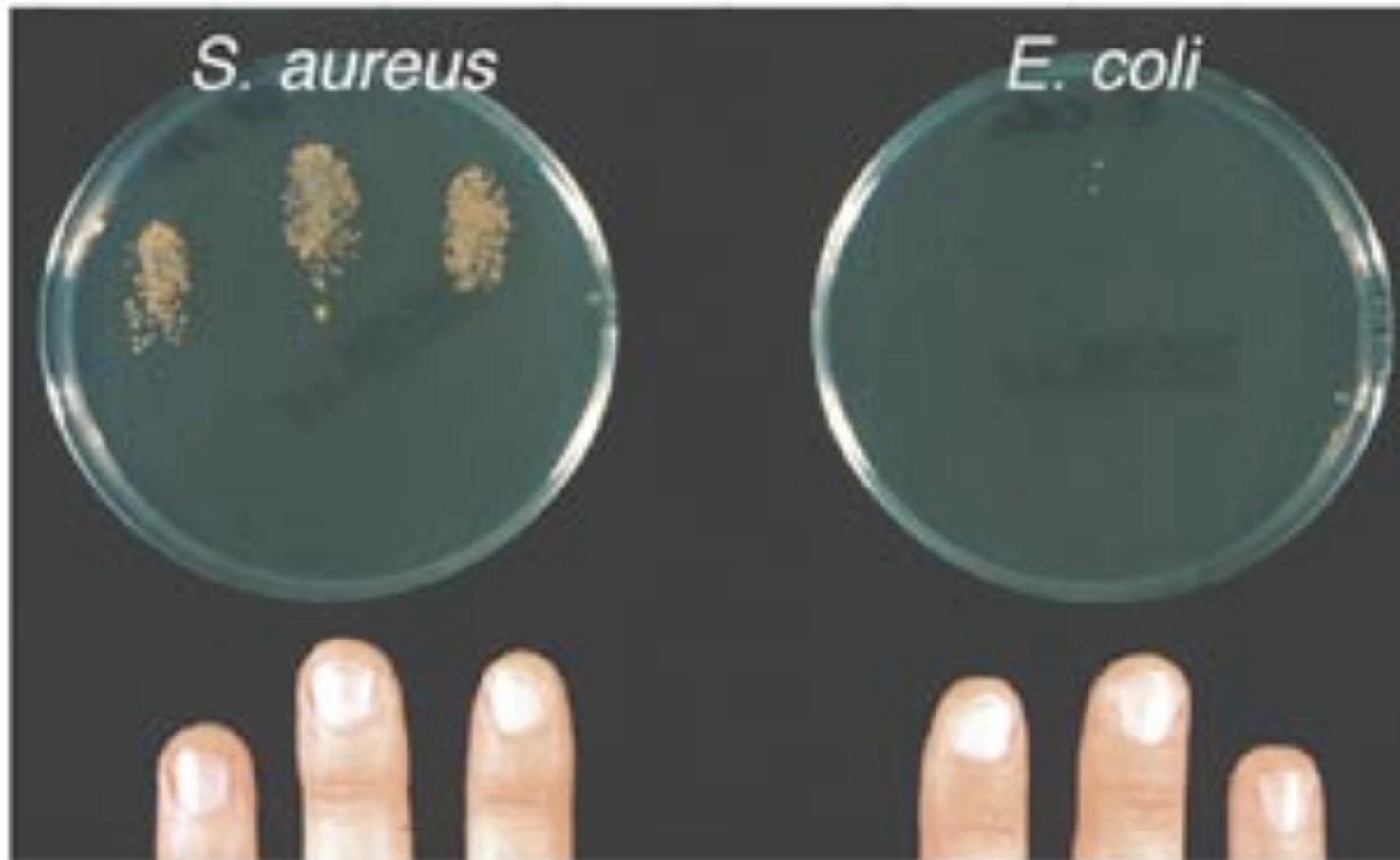
En l'absence de vascularisation de l'épiderme, ils portent l'essentiel de la réponse immédiate aux agents microbiens. Ils produisent en grande quantité de puissants effecteurs antimicrobiens dont certains sont exprimés constitutivement et d'autres induits dans le contexte de la réponse innée:

**Lysozyme** (Elias PM. 2005. J. Invest. Dermatol., 125:183-200),  
**RNAse7** (4-8 mg/g) spectre large, le plus puissant effecteur, bactéricide sur *Enterococcus faecalis* >20nM (Harder J & Schröder JM. 2002. J. Biol. Chem., 277:46779-46784)

**Psoriasine,  $\beta$ -Défensines, Cathélicidines** (Braff M et coll. 2005. J. Invest. Dermatol., 125:9-13; Gallo RL et coll. 2002. J. Allergy Clin. Immunol., 110:823-831)

# Activité antibactérienne de la peau

asin  
-2  
-3  
e-7  
37  
d skin



Bevins CL. 2004. Nat. Immunol., 6:12-13

Individu sain, main lavées

Phalangettes contaminées avec  $10^4$  cfu/ml de *S. aureus* et *E. coli*

Respectivement main gauche et droite.

30 minutes d'attente

Phalangettes pressées sur gélose nutritive, culture sur la nuit

## **Protection anti-*E. coli* assurée par une protéine principale**

*E. coli* est exceptionnellement trouvé comme agent colonisateur de la peau (Nubie WC in: The skin microflora and microbial disease. (Ed. Nobie WC) 210 (Cambridge University Press, Cambridge UK, 1992). **Pourquoi ?**

Hypothèse: un facteur antimicrobien particulier est capable de protéger les surfaces cutanées contre *E. coli* et les bactéries apparentées, en particulier dans les régions qui y sont particulièrement exposées comme la région périnéale, ou dans des situations d'exposition massive comme la période néonatale.

Le groupe de Jens Schröder a identifié une protéine de 11 kDa (metal-ion binding protein S100), la psoriasine, comme le principal effecteur bactéricide pour *E. coli*, produit par les kératinocytes, à la surface cutanée. La psoriasine est produite constitutivement à faible niveau et fortement induite par l'infection cutanée. Fonction inhibée par Zn<sup>++</sup>.

# La Psoriasine

S100A7 ou S100 Calcium-binding protein A7 ou Psoriasine est un membre de la famille des protéines contenant 2 « EF-hands » liant le  $\text{Ca}^{++}$ .

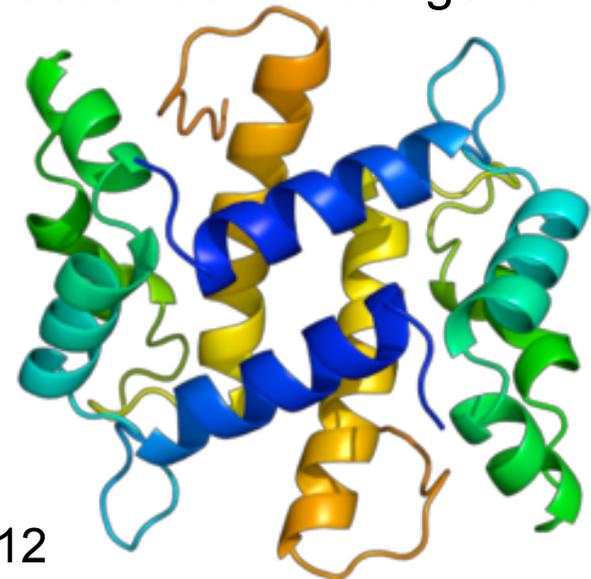
Les protéines S100 sont localisées dans le cytoplasme ou le noyau cellulaire et impliquées dans un large spectre de régulations essentielles comme celles du cycle et de la différenciation cellulaire.

13 membres au minimum dont les gènes sont localisés sur un « cluster » sur le chromosome 1q21.

S100A7 diffère des autres protéines S100 par une absence de liaison du  $\text{Ca}^{++}$  sur le « EF-hand » N-term.

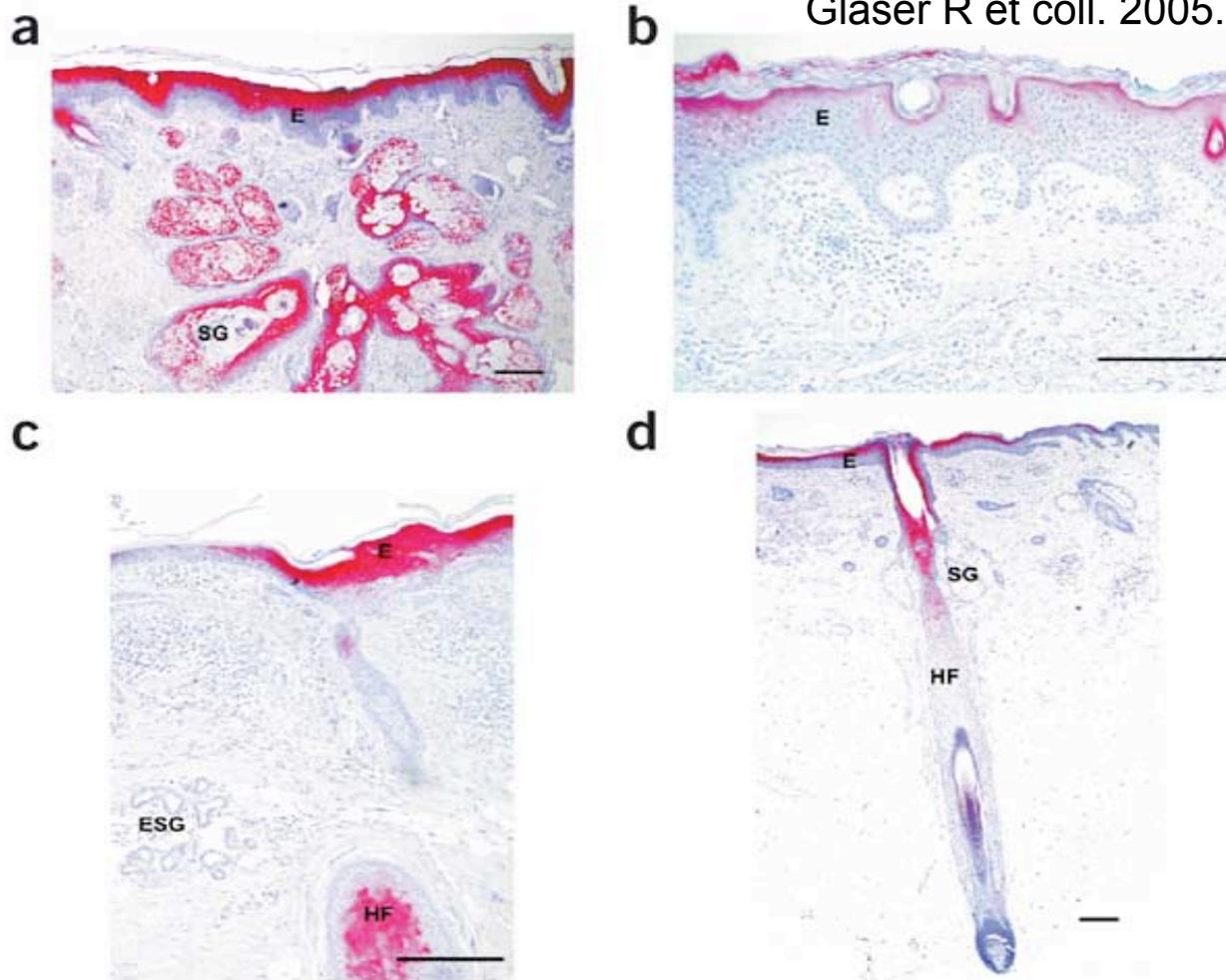
S100A7/Psoriasine est fortement surexprimée dans les lésions cutanées des patients atteints de psoriasis. Pas de mutation associée à ce gène impliquée dans la sensibilité au psoriasis.

Activité microbicide élective sur *E. coli*.



# Sites d'expression de la psoriasine

Gläser R et coll. 2005. Nat. Immunol., 6:57-64



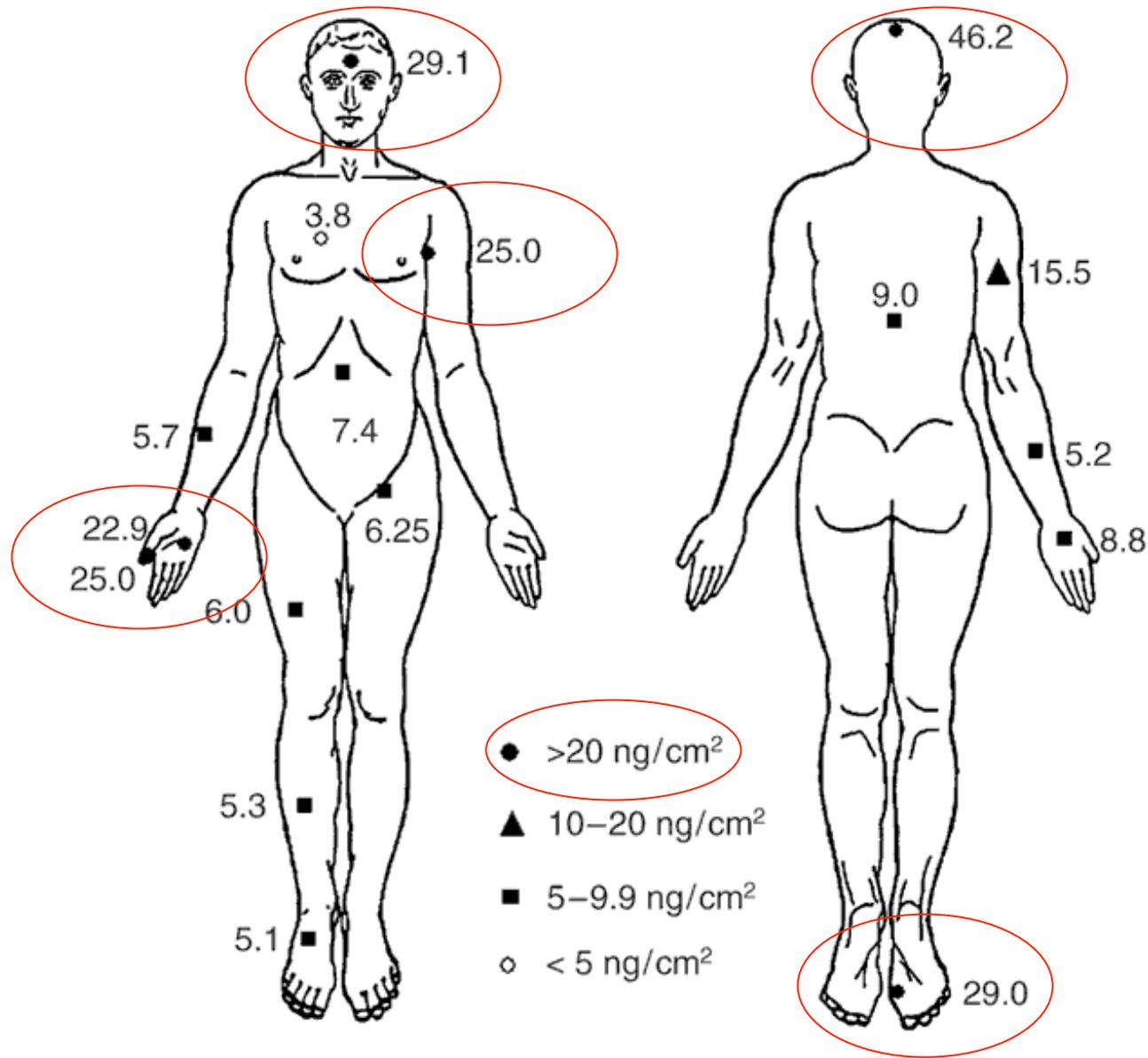
La psoriasine est exprimée en foyers dans la peau humaine et de manière très localisée dans les follicules pilo-cébacés. mAb anti-psoriasine (coloration rouge)

(a) Localisation dans les kératinocytes en position supra-basale dans l'épiderme et dans les glandes sébacées (SG)

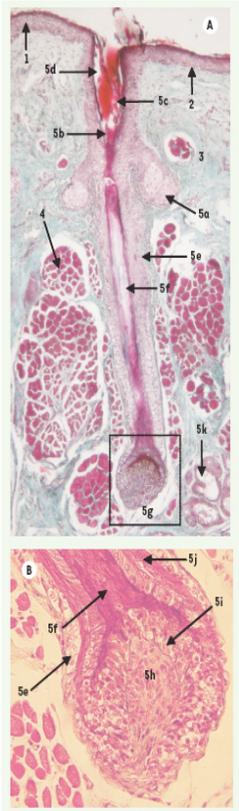
(b,c) Expression focale dans la partie la plus haute de l'épiderme

(d) Idem au niveau du follicule pileux.

# Niveau variable d'expression de la psoriasine à la surface de la peau en fonction du site corporel



# Peptides antimicrobiens: cathélicidines



Chez l'homme la cathélicidine hCAP18 est exprimée stratégiquement de façon constitutive au niveau des follicules pilo-cébacés (une des possibles voies d'entrée microbienne dans la peau).

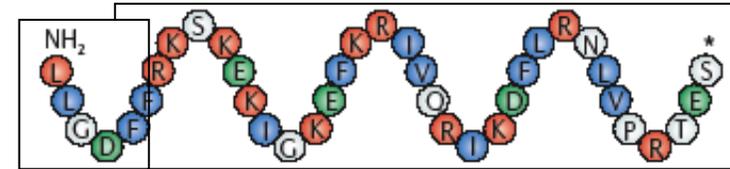
Elle est inducible dans les régions épidermiques interfolliculaires

L'induction en conditions inflammatoires implique IGF-1, TGF- $\alpha$  et Vitamine D (Gambart AJ et coll. 2005. FASEB J., 19:1067-1077). Les cathélicidines contiennent un domaine cathéline (cathepsine-like inhibitor) à leur extrémité N-term et un domaine hautement cationique,  $\alpha$ -hélicoïdal à leur extrémité C-term.

Un seul gène chez l'homme codant hCAP18 (Agerberth B et coll. 1995. PNAS, 92:195-199) est processé en LL-37 par la protéinase 3 (PNN, kératinocytes, etc...).

hCAP18/LL37 est bactéricide sur un large spectre de bactéries à Gram + et - à des concentrations mM.

L'implication des cathélicidines dans la défense antimicrobienne cutanée a été démontrée chez la souris où l'absence d'expression de la protéine Cramp (cathelicidin-related antimicrobial peptide) entraîne une plus grande sensibilité à l'infection cutanée par *S. pyogenes* du groupe A (Nizet V et coll. 2001. Nature, 414:454-457)

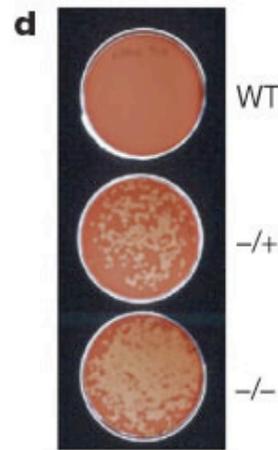
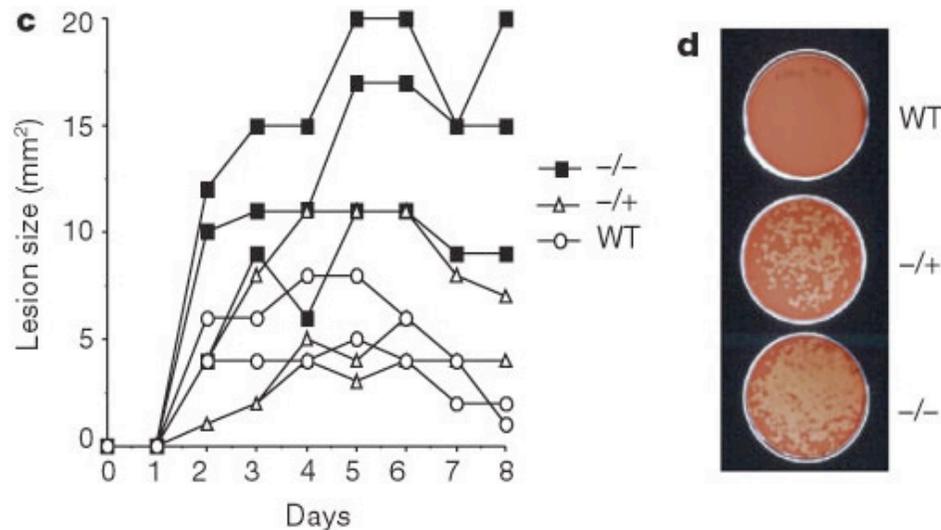
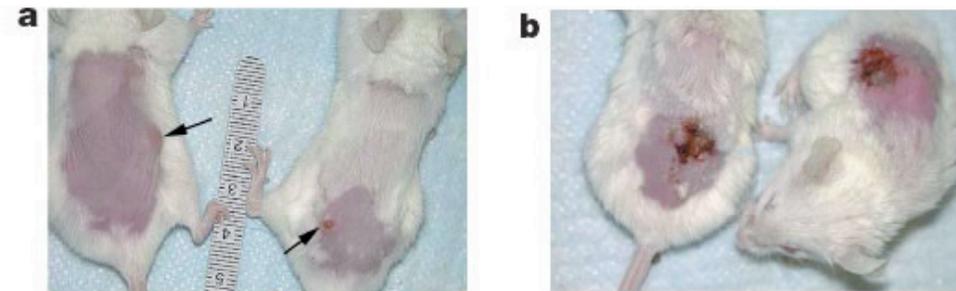


hCAP18/LL-37

Victor Nizet, Takaaki Ohtake, Xavier Lauth, Janet Trowbridge, Jennifer Rudisill, Robert A. Dorschner, Vasumati Pestonjamas, Joseph Piraino, Kenneth Huttner & Richard L. Gallo

Nature 414, 454-457 (2001)

Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection



CRAMP murin est l'équivalent de LL37 humain

Gallo, R. L. et coll. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J. Biol. Chem.* 272, 13088-13093 (1997)

**a**, Wild-type (WT) and **b**, *Cnlp*-null mice following subcutaneous inoculation with GAS. Scale bar is in centimetres. **c**, Area of necrotic ulcer in individual WT (circle), CRAMP +/- (triangle), and CRAMP -/- (square) mice shown against days after infection.

**d**, GAS bacteria cultured from tissue biopsies of WT, CRAMP +/- and CRAMP -/- mice. The experiment shown is representative of five studies in which similar differences were observed ( $n = 12$ ,  $P < 0.001$ ).

# Peptides antimicrobiens: $\beta$ -défensines

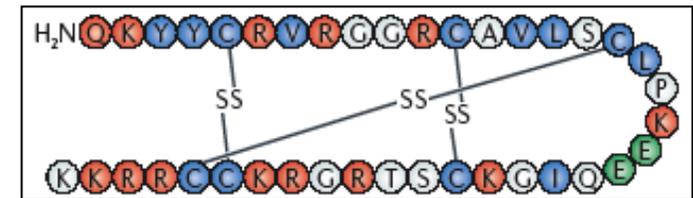
**hBD2**: premier peptide antimicrobien reconnu à partir d'extraits squameux de lésions psoriasiques (Harder J et coll. 1997. Nature, 387:861). Fortement induit en peau inflammatoire, mécanismes d'induction largement inconnus (PAMPs/TLRs, autres ?)

Se lie à l'héparine, PM = 4 kDa

Il est inactif contre *S. aureus* et actif contre une large gamme de bactéries à Gram –

(Harder J & Schröder JM. 2005. J. Leukoc. Biol., 77:476-486).

- ◆  $\beta$ -defensin 2 (epithelial cells)
- ◆  $\beta$ -defensin 3 (epithelial cells)



$\beta$ -defensin 3

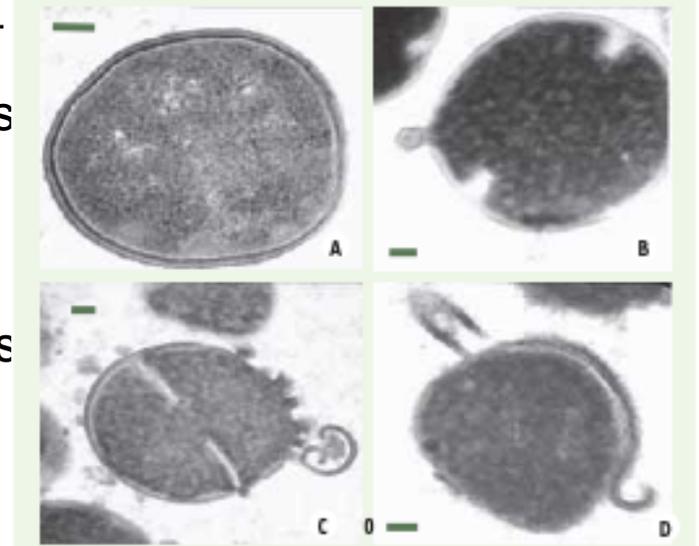
**hBD3**: peptide de 5 kDa, très basique (pI = 10,08)

Découvert dans des squames de psoriasis (Harder J et coll. J. Biol. Chem., 276:5707-5713)

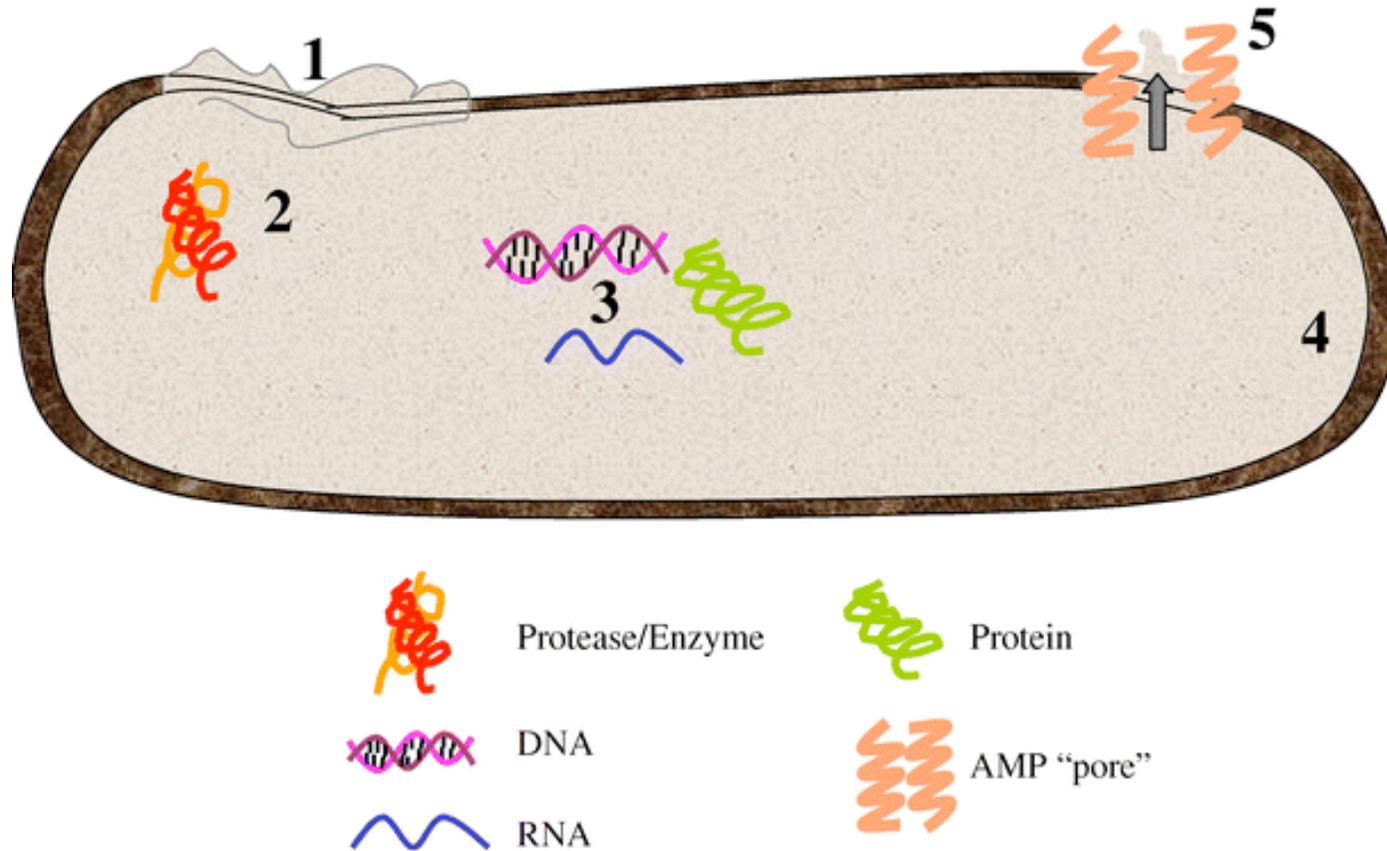
Activité antimicrobienne à large spectre sur les bactéries à Gram +/- et les champignons. Les lésions observées sur *S. aureus* en TEM ressemblent à celles de souches exposées à la pénicilline.

hBD3 est inducible comme hBD2, mais les mécanismes régulateurs sont différents. IFN $\gamma$  est un inducteur fort (Garcia JR et coll. 2001. Cell Tissue Res., 306:257-264)

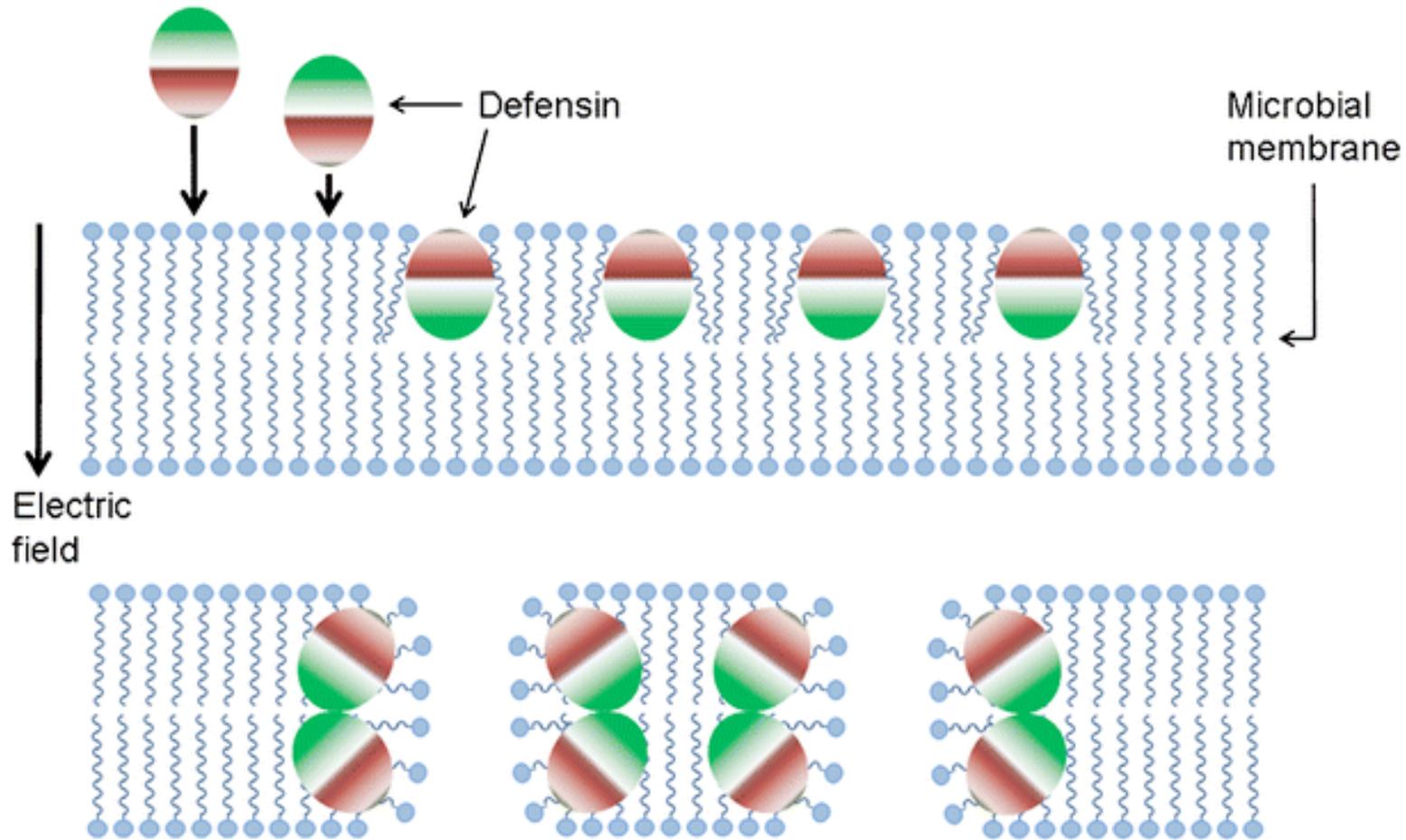
*S. aureus* + hBD3 (10 mM) / 30 min



# Cibles potentielles des peptides antimicrobiens



- 1 – Modification de la biosynthèse de mur bactérien et de sa composition
- 2 – Inhibition de protéases et autres activités enzymatiques
- 3 – Inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
- 4 – Liaison à l'ADN
- 5 – Formation de pores membranaires



La plupart des défensines sont des molécules amphipatiques présentant des séquences d'acides aminés hydrophobes (vert). Ceci permet une interaction avec les membranes bactériennes représentées schématiquement par leur domaine phospholipidique chargé négativement (bleu) et leurs chaînes hydrophobes d'acides gras (bleu).

**Partie haute:** l'attraction électrostatique et le champ électrique transmembranaire attirent les peptides qui s'accumulent au sein de la membrane

**Partie basse:** la membrane s'étire et les peptides affectent un nouvel arrangement en pore.

# Peptides antimicrobiens et infections cutanées

Les infections cutanées sont très rares chez les patients psoriasiques (Henseler T & Christophers E 1995. J. AM Acad. Dermatol., 32:982-986) qui présentent une surexpression des peptides antimicrobiens (Harder J & Schröder JM. 2005. J. Leukoc. Biol., 77:476-486).

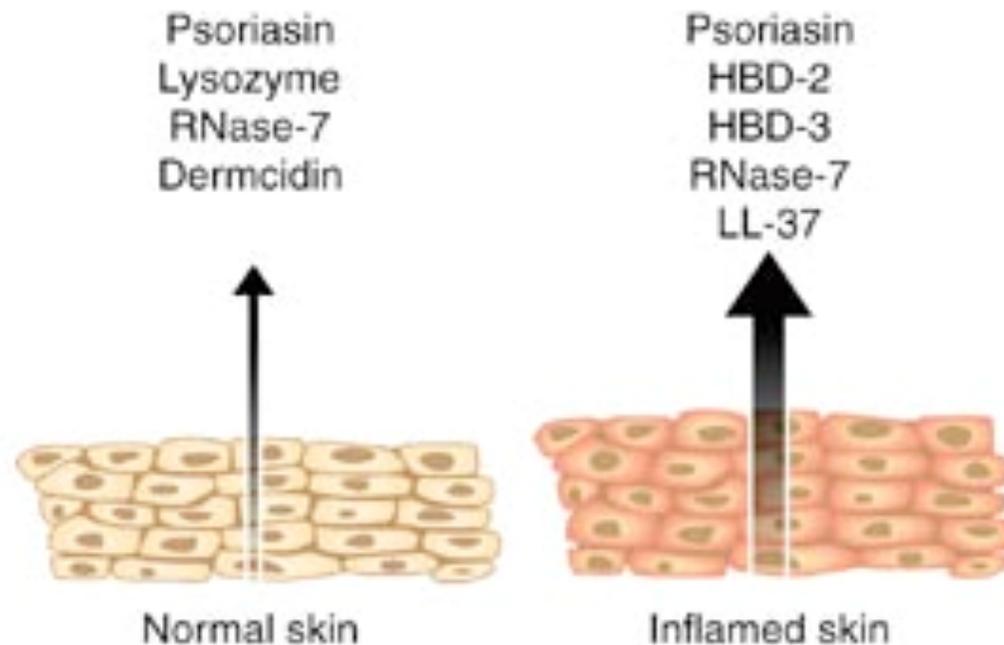
A l'opposé, les patients atteints d'eczéma atopique aigu ou chronique ont une diminution de hBD2, hBD3 et LL37 et sont souvent atteints d'infections cutanées à *S. aureus* (Nomura I et coll. 2003. J. Immunol., 171:3262-3269; Ong PY et coll. 2002. N. Engl. J. Med., 347:1151-1160)

Ces données demeurent corrélatives et la complexité de ces maladies ne permet pas de confirmer une relation de causalité.

## **Deux séries d'arguments directs possibles:**

**Génétique humaine:** pour l'instant aucun des gènes candidats pour ces deux maladies n'est en rapport avec l'expression des peptides antimicrobiens.

**Souris KO** (Nizet et coll. 2001. Nature, 414: 454-457)

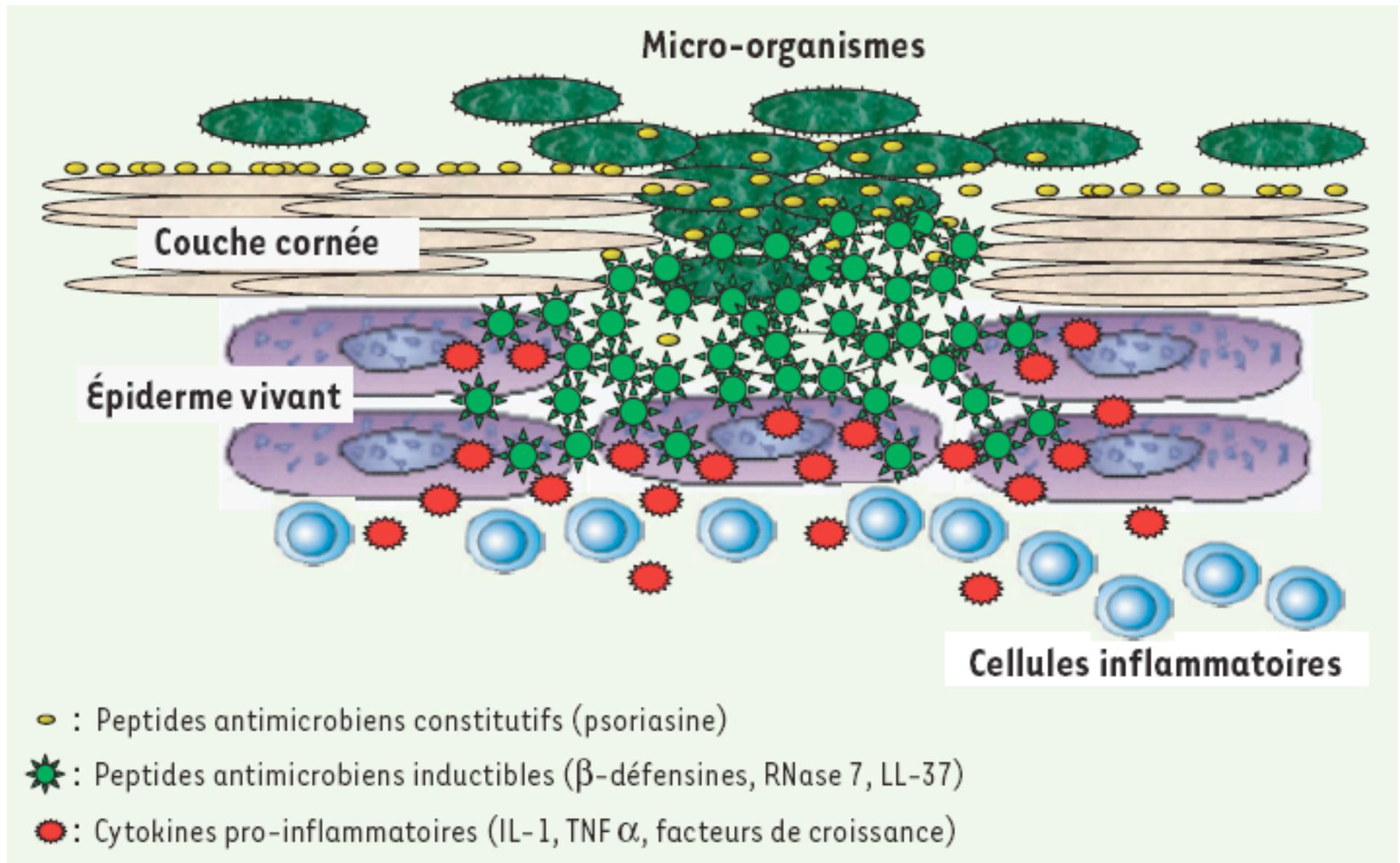


Dans l'épiderme humain, Les  $\beta$ -défensines (hBD2) et la Cathélicidine hCAP18/LL37 (autres ?) sont empaquetées dans les kératinosomes, établissant un lien direct entre la fonction de barrière physique et la fonction de barrière antiinfectieuse de l'épiderme, en particulier de la jonction stratum granulosum-stratum corneum

(Elias PM et coll. 2005. Exp. Dermatol., 14:718-726;

Oren A et coll. 2003. Exp. Mol.Pathol., 74:180-182;

Alberg KL et coll., 2008. J. Invest. Dermatol., 128:917-923)



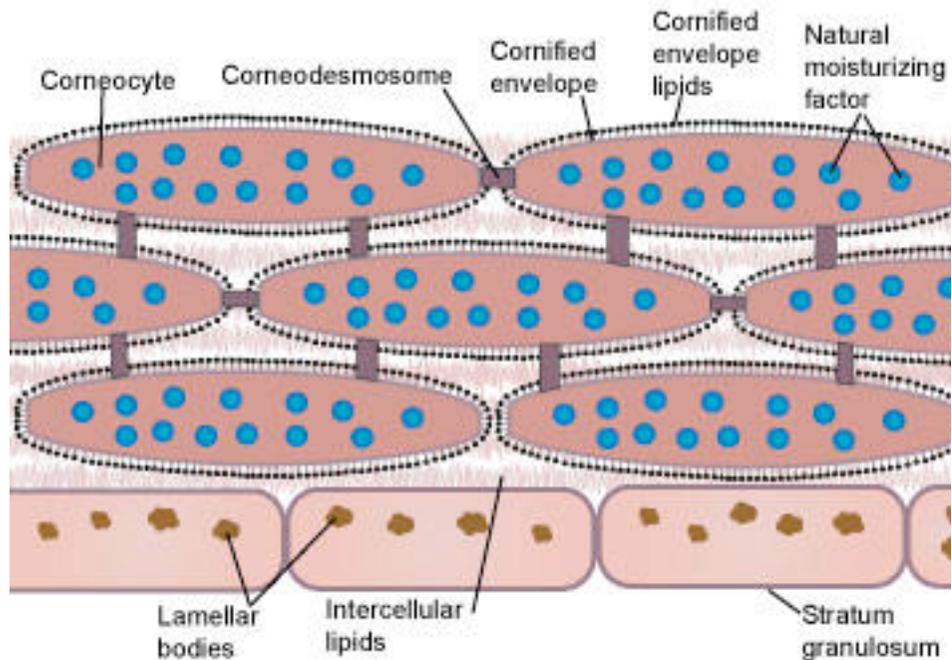
M/S : médecine sciences

La peau

Volume 22, numéro 2, février 2006, p. 153-157

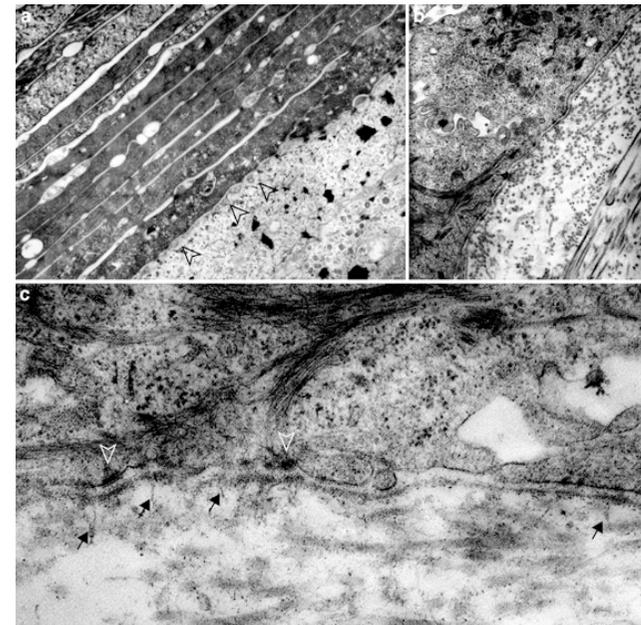
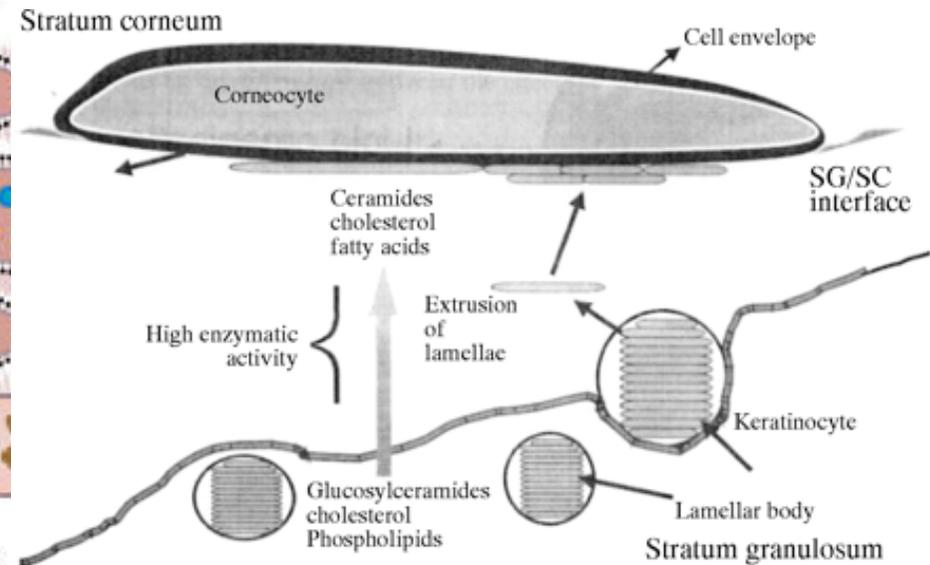
Peptides antimicrobiens naturels cutanés

Jens-Michael Schröder et Jürgen Harder



(c) 2007 Heather Brannon, MD licensed to About.com, Inc

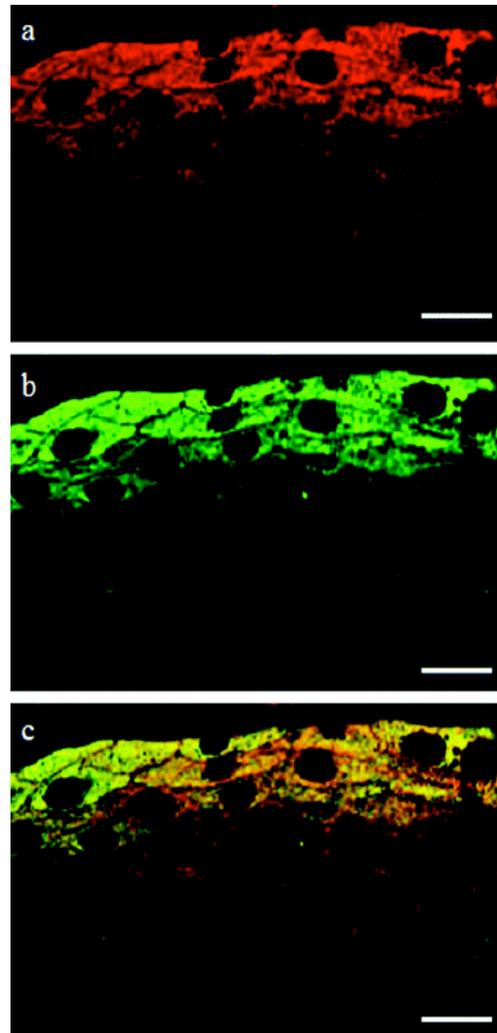
Les corps lamellaires (kératinosomes) sont formés dans les kératinocytes épineux et granuleux. Lorsque le kératinocyte mature en cellule cornée, leur contenu est sécrété dans l'espace intercellulaire, formant une matrice riche en lipides:  $\omega$ -hydroxycéramides ( $\omega$ -OHCer) et dérivés estérifiés (Acyl-Cer) qui assure l'imperméabilité et la cohésion du stratum corneum (Behne M et coll. 2000. J. Invest. Derm., 114:185-192).



Jonction stratum granulosum-stratum corneum kératinosomes sous-membranaires

Stark HJ et coll. 2006. J. Invest. Derm., 11:93-105

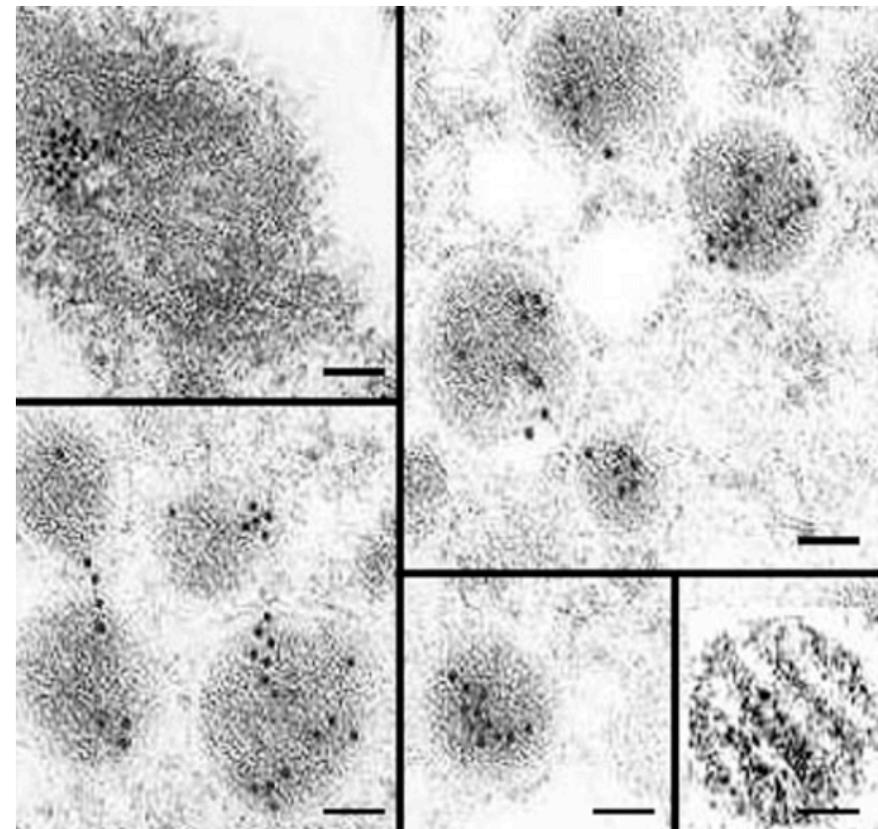
Journal of Investigative Dermatology (2005) 124, 394–400;  
Keratinocytes store the antimicrobial peptide Cathelicidin in lamellar bodies  
Marissa H Braff, Anna Di Nardo, and Richard L Gallo



Colocalisation de la cathélicidine (hCAP18/LL-37) et de l'involucrine dans les kératinosomes de peau humaine

-  Anti-hCAP18/LL-37-Rho
-  Anti-involucrine

TEM-anti hCAP18/LL-37-or



*Lamellar granule-associated protein* (LGP), loricrine et **involucrine** sont des protéines caractéristiques de la différenciation du stratum corneum, spécifiquement localisées dans les kératinosomes.

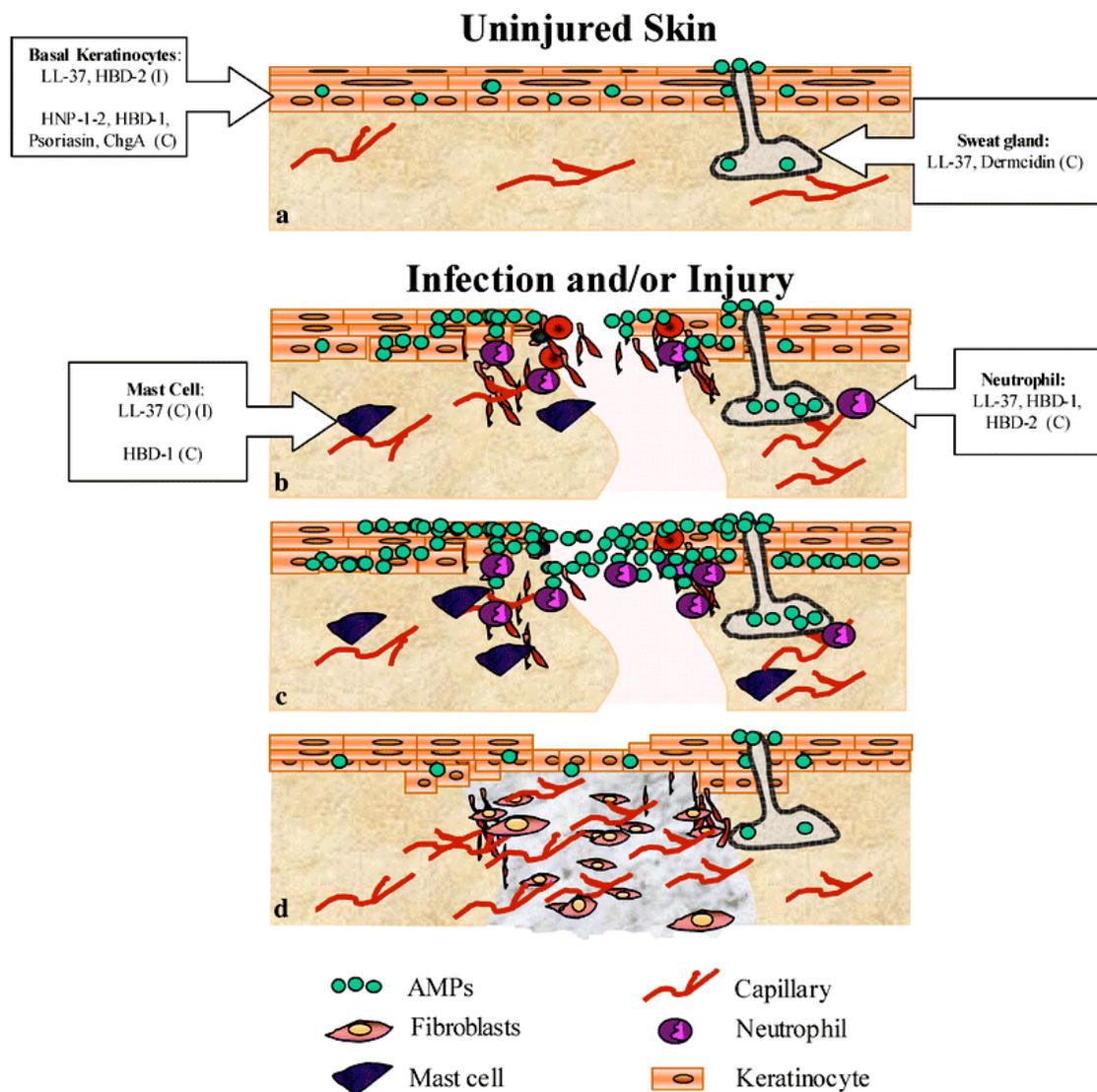
## **Co-Regulation and Interdependence of the Mammalian Epidermal Permeability and Antimicrobial Barriers**

Karin M. Aberg, Mao-Qiang Man, Richard L. Gallo, Tomas Ganz, Debra Crumrine, Barbara E. Brown, Eung-Ho Choi, Dong-Kun Kim, Jens M. Schröder, Kenneth R. Feingold and Peter M. Elias

Journal of Investigative Dermatology (2008) 128, 917–925

Human epidermis elaborates two small cationic, highly hydrophobic antimicrobial peptides (AMP), b-defensin 2 (hBD2), and the carboxypeptide cleavage product of human cathelicidin (hCAP18), LL-37, which are co-packaged along with lipids within epidermal lamellar bodies (LBs) before their secretion. Because of their colocalization, we hypothesized that AMP and barrier lipid production could be coregulated by altered permeability barrier requirements. mRNA and immunostainable protein levels for mBD3 and cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) (murine homologues of hBD2 and LL-37, respectively) increase 1–8 hours after acute permeability barrier disruption and normalize by 24 hours, kinetics that mirror the lipid metabolic response to permeability barrier disruption. Artificial permeability barrier restoration, which inhibits the lipid-synthetic response leading to barrier recovery, blocks the increase in AMP mRNA/protein expression, further evidence that AMP expression is linked to permeability barrier function. Conversely, LB-derived AMPs are also important for permeability barrier homeostasis. Despite an apparent increase in mBD3 protein, CRAMP<sup>-/-</sup> mice delayed permeability barrier recovery, attributable to defective LB contents and abnormalities in the structure of the lamellar membranes that regulate permeability barrier function. **These studies demonstrate that (1) the permeability and antimicrobial barriers are coordinately regulated by permeability barrier requirements and (2) CRAMP is required for permeability barrier homeostasis.**

# Expression des peptides antimicrobiens (AMP) en peau saine ou lésée plus qu'un effet antimicrobien....



La peau normale est composée de l'épiderme (kératinocytes) et du derme (matrice extracellulaire = ECM et cellules endothéliales = capillaires).

(a) De faibles niveaux d'AMP sont produits par les kératinocytes, les glandes sudoripares et les follicules pilo-cébacés à un niveau permettant de contenir la prolifération de la flore commensale.

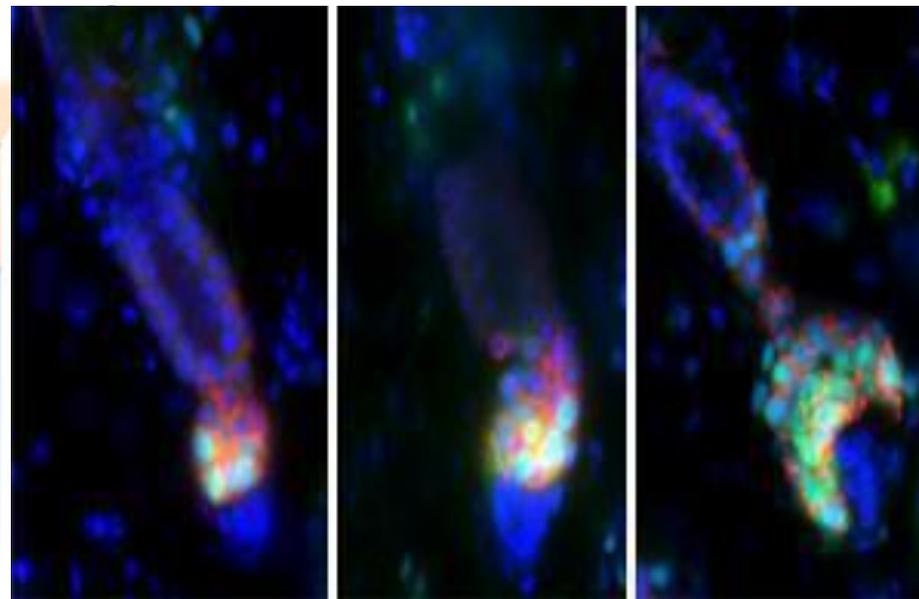
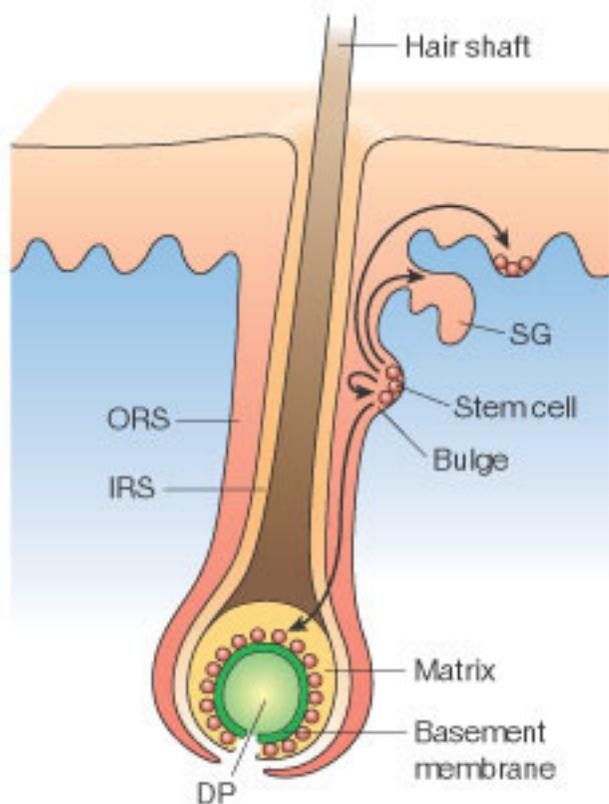
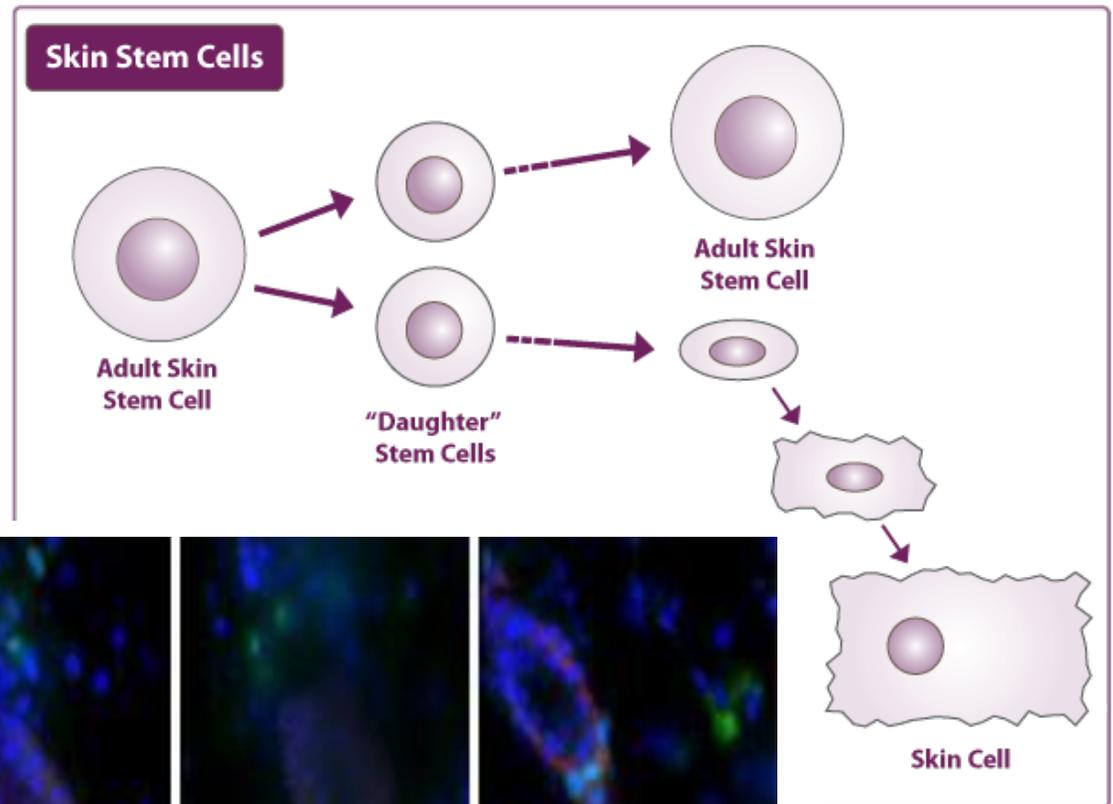
(b) A l'occasion d'une blessure ou d'une infection l'expression des AMP augmente, Initiant le recrutement chimiotactique de polynucléaires neutrophiles et de mastocytes au site lésionnel.

(c) La production croissante d'AMP accroît le recrutement cellulaire.

(d) La production massive d'AMP au site lésionnel stimule la prolifération des kératinocytes, l'angiogénèse et la production des composants protéiques de l'ECM par les fibroblastes = phase de réparation.

Radek K & Gallo R. 2007. Semin. Immunopathol.,29:27-43  
Kenshi Y & Gallo R. 2008. Eur. J. Dermatol.,18:11-21

# Peptides antimicrobiens et cellules souches cutanées: un lien à établir



D'après Elaine Fuchs et coll.  
The Rockefeller University  
Fuchs E. 2009. Cell Stem Cell, 4:499-502

# Kératinocytes et Cellules de Langerhans: un système intégré de défense de l'épiderme (2)

## Cellules de Langerhans

3 % à 8 % des cellules épidermiques.

Appartiennent au groupe des cellules dendritiques.

Leur fonction est de capturer les exo-antigènes, en particulier issus d'agents infectieux, par la voie des endosomes, de les apprêter et de les réexprimer en surface avec les molécules de classe II du CMH.

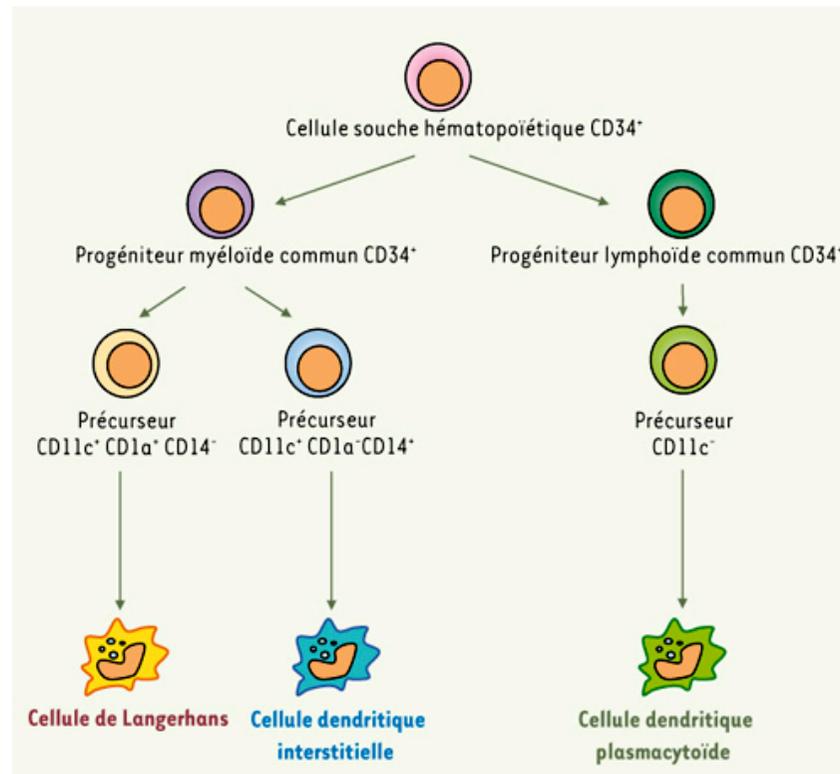
Elles migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques.

En microscopie optique: cellules claires, à noyau encoché, situées le plus souvent au niveau du stratum granulosus. Après congélation et immunohistochimie, elles apparaissent dendritiques, avec un corps cellulaire entouré de prolongements s'insinuant entre les kératinocytes suprabasaux.

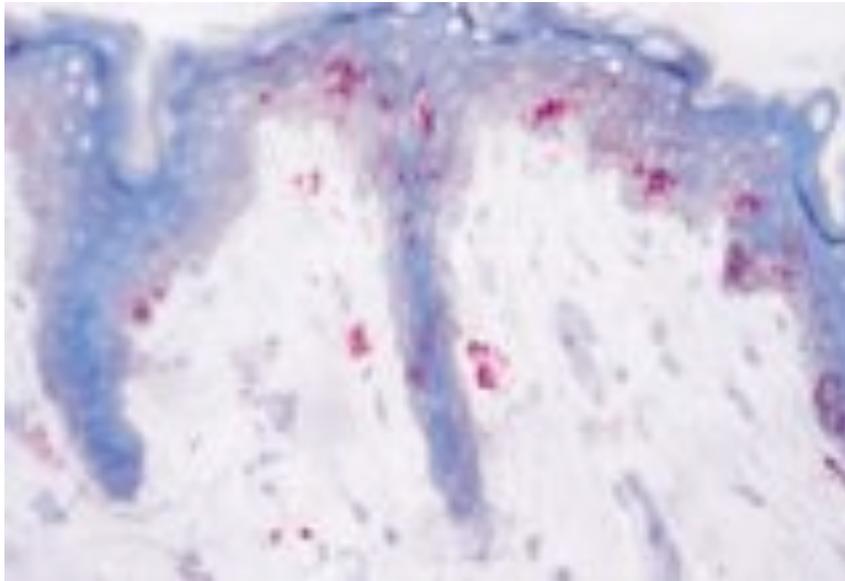
En microscopie électronique, elles se caractérisent par un cytoplasme clair aux électrons, contenant des filaments intermédiaires différents des TF (constitués de vimentine), un appareil de Golgi très développé et, surtout, les granules de Birbeck en raquettes, qui leur sont spécifiques. Elles n'établissent pas de desmosomes avec les kératinocytes avoisinants.

Les cellules de Langerhans de l'épiderme possèdent des marqueurs spécifiques que n'ont pas les autres cellules dendritiques : le skin homing antigen CLA (lymphocyte-associated antigen), la E-cadhérine et la langerine (associée aux granules de Birbeck). Elles expriment également beaucoup d'autres marqueurs, en particulier les molécules de classe II (et I) du CMH, le CD1a et la protéine S100.

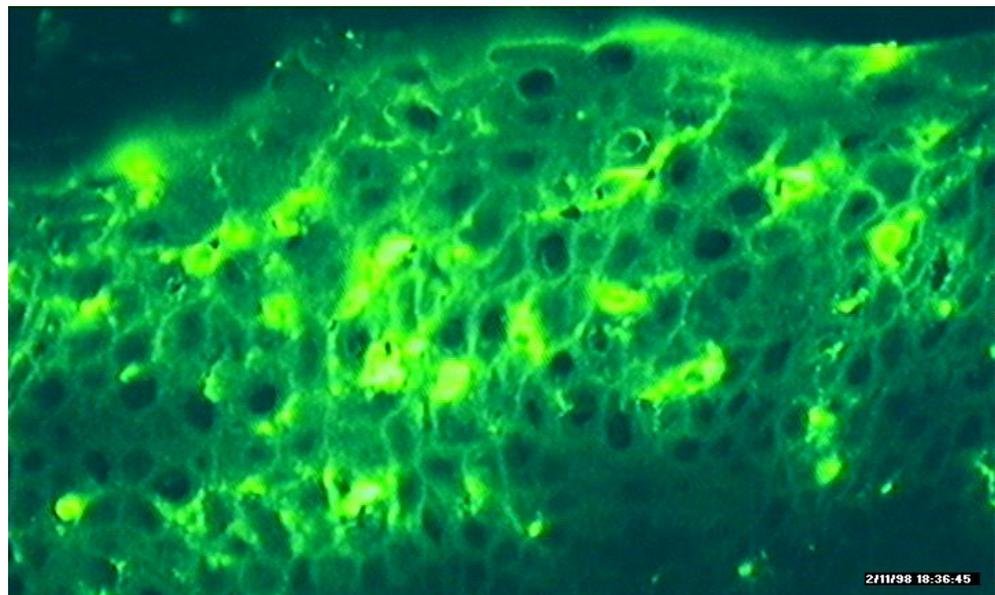
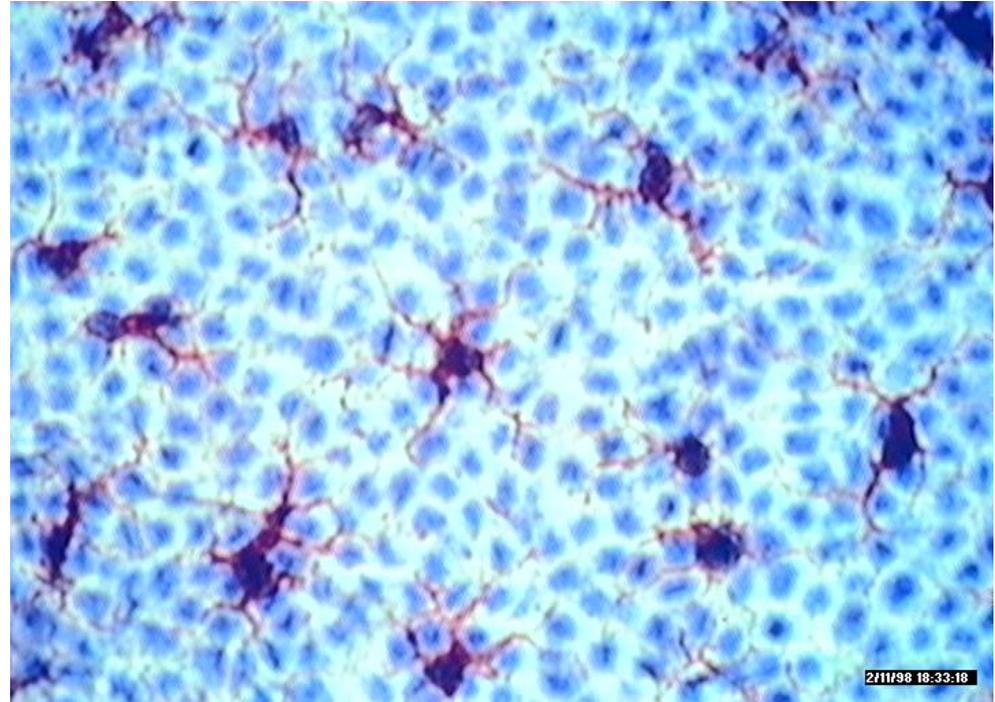




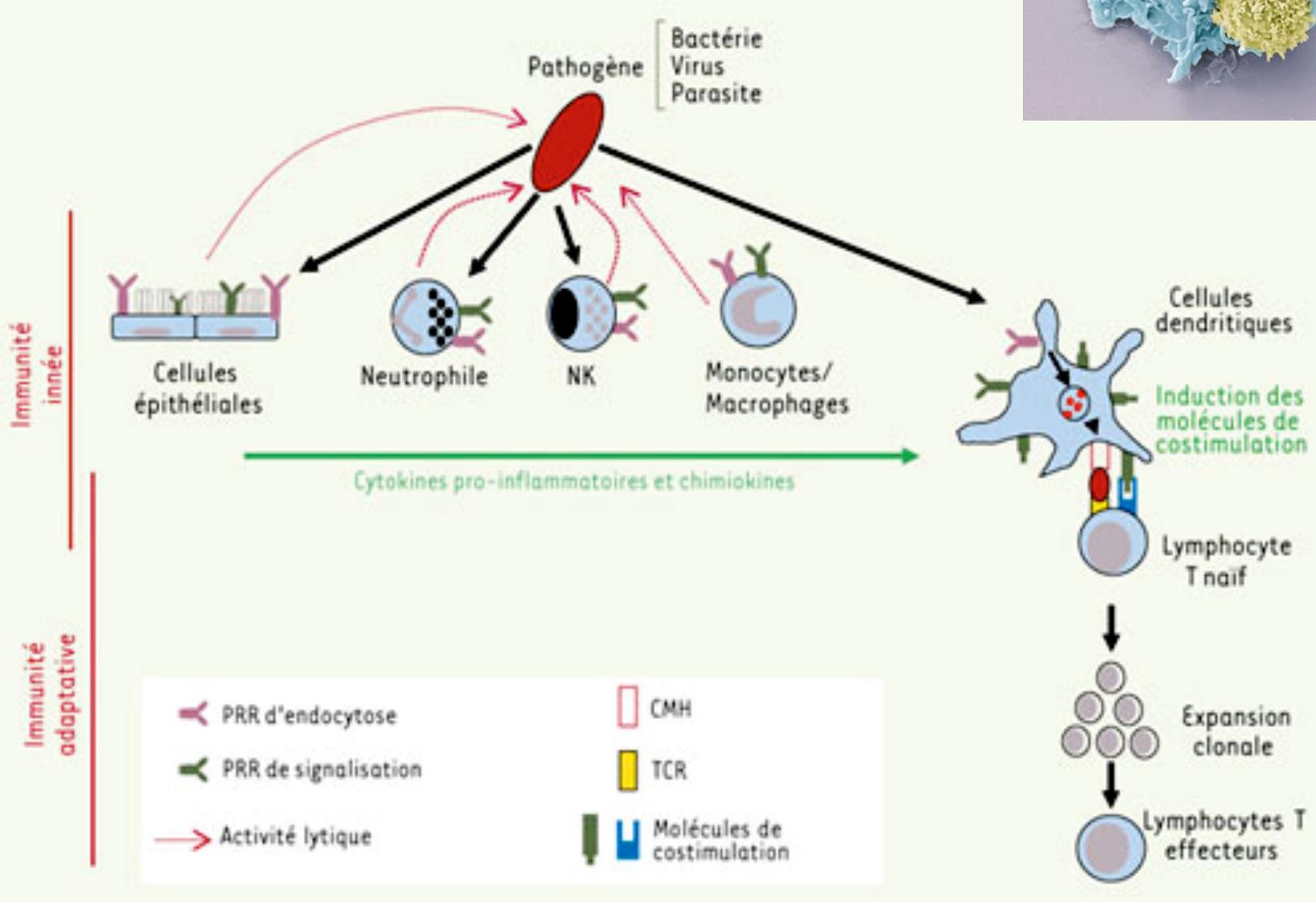
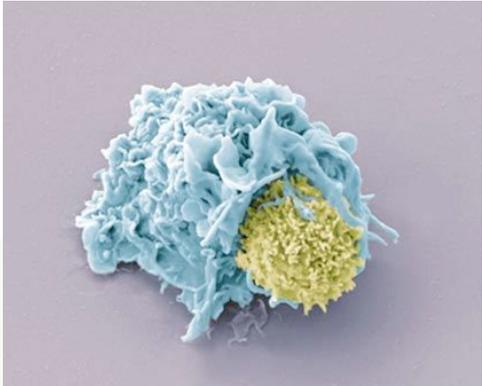
Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes. Les cellules dendritiques se différencient à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse selon deux voies de différenciation classiquement décrites : la voie lymphoïde et la voie myéloïde. Dans la voie lymphoïde, le progéniteur lymphoïde commun CD34<sup>+</sup>, issu de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>, donne naissance aux lignées de cellules B, T et NK (natural killer) et à un précurseur lymphoïde CD11c<sup>-</sup> qui se différencie en cellule dendritique plasmacytoïde. Ces dernières se trouvent dans le thymus, les zones T des organes lymphoïdes et le sang. **Dans la voie myéloïde, le progéniteur myéloïde commun CD34<sup>+</sup>, issu de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>, donne naissance à un précurseur myéloïde CD11c<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> qui migre dans l'épiderme pour se différencier en cellule de Langerhans ou à un précurseur myéloïde CD11c<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> qui migre dans le derme et les tissus conjonctifs pour se différencier en cellule dendritique interstitielle.** Maisnier-Patin K et coll. 2007. Médecine/Science, 23:279-284



Les cellules de Langerhans constituent une barrière naturelle à l'entrée de pathogènes. Après une activation par les pathogènes, elles migrent vers les organes lymphoïdes . Elles se distinguent par l'expression du marqueur CD1 $\alpha$ . Dans le derme , on trouve des cellules dendritiques interstitielles.



# Fonctions des cellules dendritiques



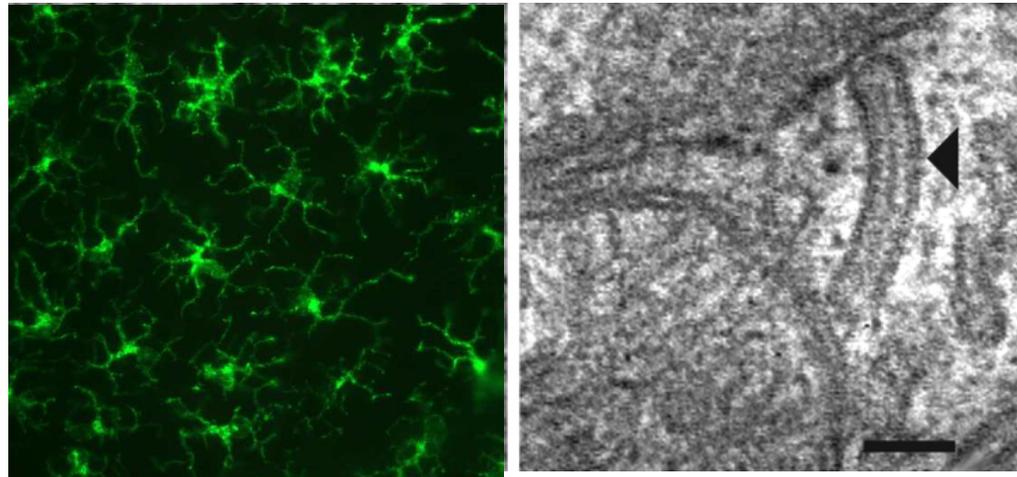
# Une caractéristique des cellules de Langerhans

**La Langerine (CD207)** est une lectine de type C exprimée par les cellules de Langerhans et impliquée dans la formation des granules de Birbeck, des vésicules cytoplasmiques riches en membranes lipidiques longtemps considérés comme des marqueurs caractéristiques des cellules de Langerhans.

La destruction du gène de la Langerine entraîne chez la souris la disparition des granules de Birbeck, sans affecter de façon tangible les fonctions immunologiques de ces cellules (Kissenpfennig A et coll. 2005. *Mol. Cell Biol.*, 25:88–99).

Présentation des Ag non peptidiques avec CD1a ?

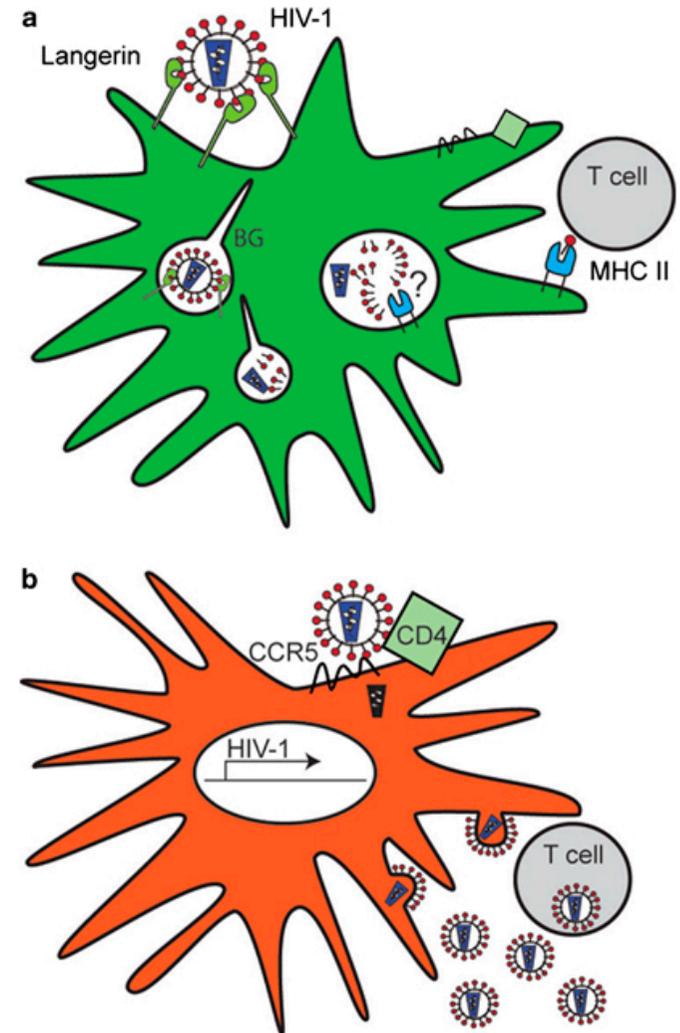
Granules de Birbeck  
Anti CD207 & TEM



# Fonctions antivirales directes de la Langerine

Démonstration récente que la Langerine (contrairement à DC-SIGN) est une barrière naturelle à la transmission du VIH par les cellules de Langerhans.

Le VIH se lie à cette molécule à la surface cellulaire, permettant son internalisation dans un compartiment de dégradation.

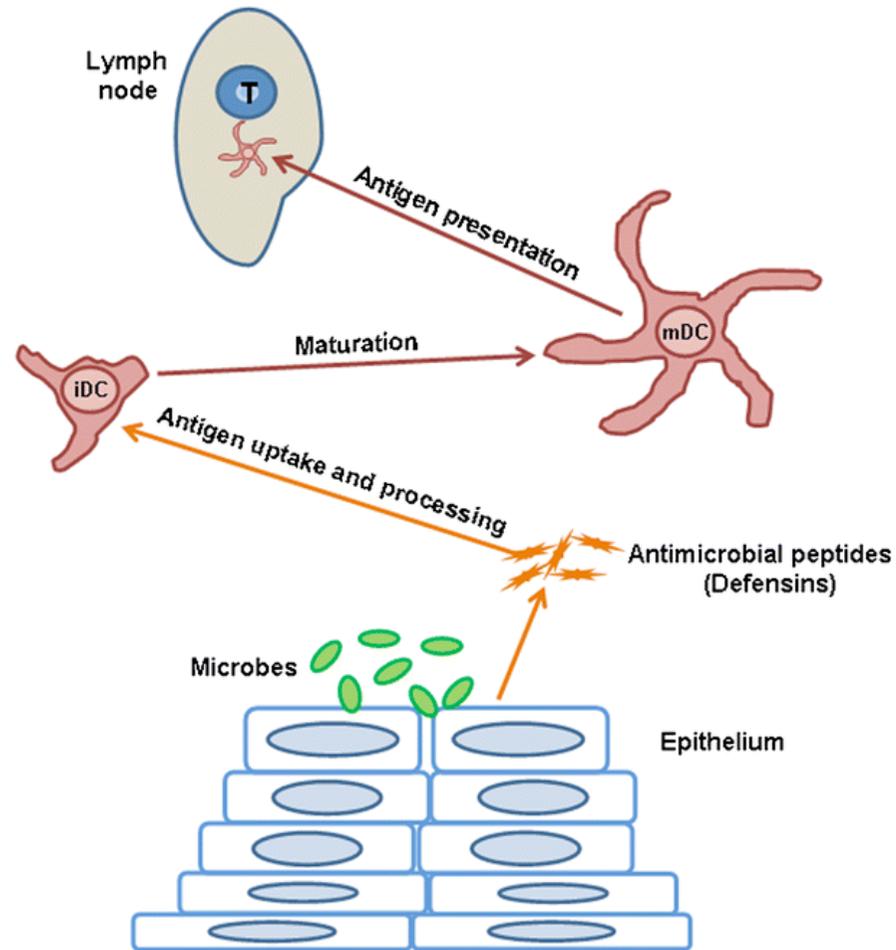


De Witte L. et coll. 2007. Nat. Med. 13: 367-371

Mizumoto N & Takashima A. 2004. J. Clin. Invest., 113:658-660

Hunger, RE et coll. 2004. J. Clin. Invest., 113:701-708

# Coopération défensives – cellules dendritiques



Contribution des défensines/peptides antimicrobiens à l'induction de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte.

Au cours de l'infection, les défensines sont rapidement induites, largement au niveau des kératinocytes (puis des cellules inflammatoires recrutées). Elles facilitent la capture des antigènes et leur épissage par les cellules dendritiques immatures qui, à cette occasion mûrissent et s'activent, puis migrent vers les ganglions afférents

# **La barrière cutanée comme réseau intégré de défense innée**

## **Éléments intrinsèques au stratum corneum (SC)**

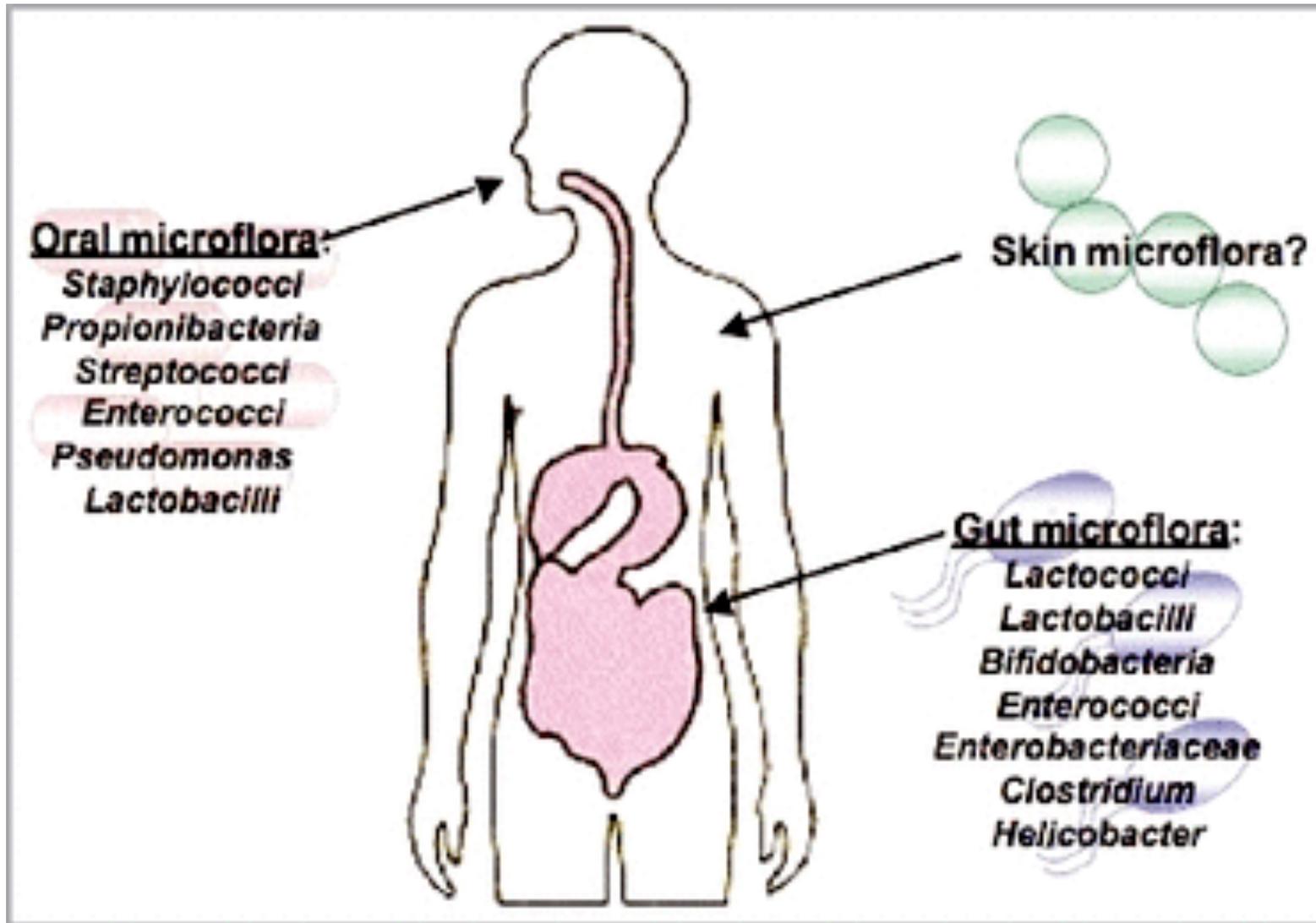
- Organisation/architecture du SC
- Lipides du SC (FFA, sphingosine...)
- pH acide, faible hydratation
- Bas niveau constitutif de hBD2/LL37 dans la matrice extracellulaire
- Produits antimicrobiens déposés en surface (psoriasine)
- Sueur (Dermcidine, IL-37)
- Sebum (Lysozyme, FFA, RNase7)

## **Éléments cellulaires immunitaires...**

### **Effet de barrière du microbiote**

- Occupation de niche
- Compétition pour des nutriments
- Sécrétion de dérivés du métabolisme (acide acétique, propionique)
- Autres...

# Nature du microbiote cutané



# Ecosystème cutané ou écosystèmes cutanés ?

La peau représente une multitude de niches aux propriétés différentes.

On attend des variations qualitatives et quantitatives énormes des populations microbiennes d'une niche à l'autre. Pour une flore microbienne, les conditions prévalant dans le creux axillaire ou sur la face antérieure du thorax ou de l'avant bras diffèrent respectivement autant que les conditions prévalant en forêt vierge par rapport au désert (Marples MJ. 1969. Sci. Am., 220:108-115).

Les comptages de bactéries aérobies varient considérablement selon que l'on prélève une région moite (creux axillaire ou espaces interdigitaux,  $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>) ou des zones sèches (avant-bras ou thorax,  $<10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>) (Leyden et coll. 1987. J. Invest. Dermatol., 88:65-72)

Les espèces bactériennes anaérobies sont aussi présentes sur la peau à une concentration qui peut atteindre  $10^6$ /cm<sup>2</sup> dans certaines zones, en particulier dans la région périanale (Fredricks DN. 2001. J. Invest. Dermatol. 6:167-169).

Des variations qualitatives et quantitatives sont aussi observées dans une zone donnée en fonction de la structure concernée: stratum corneum, follicule pileux, glande cébacée, glandes sudoripares...

## **Rôle du microbiote cutané:**

- Inhibition des espèces pathogènes (production de molécules puissamment antibiotiques)
- Maturation/dégradation de protéines cutanées, d'acides gras libres et du sébum
- Immunostimulation et tolérogénèse (comme le microbiote intestinal ?)

## **Rôle des microorganismes dans des pathologies cutanées non infectieuses ?**

- Dermatite atopique (DA & Eczéma)
- Acné rosacée
- Psoriasis
- Acné
- Maladie de Verneuil

Rôle direct de microorganismes pathogènes spécifiques ?

Déséquilibre du microbiote en faveur de microorganismes plus agressifs = « pathobiontes » ?

Dysfonctionnement de la barrière cutanée facilitant un rôle Pathogène pour le microbiote normal ?

# Identification de la flore microbienne cutanée

Ecouvillonnage



Grattage

Punch-biopsie

Notre connaissance de base de la composition du microbiote cutané repose largement sur la culture à partir d'échantillons prélevés par différentes méthodes, mis en culture avec des techniques et dans des conditions variables (milieu, pH, osmolarité, température, aéro/anaérobiose, CO<sub>2</sub>...

Aucun milieu *in vitro* ne mime les conditions complexes retrouvées sur/dans la peau.

# Espèces microbiennes cutanées dominantes

(composition « classique »)

De nombreuses espèces microbiennes ont été cultivées à partir de la peau normale/saine (Leyden JJ et coll. 1987. J. Invest. Derm., 88:65-72; Roth RR & James WD. 1988. Annu. Rev. Microbiol., 42:441-464). **0-10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup> selon le site cutané.**

## Plusieurs espèces bactériennes:

- Staphylococcus (*S. epidermidis*, *S. aureus*)
- Micrococcus (*M. luteus*, *M. agilis*)
- Corynebacteria (groupe JK)
- Brevibacteria (*B. epidermidis*, *B. casei*)
- Propionibacteria (*P. acnes*)
- Acinetobacter (*A. baumannii*)
- *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* présents transitoirement en conditions « anormales »

**Une espèce fongique:** *Pityrosporum ovale* (ou *Mallasezia furfur* dans sa forme filamenteuse invasive = hyphe)

## **Est-ce que les méthodes de culture reflètent précisément la diversité et la quantité du microbiote cutané ?**

L'approche par culture sous-estime considérablement la diversité des microbiotes environnementaux et animaux.

La comparaison des genres/espèces cultivés à la diversité visible sous le microscope amène à évaluer à 1-10 % le pourcentage d'identification, quelque soit l'écosystème considéré (Amman RI et coll. 1995. Microbiol. Rev., 59:143-169).

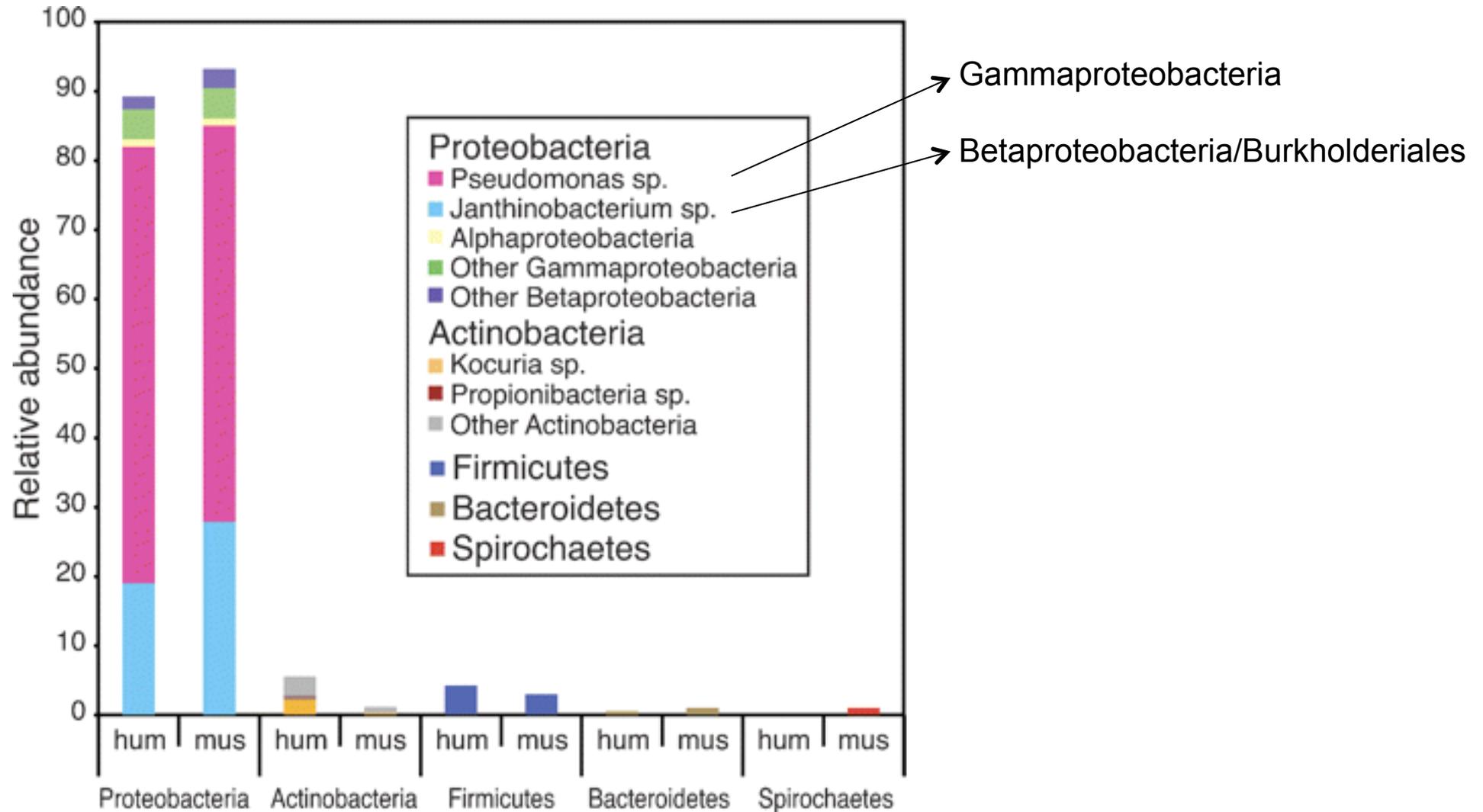
L'amplification/séquence des gènes codant les ARNr 16S confirment ce « trou » dans l'identification et même plus:

- Flore intestinale humaine: 76 % des amplicons générés absents des banques de données (Suau et coll. 1999. Appl. Environ.Microbiol., 65:4799-4807)

- Flore gingivale: 52 % des amplicons générés absents des banques de données (Kroes et coll. 1999. PNAS, 96:14547-14552), 13 % des séquences si éloignées qu'elles correspondent à de nouveaux genres !

**Quid de la peau ?**

# Une surprise attendue ?



Comparaison de l'abondance relative des bactéries chez la souris et l'homme (punch-biopsies) PCR quantitative sur amplicons de séquences spécifiques de genre/espèce de gènes codant l'ARNr 16S (Grice EA et coll. 2008. Genome Res., 18:1043-1050).

## Variation en fonction des individus et du site de prélèvement.

Vers une géographie détaillée de la flore cutanée comme élément d'un projet plus global « Human Microbiome Project » (NIH Human Microbiome Project. (<http://nihroadmap.nih.gov/hmp>))

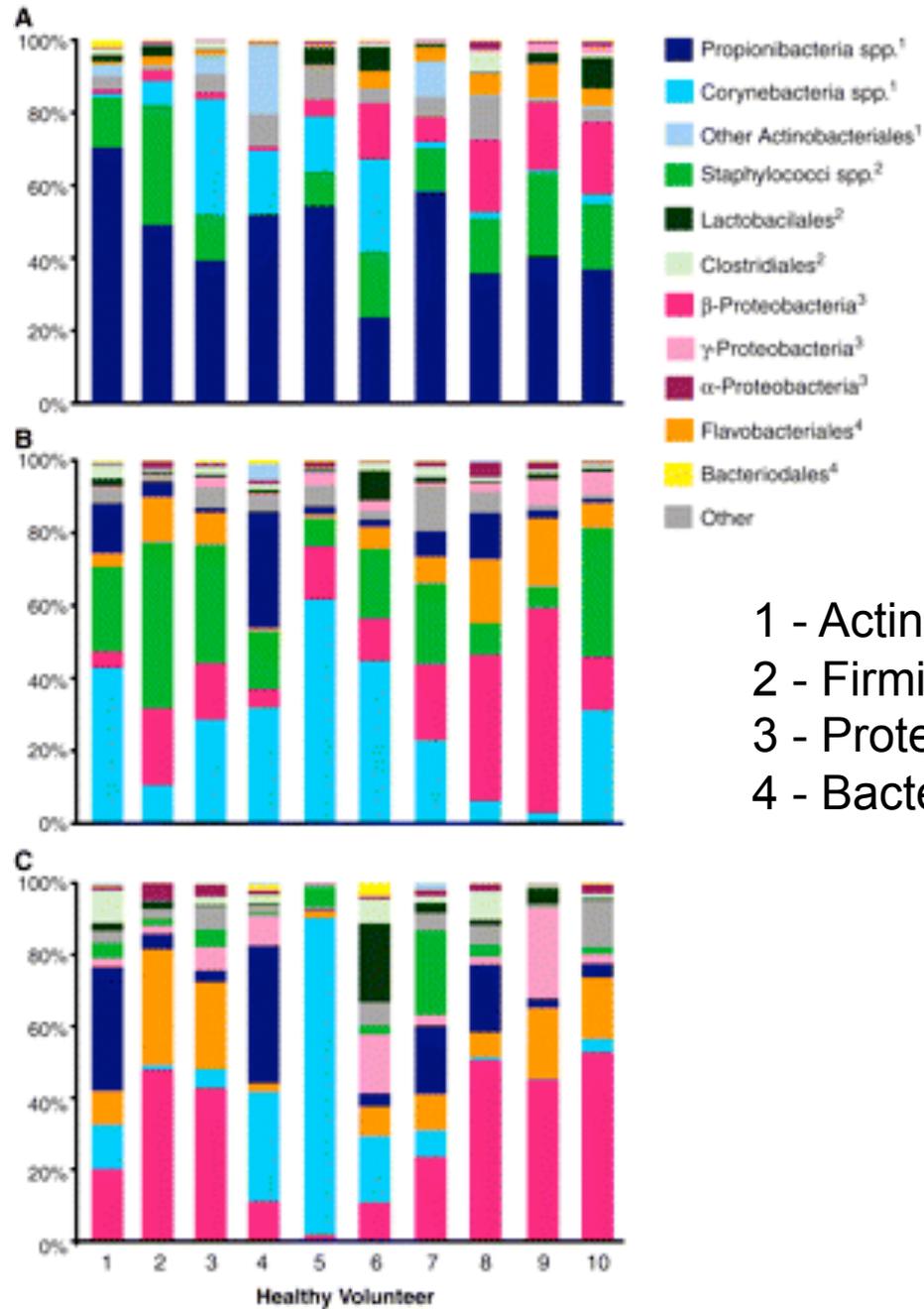
Grice EA et coll. 2009. Science, 324:1190-1192

*We characterized the topographical and temporal diversity of the human skin microbiome with the use of 16S rRNA gene phylotyping, and generated 112,283 near-full-length bacterial 16S gene sequences from samples of 20 diverse skin sites on each of 10 healthy humans (7). Nineteen bacterial phyla were detected, but most sequences were assigned to four phyla: **Actinobacteria** (51.8%), **Firmicutes** (24.4%), **Proteobacteria** (16.5%), and **Bacteroidetes** (6.3%). Of the 205 identified genera represented by at least five sequences, three were associated with more than 62% of the sequences: **Corynebacteria** (22.8%; Actinobacteria), **Propionibacteria** (23.0%; Actinobacteria), and **Staphylococci** (16.8%; Firmicutes). At the species level, we observed greater diversity than revealed by culture-based methods.*

Zone sébacée  
 Propionibacteria  
 Staphylococcus

Zone humide  
 Corynebacteria  
 Betaproteobacteria  
 Staphylococcus

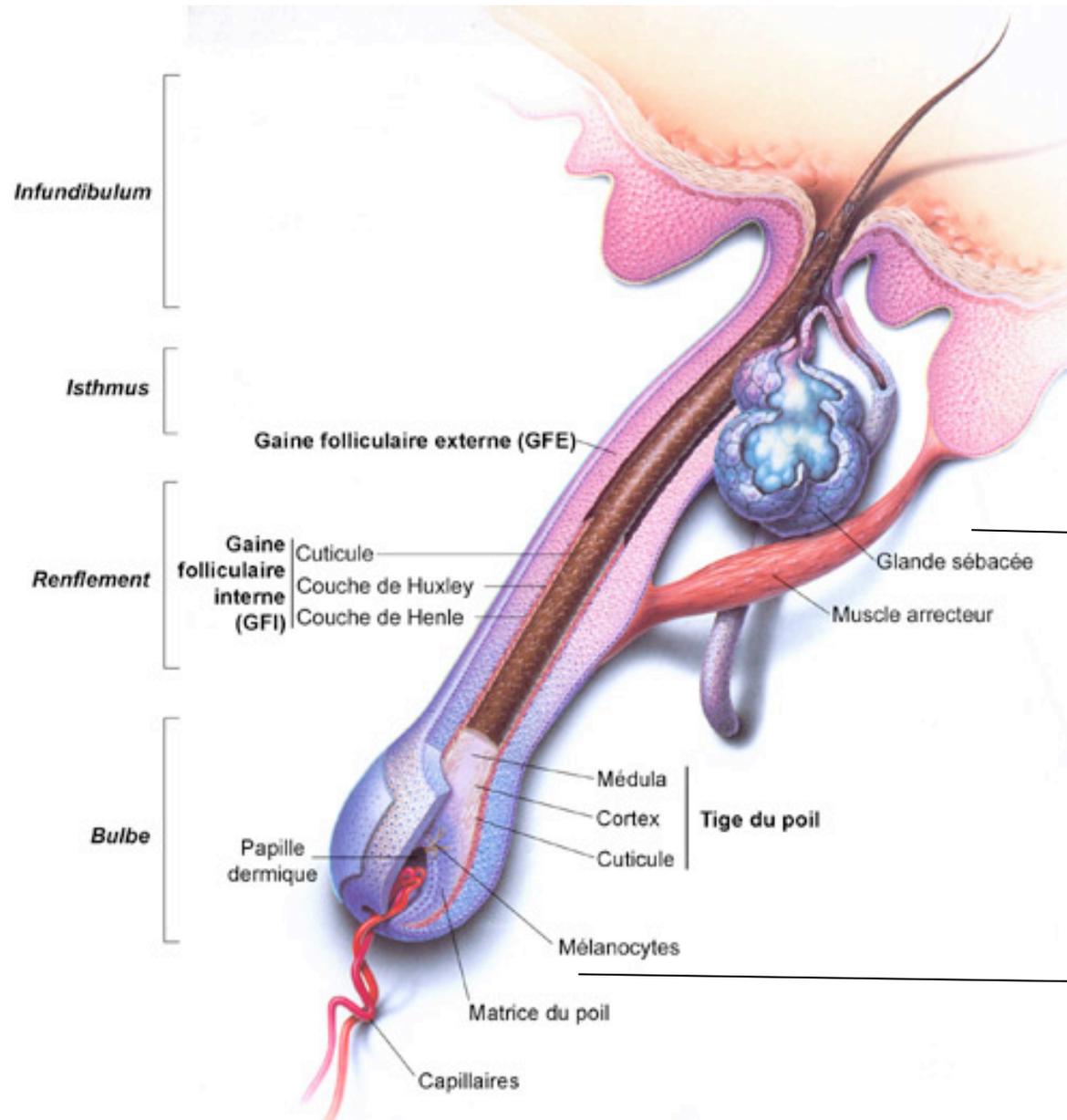
Zone sèche  
 Betaproteobacteria



1 - Actinobacteria;  
 2 - Firmicutes;  
 3 - Proteobacteria;  
 4 - Bacteroidetes.

10 volontaires en bonne santé, moyennes sur 20 prélèvements analysés par volontaire

# Ecologie microbienne du follicule pilo-cébacé



**Aérobiose / lipides**  
**Gram +, coagulase –**  
Staphylococci  
Micrococci  
**Levures lipophyles**  
Pityrosporum ovale  
Pityrosporum orbiculare

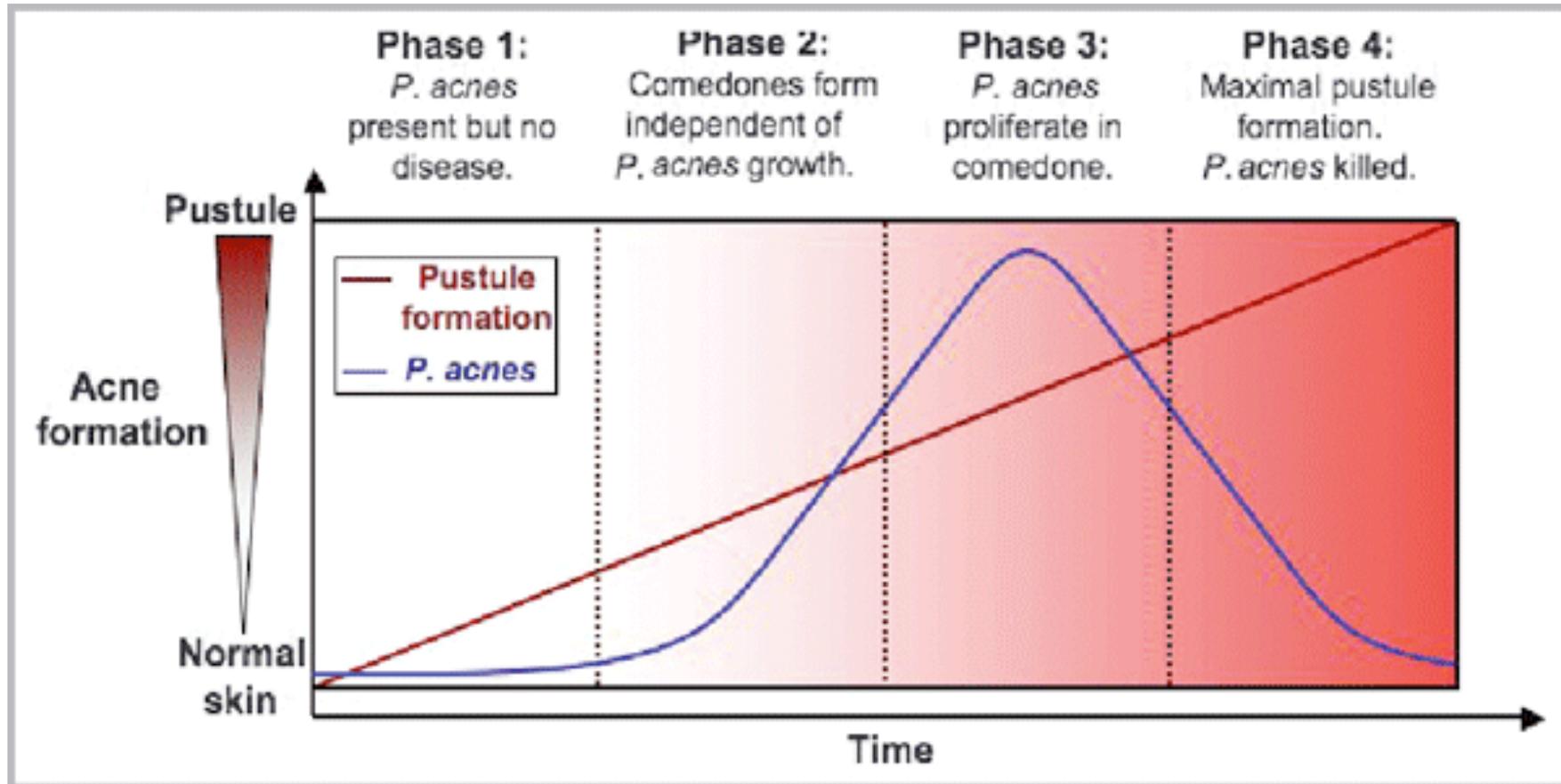
**Anaérobiose**  
*Propionibacterium acnes*

Modifié d'après Geras, 1990

# Symbiose ou pathogénicité ? *Propionibacterium acnes*

## Formation de biofilms expliquant AbR ?

(Burkhart CN & Burkhart CG. 2003. *Int. J. Dermatol.*, 42:925-927)

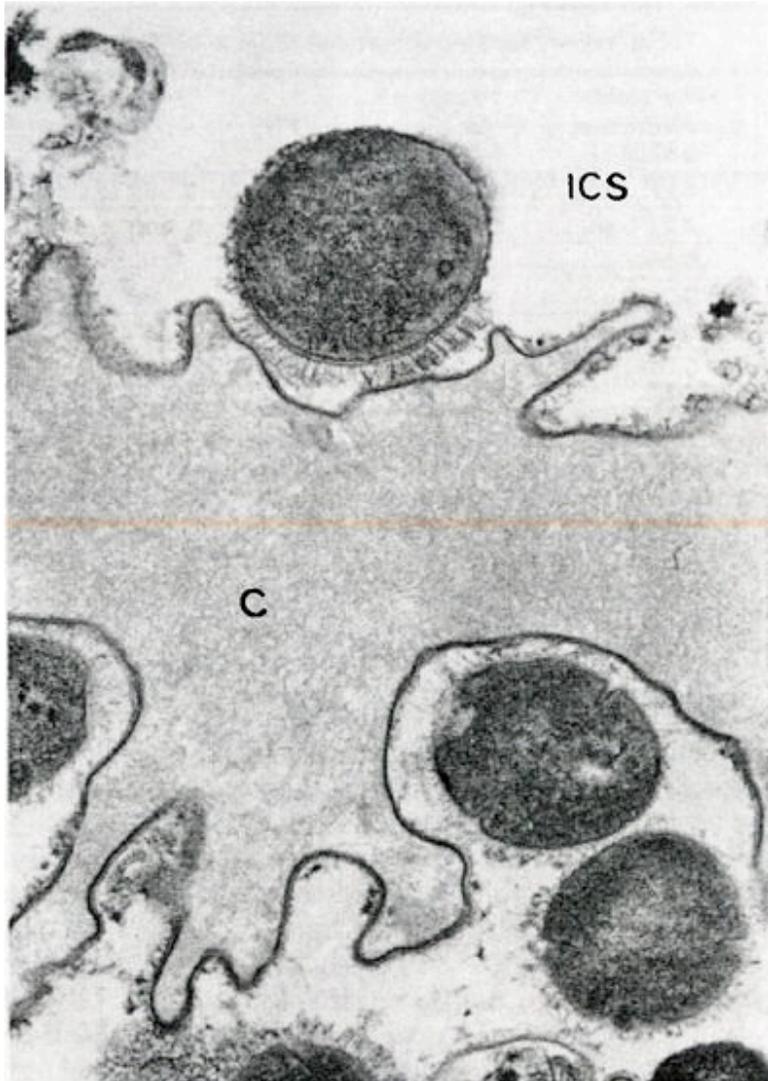


Modèle hypothétique du rôle de *P. acnes* dans la formation des pustules de l'acné.

### Facteurs de fond:

- Hypercornification du canal du follicule pilo-cébacé
- Hypersécrétion sébacée

# Un marqueur de pathogénicité: survie-croissance dans le SC



Staphylococcie cutanée (*S. aureus*). Biopsie/TEM.

Cocci observés dans l'espace intercellulaire (ICS), intercalés entre les cornéocytes au sein du stratum corneum.

Les cornéocytes ne sont ni altérés, ni envahis

# **Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens: un paramètre majeur de la pathogénicité cutanée**

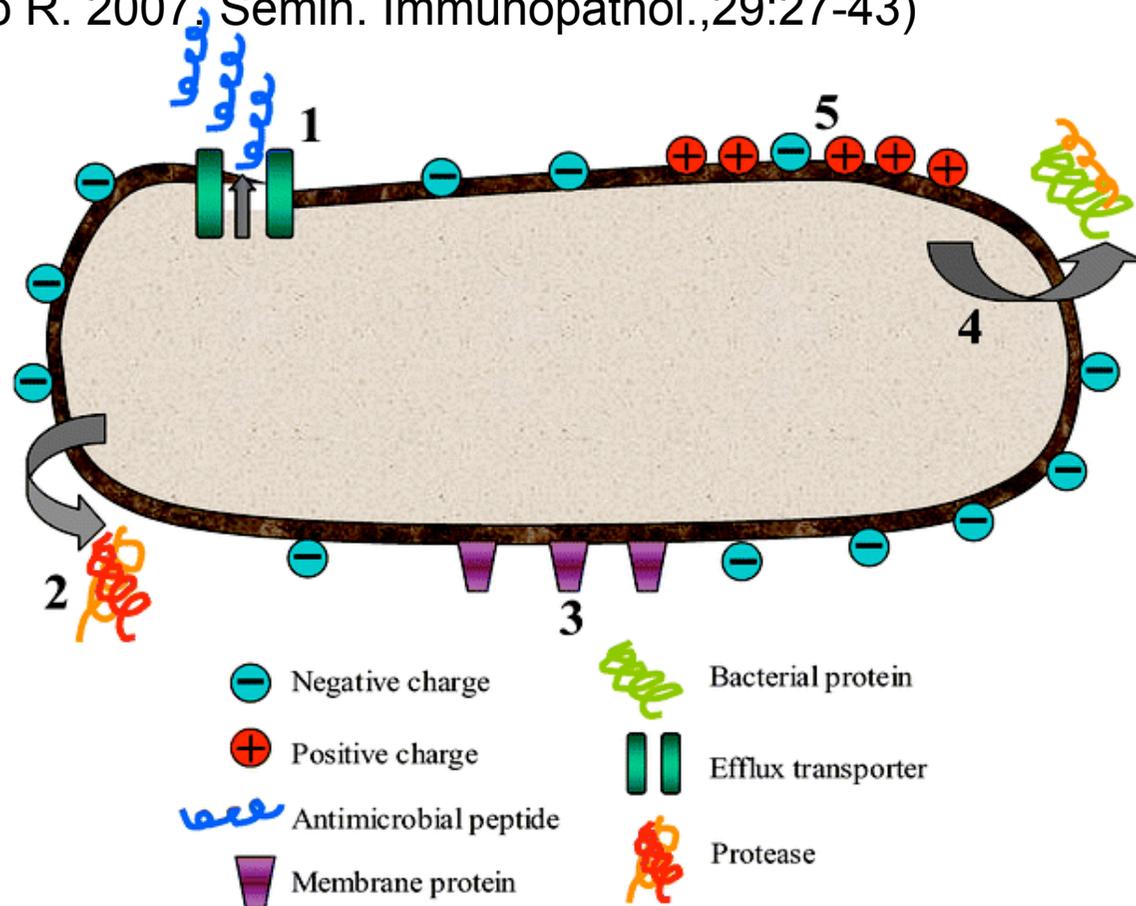
Nizet V. 2010. Curr. Issues Mol. Biol., 8:11-26

Les bactéries diffèrent dans leur sensibilité intrinsèque aux peptides antimicrobiens et la résistance relative de certaines bactéries pathogènes à ces peptides antimicrobiens est maintenant reconnue comme un trait de virulence bona fide.

La preuve de la pertinence de ces mécanismes a été apportée dans de nombreux cas dans des modèles expérimentaux

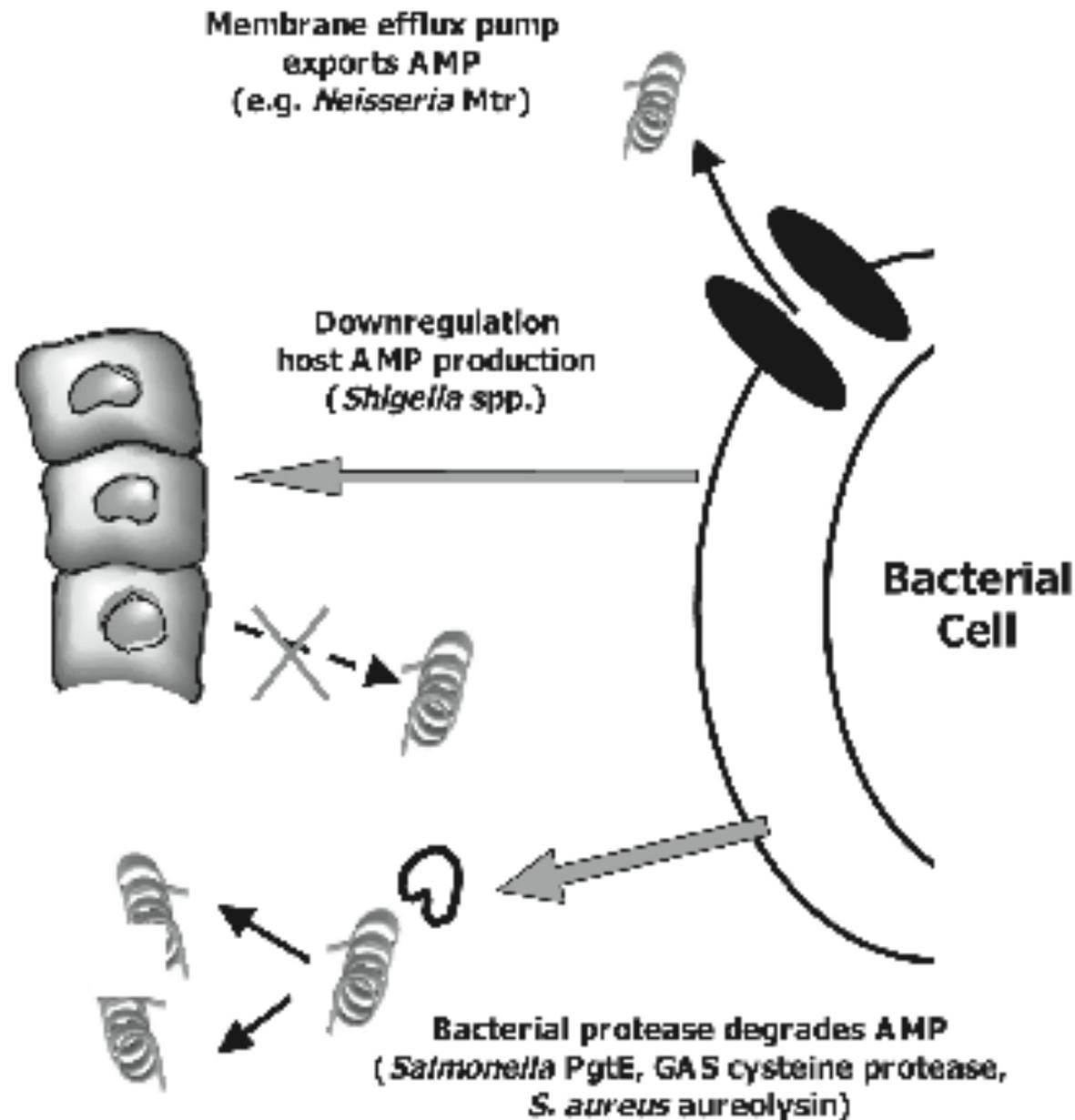
# Principaux mécanismes de résistance des bactéries aux peptides antimicrobiens

(Radek K & Gallo R. 2007, Semin. Immunopathol.,29:27-43)



- (1) Export par pompe à efflux.
- (2) Production de protéases.
- (3) Modification de composition en protéines de membrane et fluidité.
- (4) Sécrétion de protéines « leurres » fixant les AMP.
- (5) Augmentation du rapport de charge membranaire + sur - .

# Résistance bactérienne aux AMP (1)



Nizet V.2011. Curr. Issues. Mol. Biol., 8:11-26

Fig. 4. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides mediated by efflux pumps, proteolytic activation, or downregulation of host production.

# Résistance bactérienne aux AMP (2)

Nizet V.2011. Curr. Issues. Mol. Biol., 8:11-26

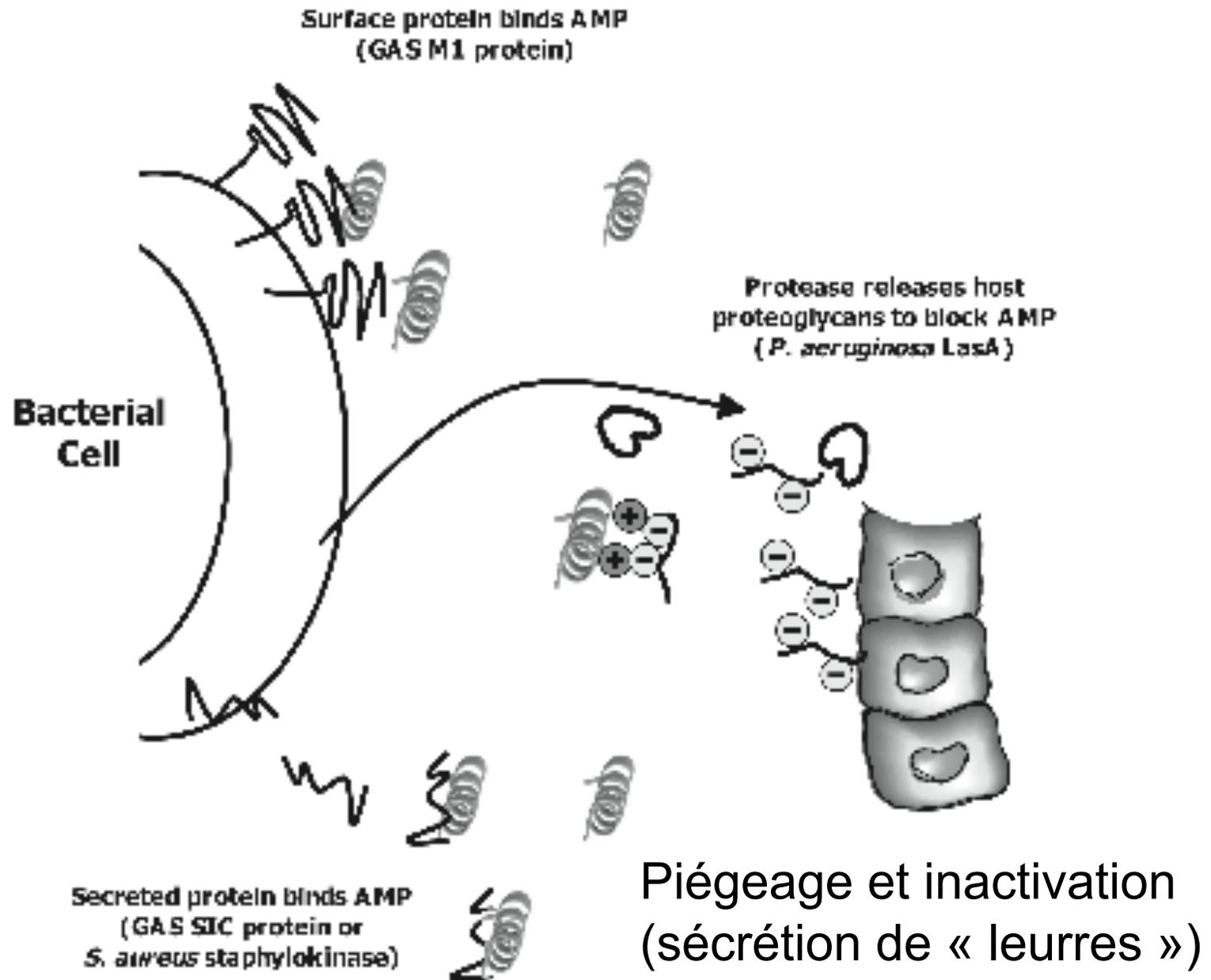


Fig. 3. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides mediated by mechanisms for trapping and inactivation.

# Résistance bactérienne aux AMP (3)

Nizet V.2011. Curr. Issues. Mol. Biol., 8:11-26

## Modification de charges de surface

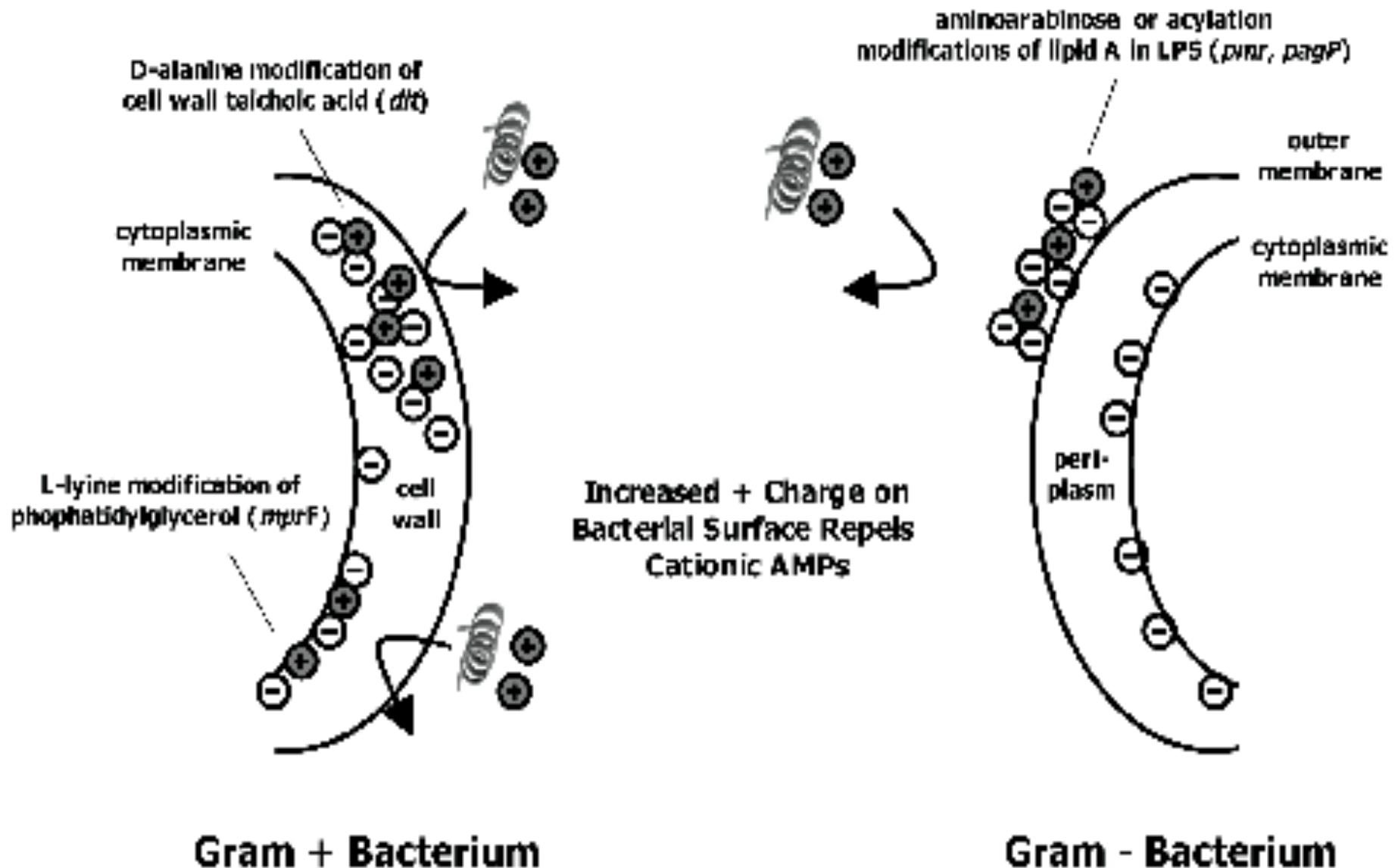
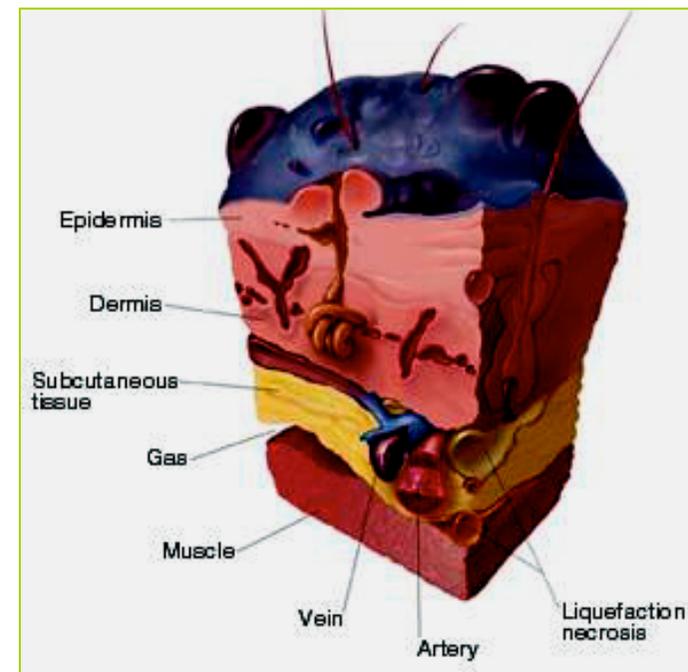
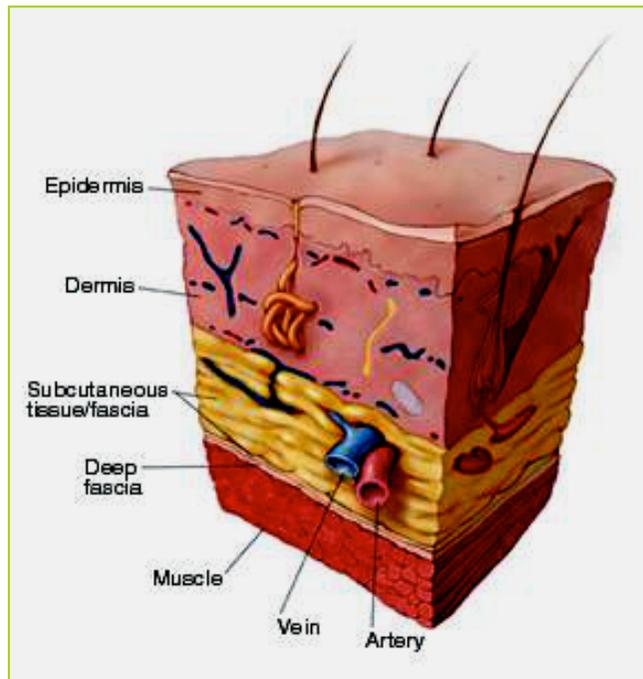
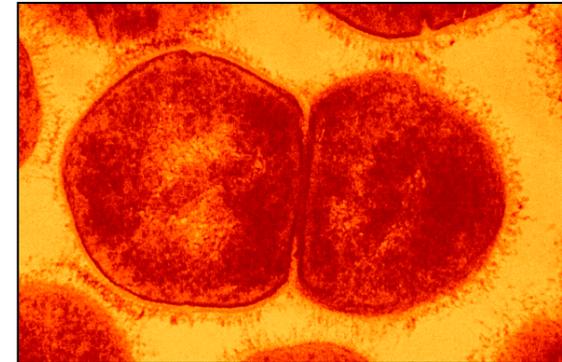


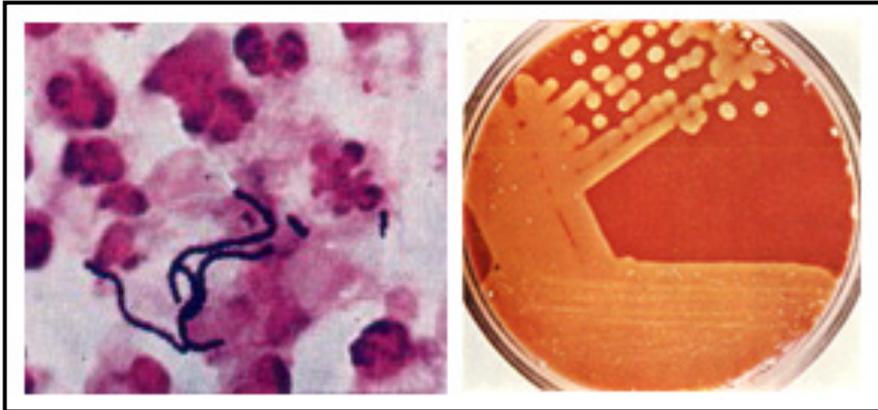
Fig. 2. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides mediated by alterations in surface charge.

# Fasciite nécrosante à Streptococcus pyogenes Groupe A

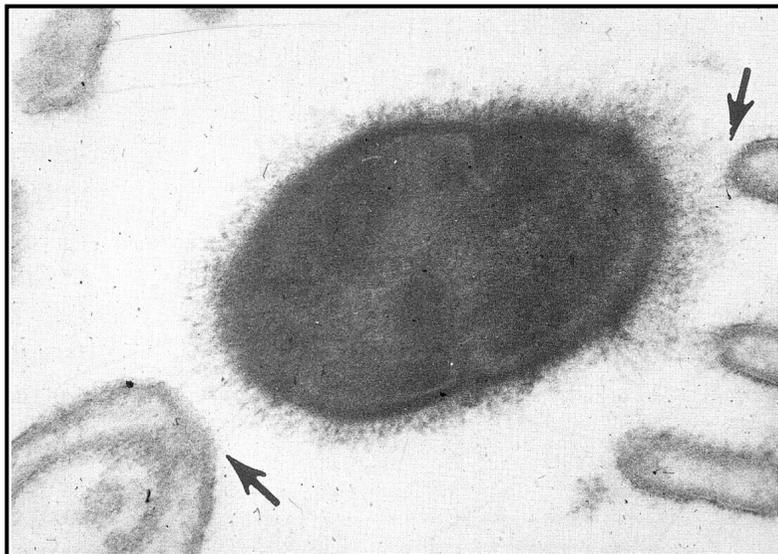
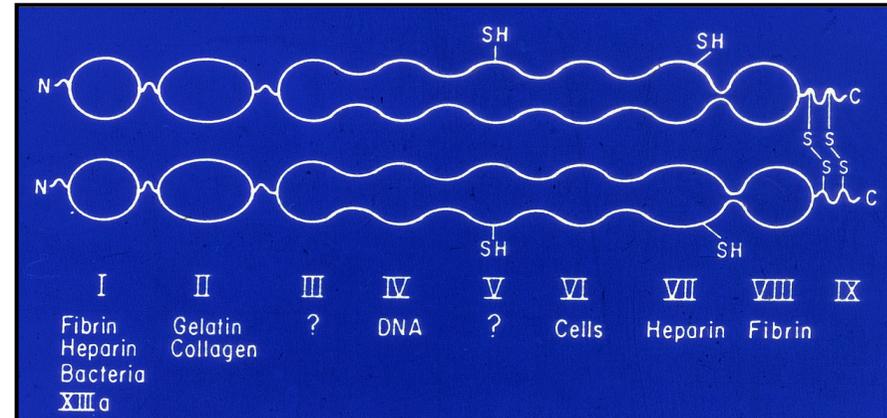


# *Streptococcus pyogenes*: un modèle d'adhérence pour les bactéries à Gram positif

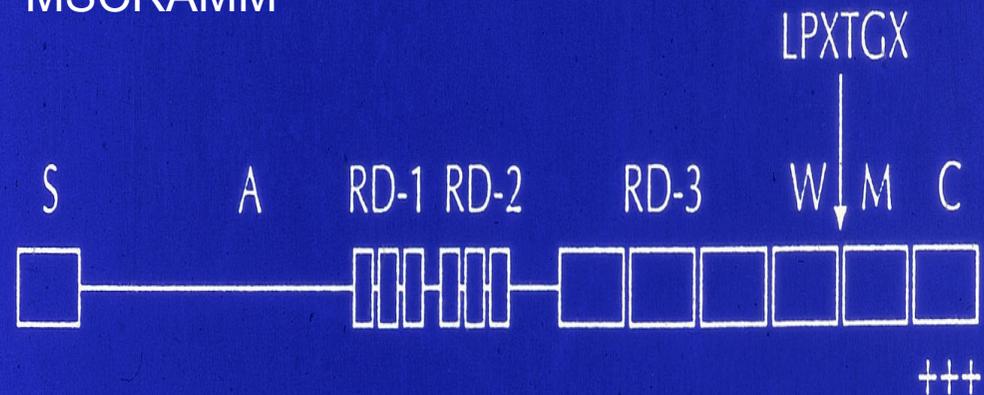
Streptocoque beta-hémolytique groupe A



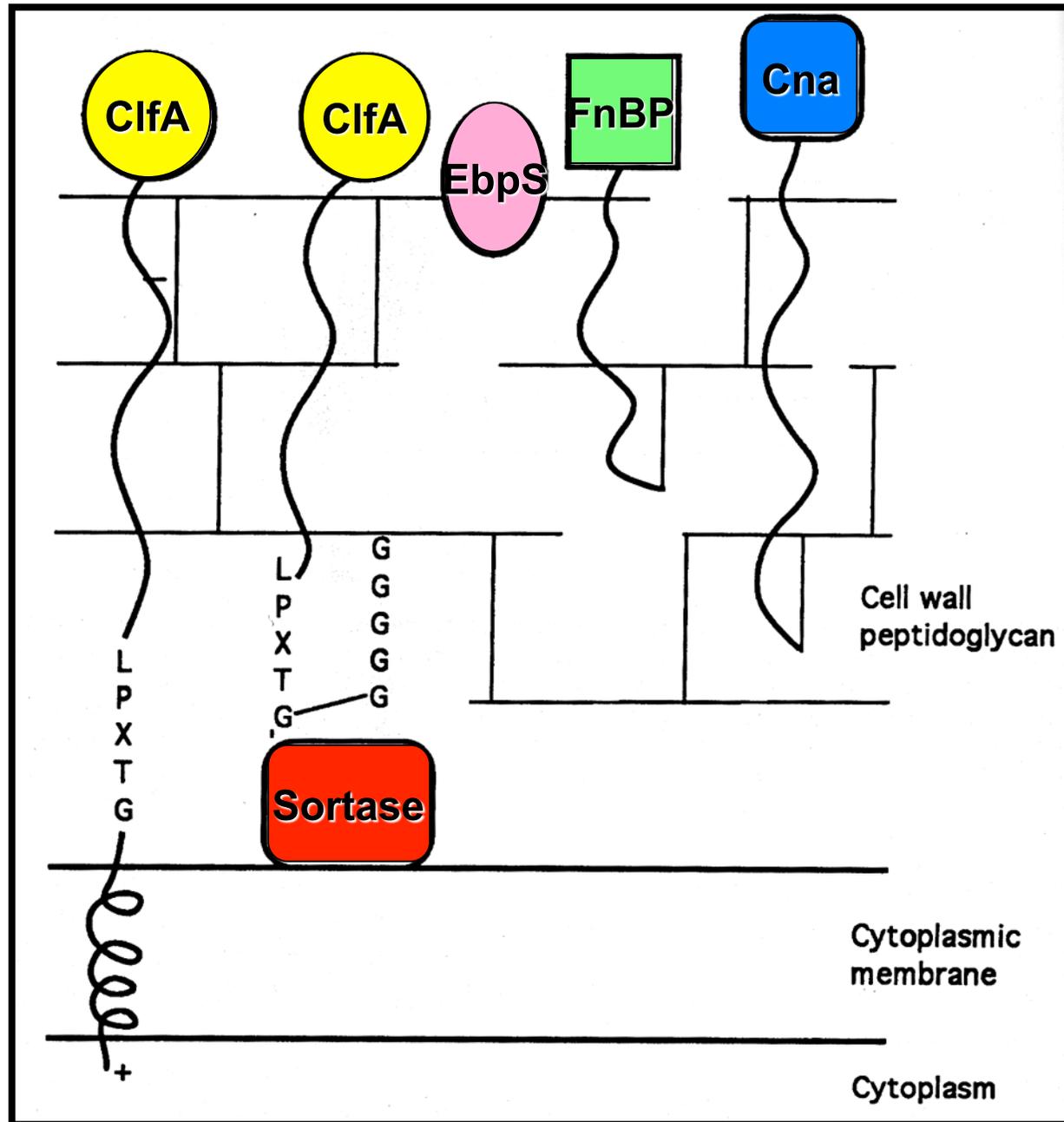
Fibronectine



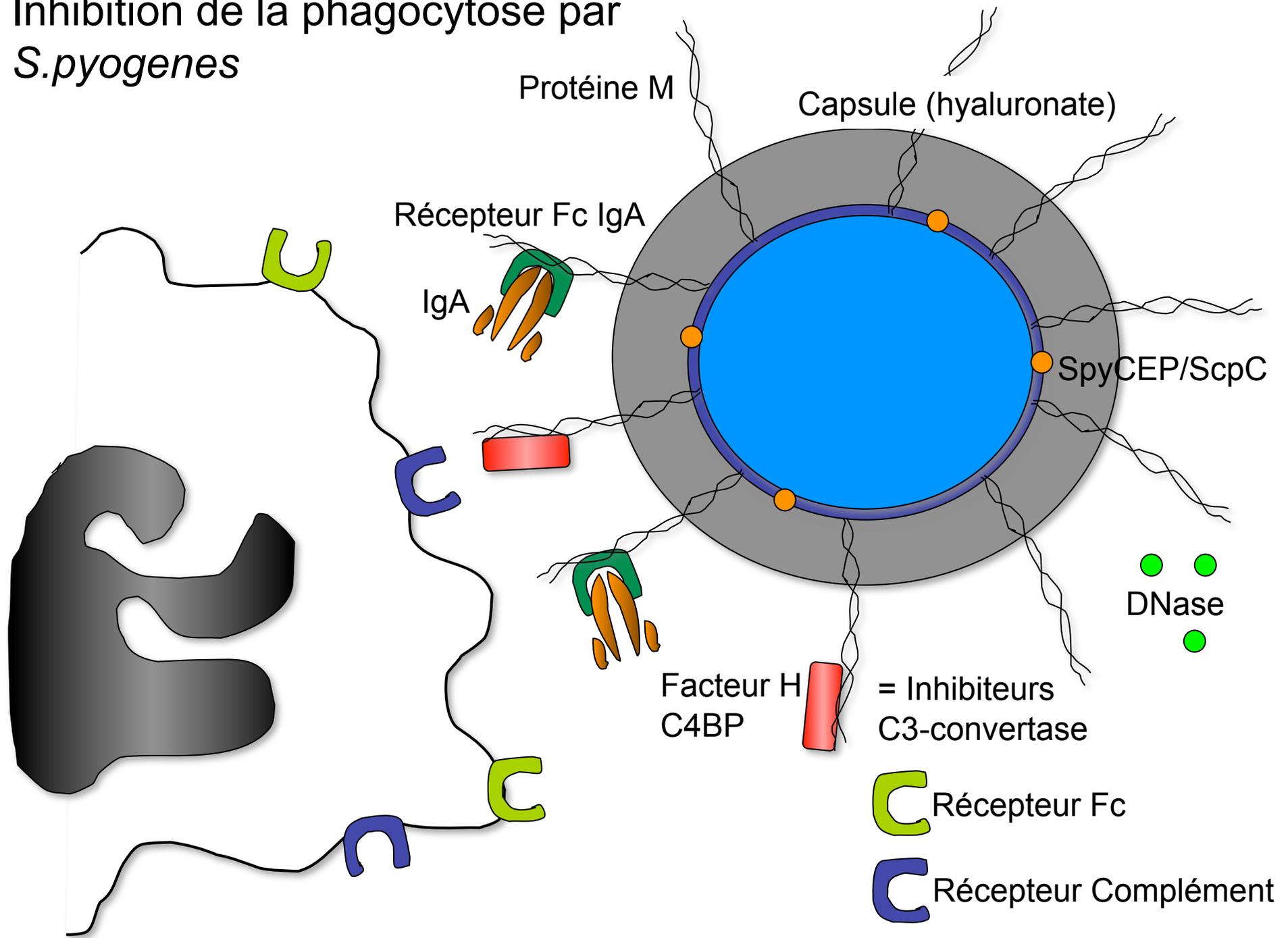
MSCRAMM\*



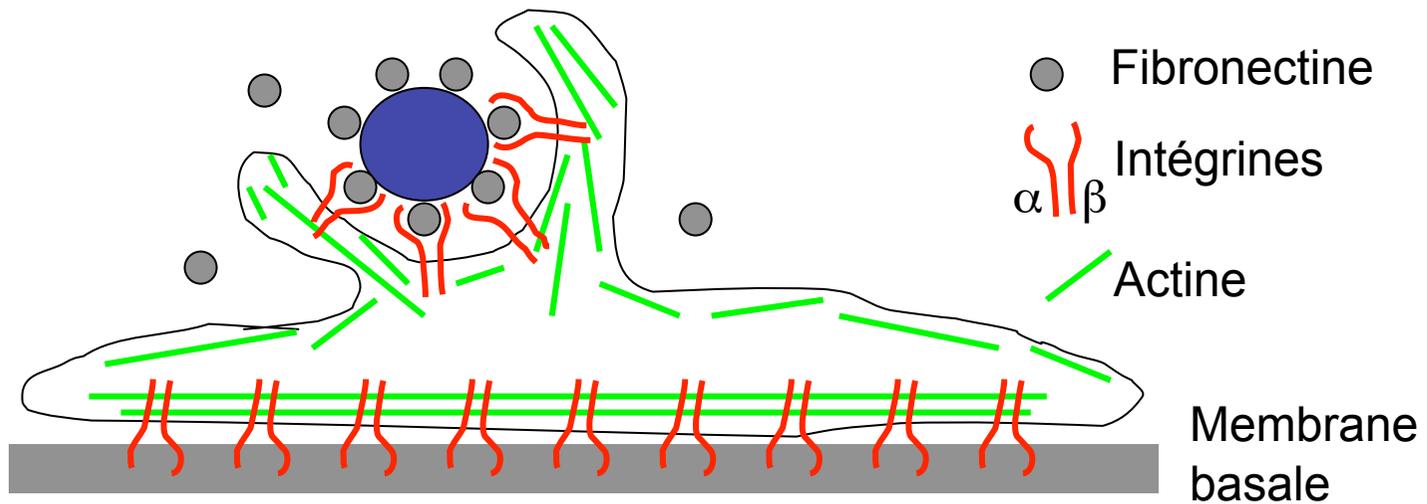
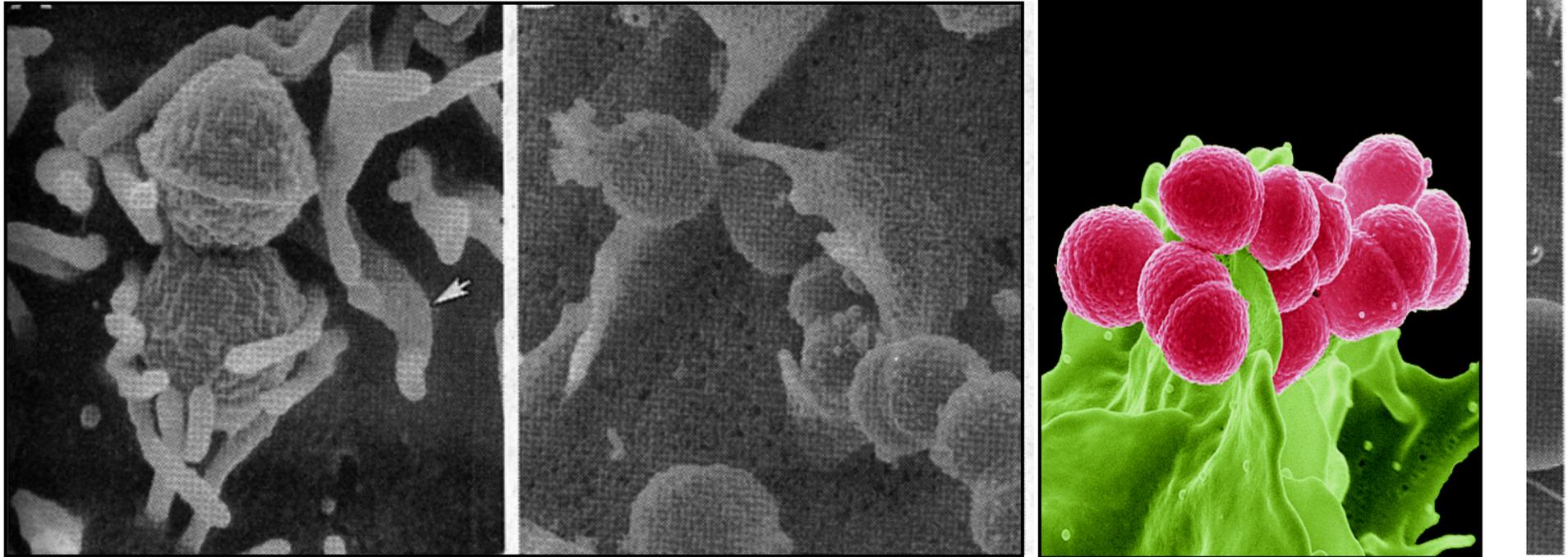
\*Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules



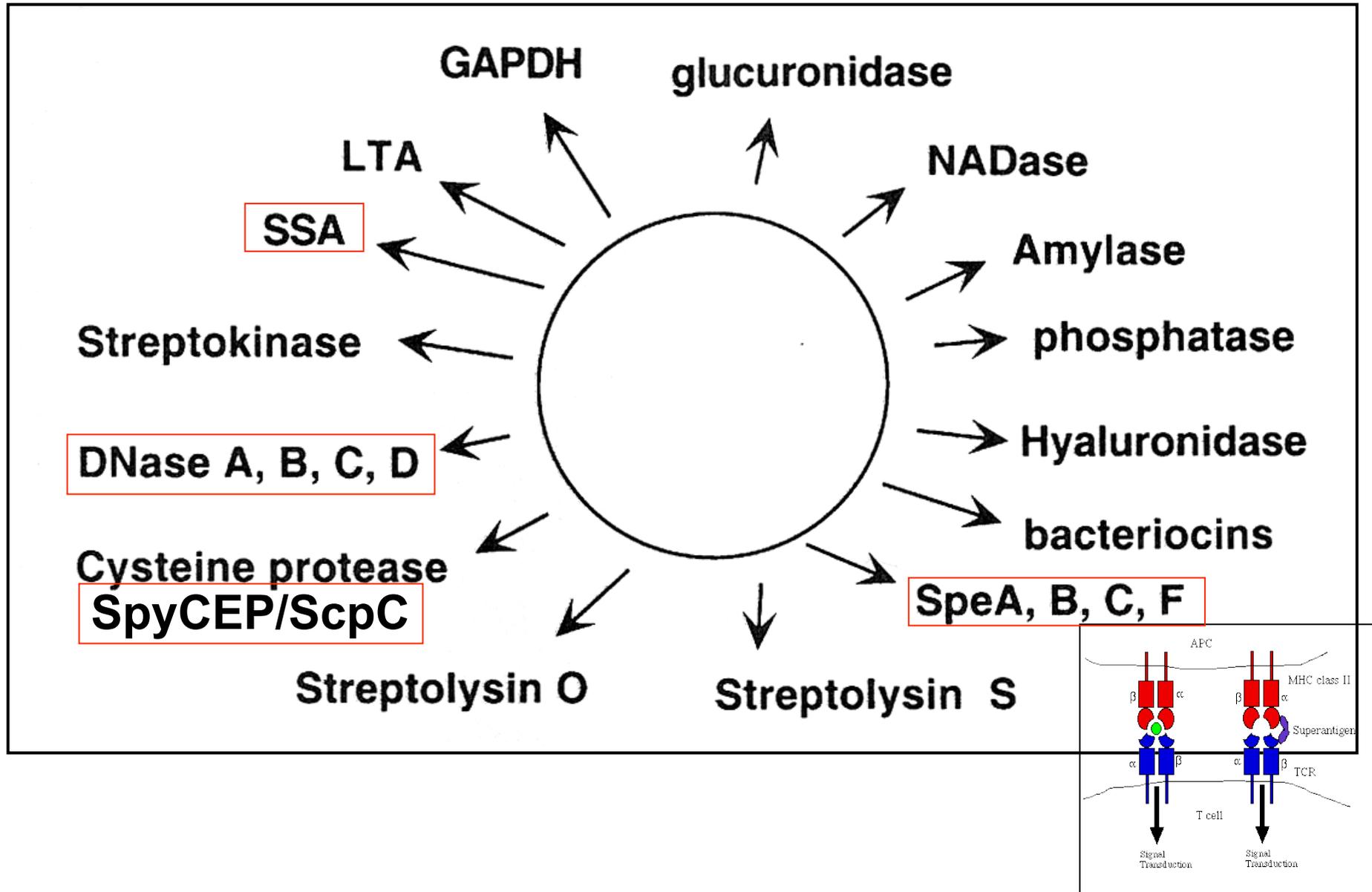
# Inhibition de la phagocytose par *S. pyogenes*



# Internalisation de *Streptococcus pyogenes*



# Facteurs de virulence extracellulaires de *S. pyogenes*



# Echappement aux Polynucléaires neutrophiles: Nouveaux mécanismes d'invasion tissulaire

## Enzyme de clivage de l'IL-8

ScyCEP/ScpA, CC

*S.pyogenes* A,

IL-8 = CXC chimiokine (PNN)

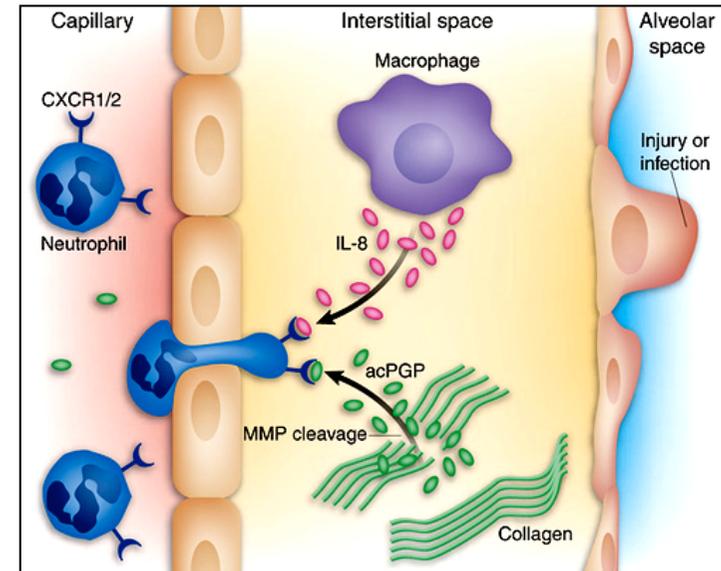
(Hidalgo-Grass et al., 2006, EMBO J.)

## DNAses

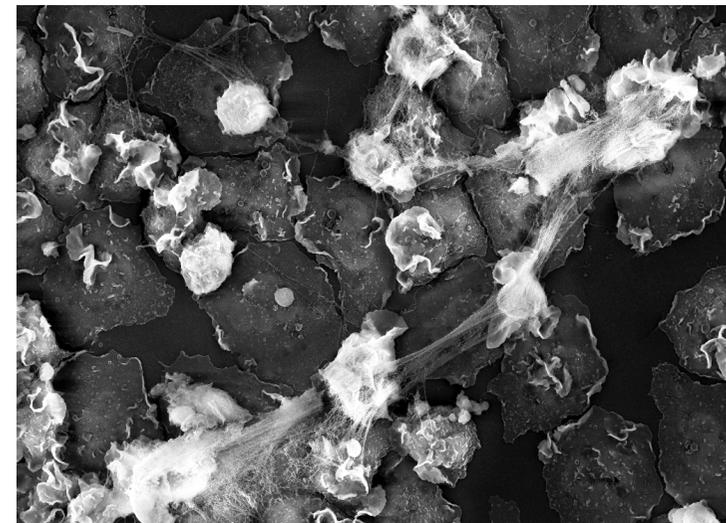
*S.pyogenes*, *S.aureus*,

*S.pneumoniae*.

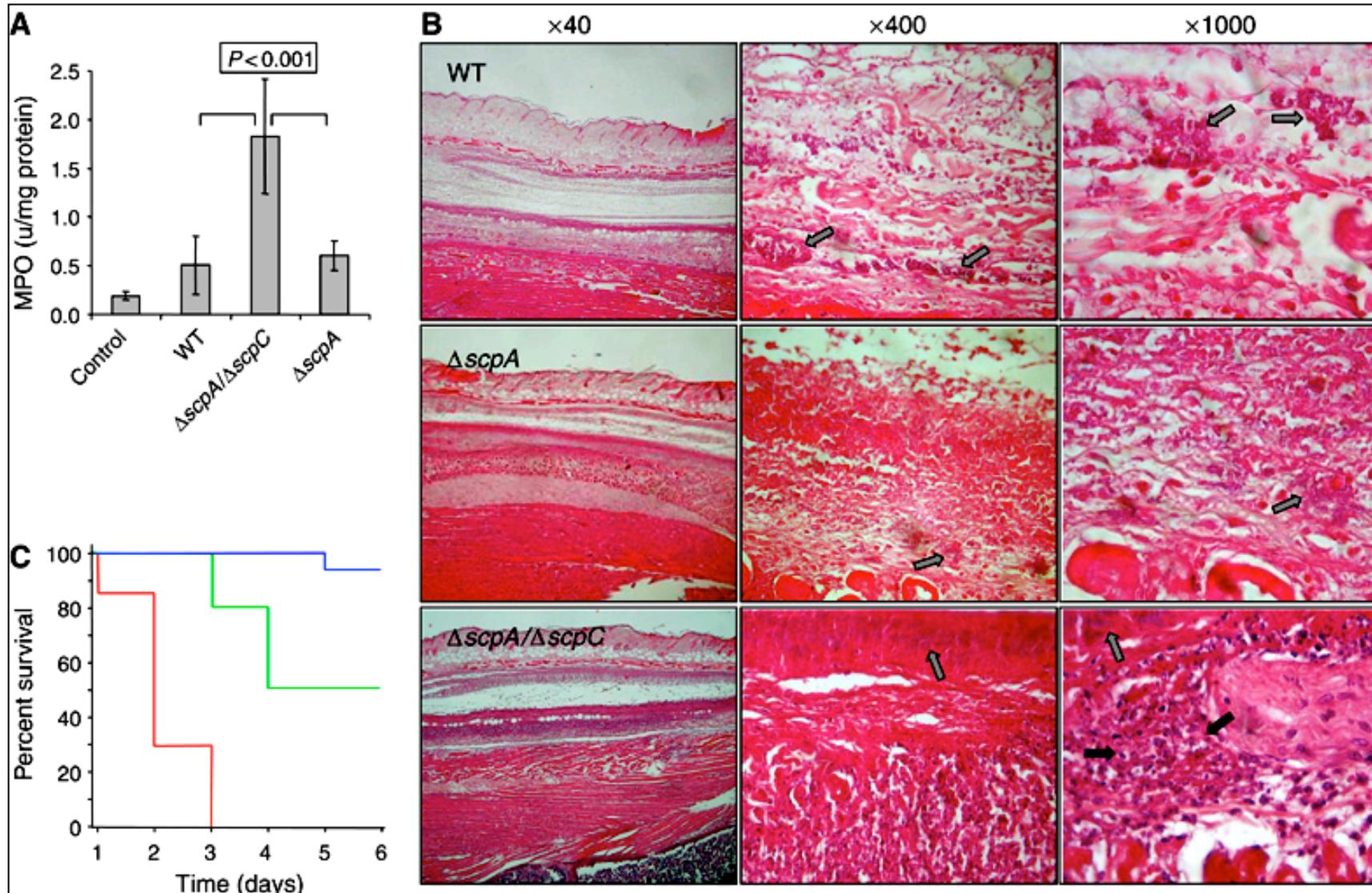
Fonction ???



PMN Neutrophil Extracellular Traps (NET)



# ScpA/ScpC: protéases de *S. pyogenes* clivant IL-8, KC et MIP2 en C-terminal



 Bactéries  
 Polynucléaires neutrophiles

**Gérard Orth**  
***(Institut Pasteur et Académie des***  
***sciences, Paris)***

***Les Papillomavirus, du col   la peau***