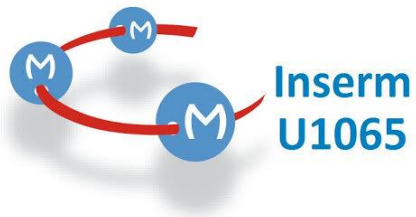




3 octobre 2025
10^{ème} journée nationale

Etude des mécanismes pigmentaires au cours de l'Epidermolyse bulleuse simple à PIGmentation Mouchetée (EPIGM)

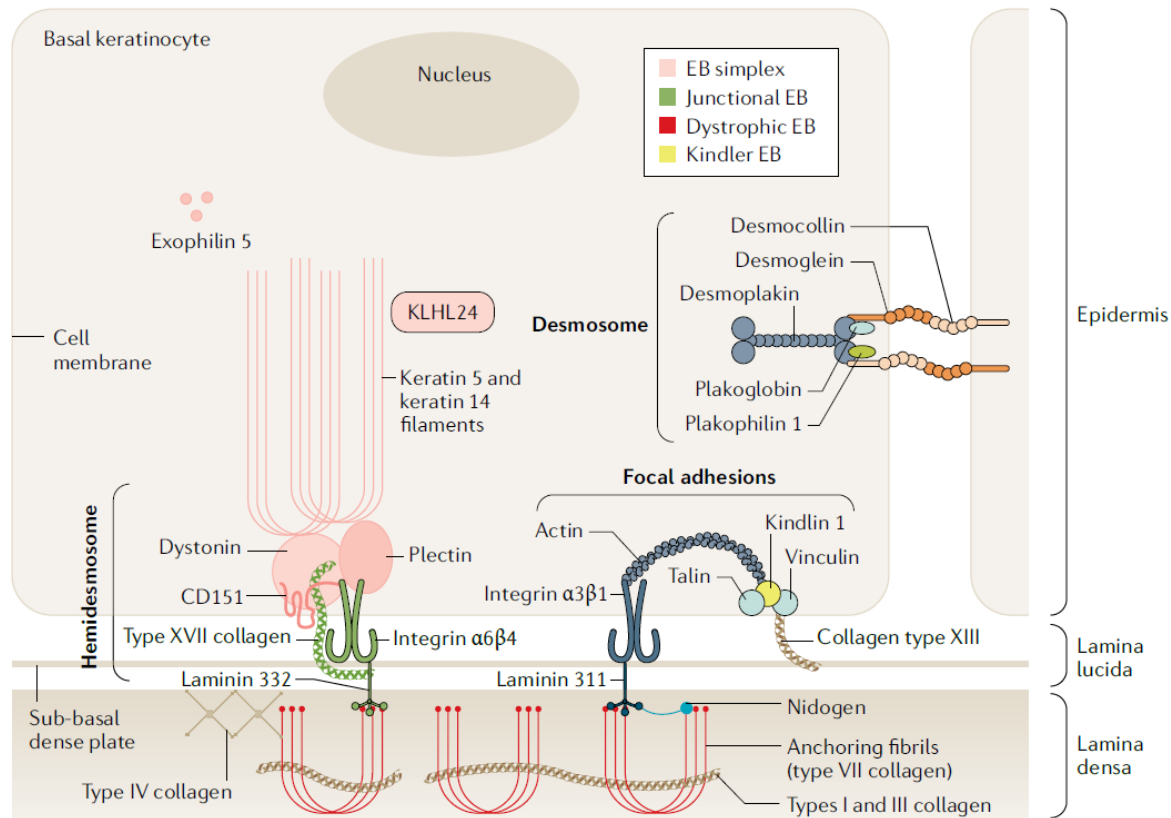
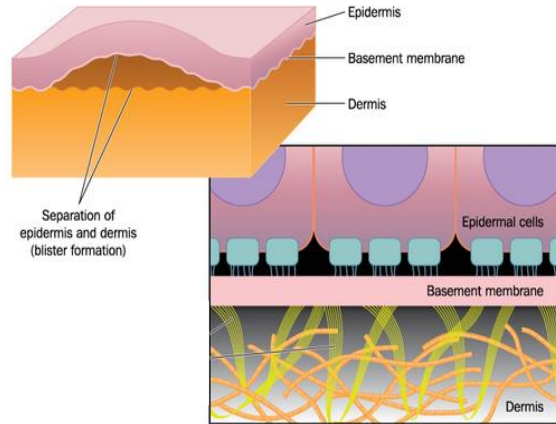
Marjorie Heim / Dr Christine Chiaverini



Epidermolyse Bulleuse Héréditaire



EBS récessive (CHU de Nice)



- Groupe de maladies génétiques rares, à transmission autosomique dominante ou récessive (prévalence 20 à 50 / 1 million dans le monde, environ 100 nouveaux cas par an en France)
- Fragilité de la peau et des muqueuses : mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans la jonction dermo-épidermique.
Décollement cutanés/muqueux (bulles) post-traumatiques → érosions → cicatrisation +/- normale
- Cliniquement et génétiquement très hétérogène
- Plus de 30 sous-types cliniques, regroupés en **4 types principaux**, basés sur le niveau de clivage dans la zone de jonction dermo-épidermique :

- **EB Simple (EBS)**
- **EB Jonctionnelle (JEB)**
- **EB Dystrophique (DEB)**
- **Syndrome de Kindler**

Epidermolyse Bulleuse Simple avec Pigmentation Mouchetée (EBS-PM)

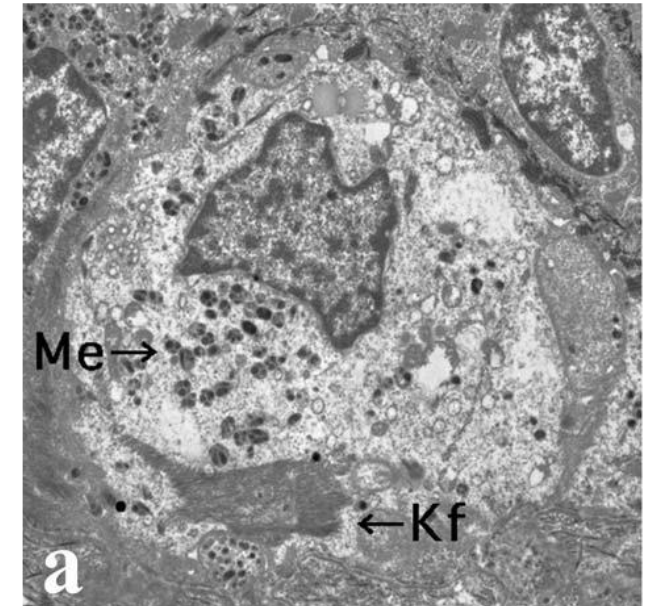
Ce qu'on connaît à propos de l'EBS-PM:

- Rare sous-type d'**Epidermolyse Bulleuse Simple** (affecte principalement la **kératine 5 ou 14**)
- **Bulles acrales** qui apparaissent à la naissance ou dans la petite enfance et qui tendent à diminuer avec l'âge
- **Présence d'une hyperpigmentation mouchetée** (tâches de 2-5mm de diamètre), qui apparait plus tard dans l'enfance, se diffuse lentement et ne disparaît pas
- **Agrégation de mélanosomes** dans les kératinocytes basaux avec une localisation dispersée dans le cytoplasme. Ne forment pas de coiffe nucléaire.
- **Mutation la plus fréquente: KRT5 Pro25Leu** (Uttam, 1996)



CHU de Nice

Kératinocyte, biopsie de patient EBS-PM



Yasukawa, 2005

Epidermolyse Bulleuse Simple avec Pigmentation Mouchetée (EBS-PM)

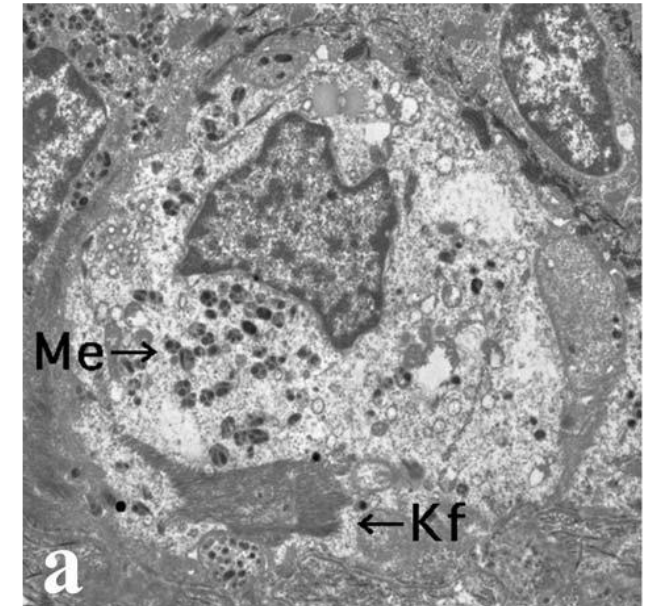
Ce qu'on connaît à propos de l'EBS-PM:

- Rare sous-type d'**Epidermolyse Bulleuse Simple** (affecte principalement la **kératine 5 ou 14**)
- **Bulles acrales** qui apparaissent à la naissance ou dans la petite enfance et qui tendent à diminuer avec l'âge
- **Présence d'une hyperpigmentation mouchetée** (tâches de 2-5mm de diamètre), qui apparaît plus tard dans l'enfance, se diffuse lentement et ne disparaît pas
- **Agrégation de mélanosomes** dans les kératinocytes basaux avec une localisation dispersée dans le cytoplasme. Ne forment pas de coiffe nucléaire.
- **Mutation la plus fréquente: KRT5 Pro25Leu** (Uttam, 1996)



CHU de Nice

Kératinocyte, biopsie de patient EBS-PM



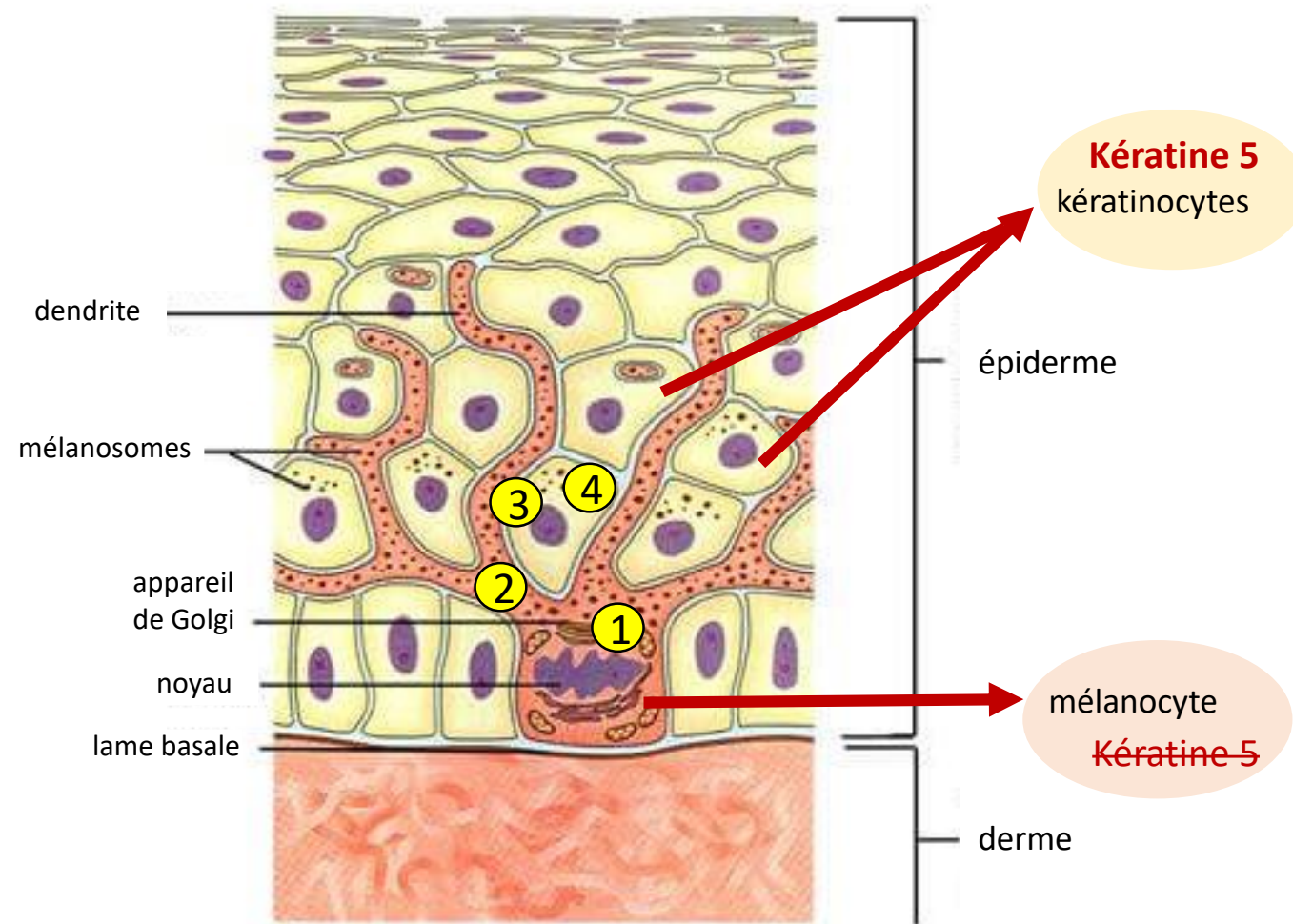
Yasukawa, 2005

Ce qu'on ne connaît pas:

- **Les mécanismes menant à la pigmentation mouchetée :**
Plusieurs troubles pigmentaires avec implication de la kératine 5 ou 14 (Dowling-Degos disease, syndrome de Naegeli-Franceschetti-Jadassohn)
- **Pourquoi cette mutation P25L en particulier? (~90% des cas)**

Mélanogénèse et fonction de la kératine 5 dans la peau

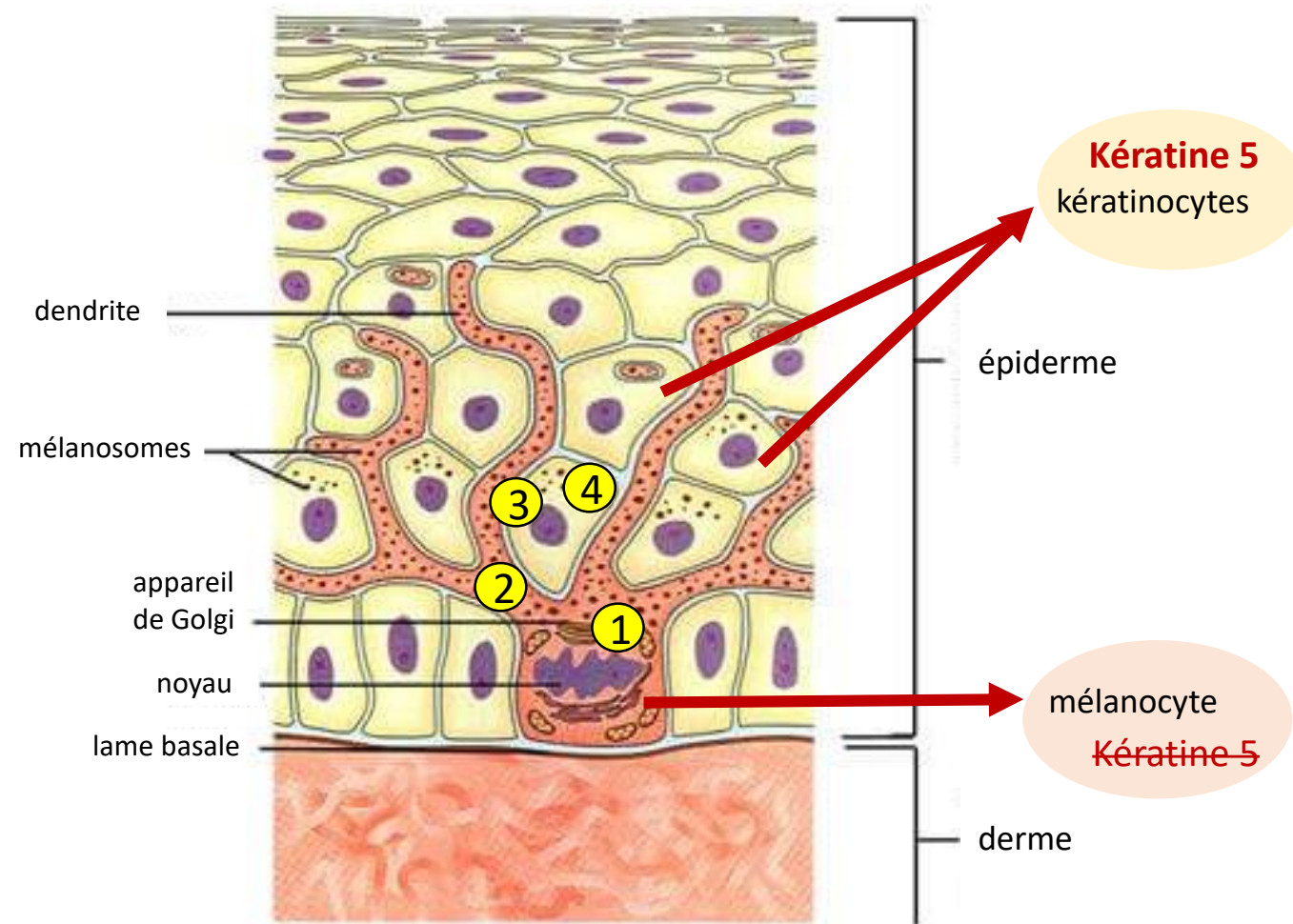
Etapes de la mélanogénèse:



D'après schéma de Laboratoire In'oya

Mélanogénèse et fonction de la kératine 5 dans la peau

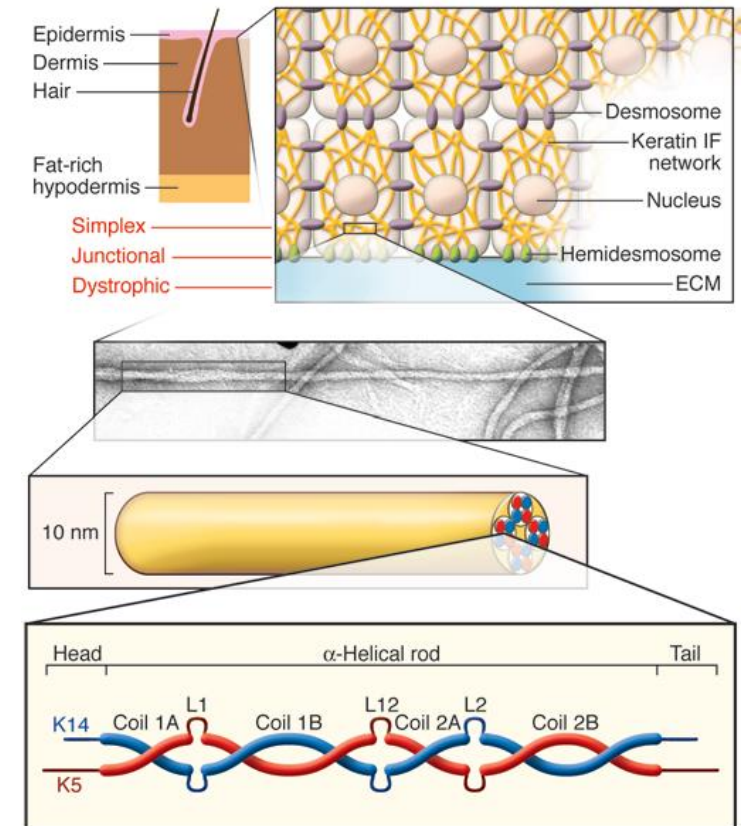
Etales de la mélanogénèse:



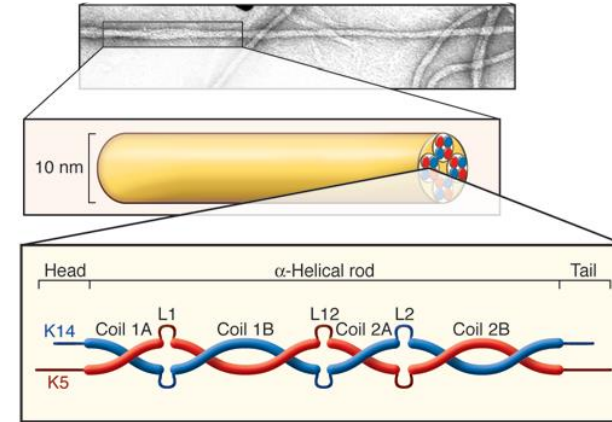
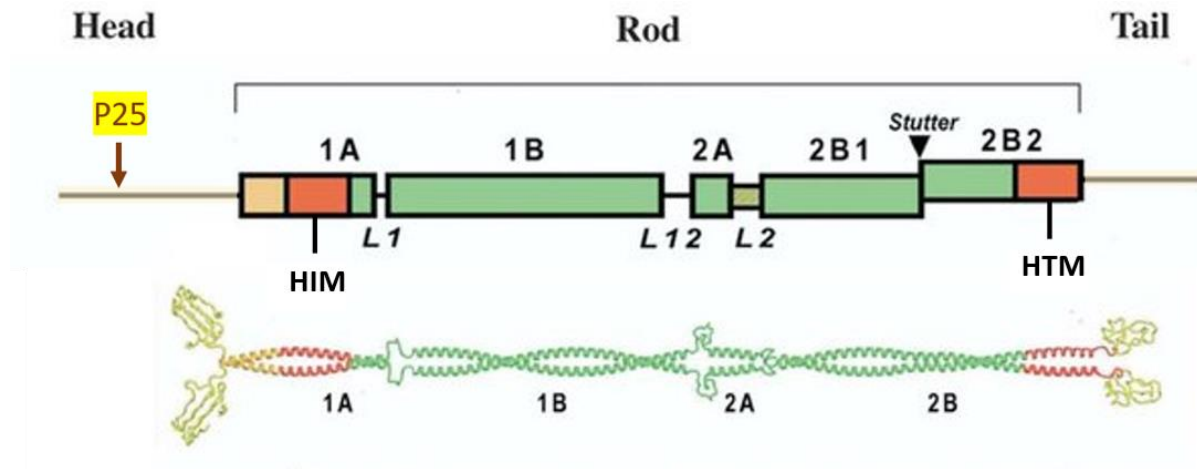
D'après schéma de Laboratoire In'oya

Kératine 5:

- Forme un hétérodimère avec la kératine 14
- Protéine structurale : fonction de cyto-architecture
- Protection contre les forces mécaniques
- **Nouvelle fonction : régulation de la pigmentation cutanée ?**

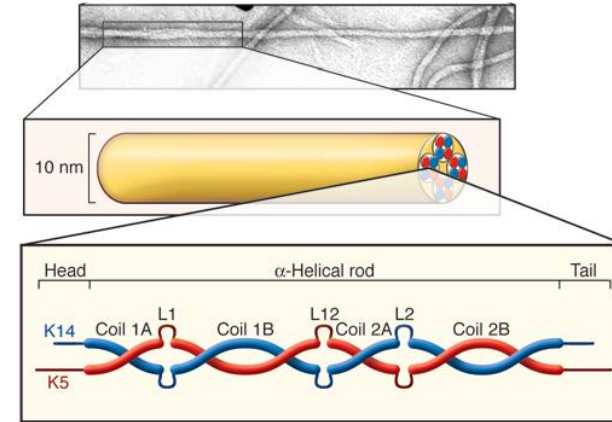
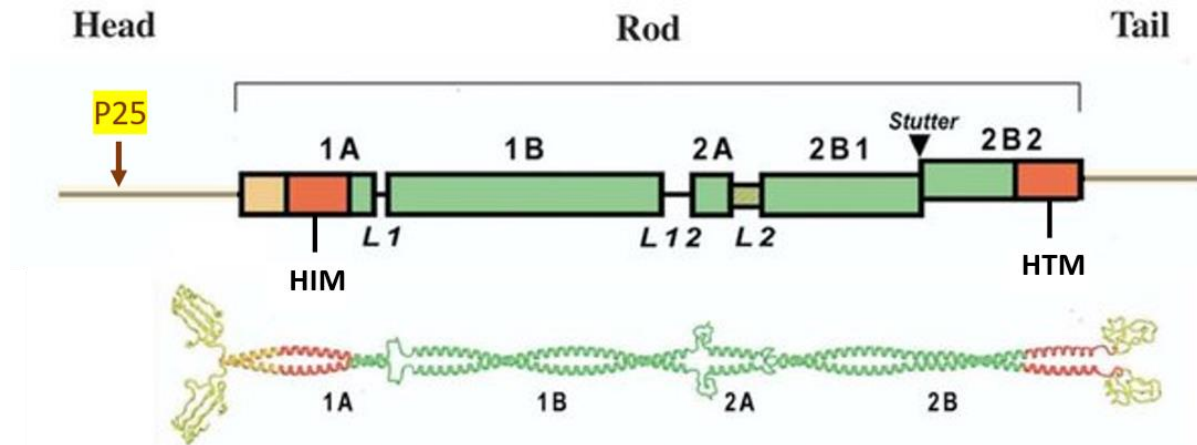


Quel impact de la mutation P25L sur la kératine 5 ?



→ Mutations dans le domaine de tête (head) ne perturbent pas l'assemblage des filaments intermédiaires : **pas d'impact structurel**

Quel impact de la mutation P25L sur la kératine 5 ?



→ Mutations dans le domaine de tête (head) ne perturbent pas l'assemblage des filaments intermédiaires : **pas d'impact structurel**

Length 590	Pro25	Keratin 5	Last updated 2007-04-03 v3
Mass (Da) 62,378	Head domain		Checksum ⁱ E9D5318E01F55145
MSRQSSVSFR SGGSRSFSTA SAI TPSVSRT SFTSVSRSGG GGGGGFGRVS LAGACGVGGY GSRSLYNLGG SKRISISTSG GSFRNRFAG AGGGYGFGGG AGSGFGFGGG AGGGFGLGGG AGFGGGFGGP GFPVCPGGI QEVTVNQSLL			
Highly conserved motif			
TPLNLQIDPS IQRVTEERE QIKTLNNKFA SFIDKVRFLF QQNKVLDTKW TLLQEQTGKT VRQNLPLFE QYINNLRRQL DSIVGERGRL DSELNMQDL VEDFKNKYED EINKRTTAEN EFVMLKKDVD AAYMNKVELE AKVDALMDEI			
NFMKMFDAE LSQMQTHVSD TSVVLSMDNN RNLDLDSIIA EVKAQYEEIA NRSRTEAESW YQTKYEELQQ TAGRHGDDL R NTKHEISEMN RMIQRLRAEI DNKKKQCANL QNAIADAEQR GELALKDARN KLAELEEALQ KAKQDMARLL			
REYQELMNTK LALDVEIATY RKLLEGECCR LSGEGVGPNV ISVVTSSVSS GYGSGSGYGG GLGGGLGGGL GGGLAGGSSG SYSSSSSGGV GLGGGLSVGG SGFSASSGRG LGVGFGSGGG SSSSVKFVST TSSSRKSFKS			

→ Dans une région hautement conservée (rôle crucial pour la fonction de la protéine)

→ Présence de sites de modifications post-traductionnelles (phosphorylations sur Thr24 et Ser26)

→ Effet connu des phosphorylations sur les interactions entre les filaments de kératines et d'autres macromolécules cellulaires

Hypothèses

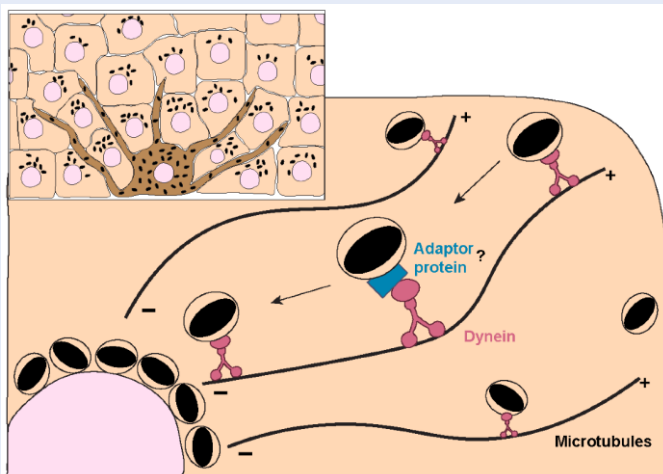
Sachant que la kératine 5 est exprimée dans la peau par les kératinocytes mais pas par les mélanocytes, les défauts de pigmentation observés dans l'EBS-PM peuvent être causés par :

Sachant que la kératine 5 est exprimée dans la peau par les kératinocytes mais pas par les mélanocytes, les défauts de pigmentation observés dans l'EBS-PM peuvent être causés par :

1) Dysfonctionnement du transport ou de la dégradation des mélanosomes dans les kératinocytes

Interaction directe ou indirecte de la kératine 5 avec des protéines impliquées dans :

- le transport de mélanosomes dans les kératinocytes (comme la dynéine)
- la dégradation des mélanosomes dans les kératinocytes (ex : cathepsine V, Rab7b ou des acteurs de l'autophagie)

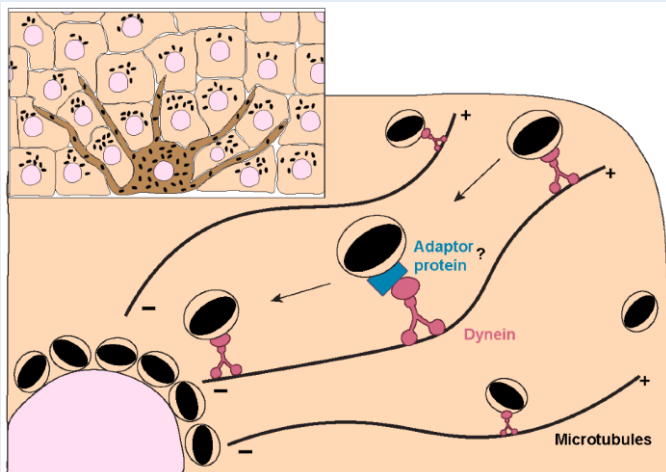


Sachant que la kératine 5 est exprimée dans la peau par les kératinocytes mais pas par les mélanocytes, les défauts de pigmentation observés dans l'EBS-PM peuvent être causés par :

1) Dysfonctionnement du transport ou de la dégradation des mélanosomes dans les kératinocytes

Interaction directe ou indirecte de la kératine 5 avec des protéines impliquées dans :

- le transport de mélanosomes dans les kératinocytes (comme la dynéine)
- la dégradation des mélanosomes dans les kératinocytes (ex : cathepsine V, Rab7b ou des acteurs de l'autophagie)

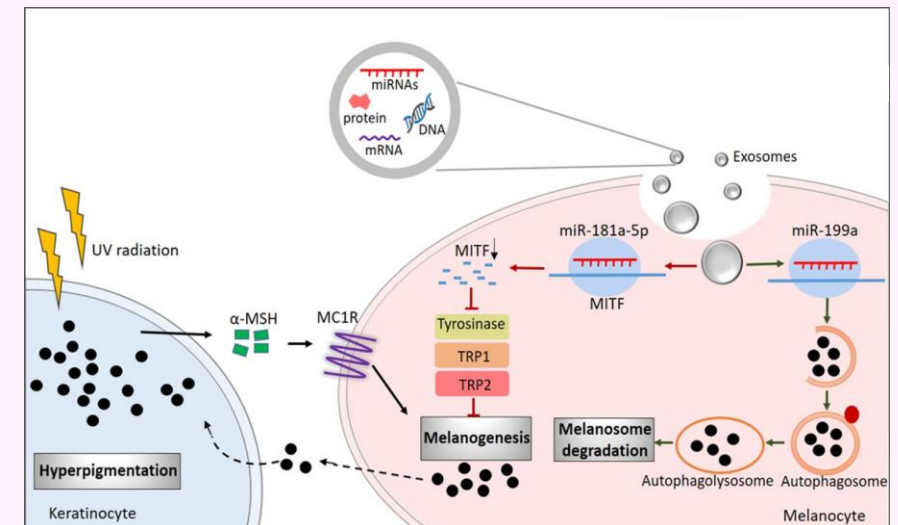


D'après Bento-Lopes et al, International Journal of Molecular Sciences, 2023

2) Altération du dialogue mélanocytes-kératinocytes causant une modification de la mélanogénèse

Effet de la kératine 5 sur l'expression ou la sécrétion de facteurs kératinocytaires régulant la mélanogénèse:

- Hormones : α -MSH, ET-1, KGF,...
- miARN exosomaux



D'après Wang et al, Stem Cell research and Therapy, 2021

Biopsies d'un patient EBS-MP (TEC.N) :

Porteur de la mutation P25L

Zone normale et zone hyperpigmentée

Incluses dans milieu pour microscopie électronique

Biopsies d'un patient EBS-MP (TEC.N) :

Porteur de la mutation P25L

Zone normale et zone hyperpigmentée

Incluses dans milieu pour microscopie électronique

Lignées cellulaires de mélanocytes :

Primaires :

- MHN du patient TEC.N, issus d'une zone normale et d'une zone hyperpigmentée

Immortalisés :

- MNT1 (très pigmentées) – cellules de mélanome
- Hermès 2B (faiblement pigmentées) – mélanocytes humains

Biopsies d'un patient EBS-MP (TEC.N) :

Porteur de la mutation P25L

Zone normale et zone hyperpigmentée

Incluses dans milieu pour microscopie électronique

Lignées cellulaires de mélanocytes :

Primaires :

- MHN du patient TEC.N, issus d'une zone normale et d'une zone hyperpigmentée

Immortalisés :

- MNT1 (très pigmentées) – cellules de mélanome
- Hermès 2B (faiblement pigmentées) – mélanocytes humains

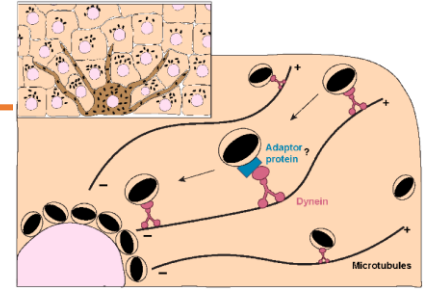
Lignées cellulaires de kératinocytes (immortalisés):

HaCaT infectés par des particules lentivirales:

- pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>{**KRT5 WT** Myc}
- pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>{**KRT5 P25L** Myc}
- pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>{**KRT5 D158H** Myc}
(mutation EBS non pigmentée, contrôle négatif)
- pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>{mCherry} (contrôle)

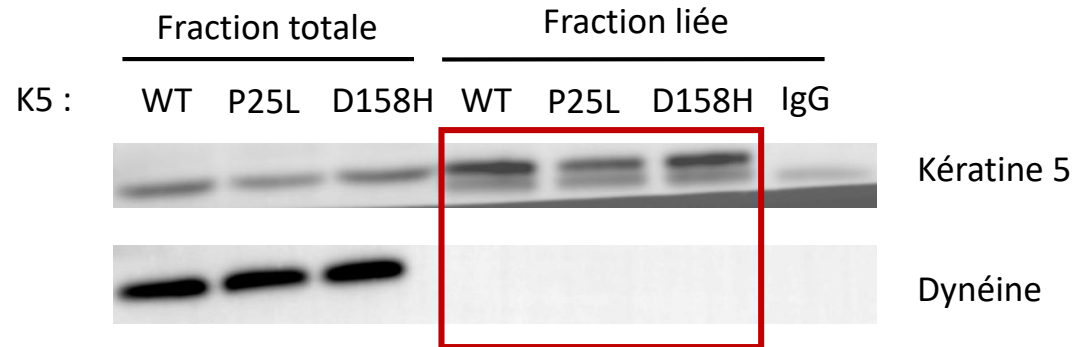
N/TERT : pas encore infectées

Résultats liés à la 1^{ère} hypothèse



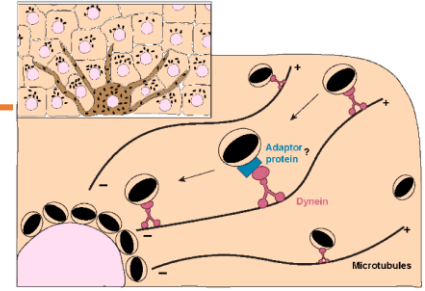
→ Problème dans le transport des mélanosomes causé par un effet de K5 sur la dynéine ?

- Pas d'interaction K5/dynéine



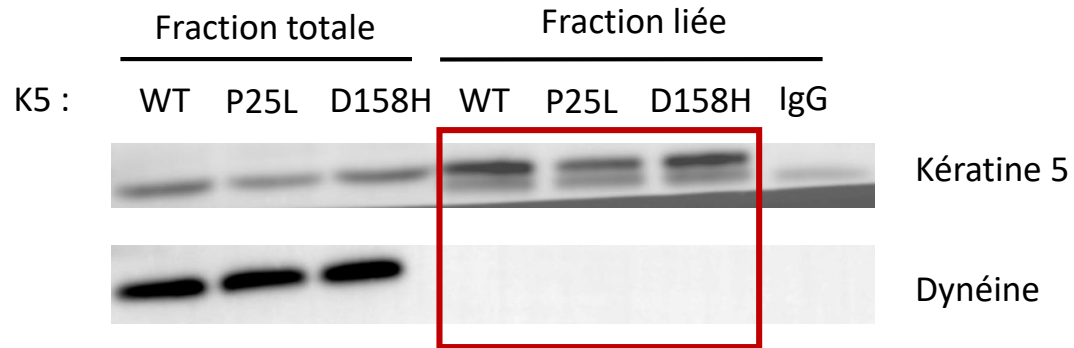
Co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules HaCaT

Résultats liés à la 1^{ère} hypothèse



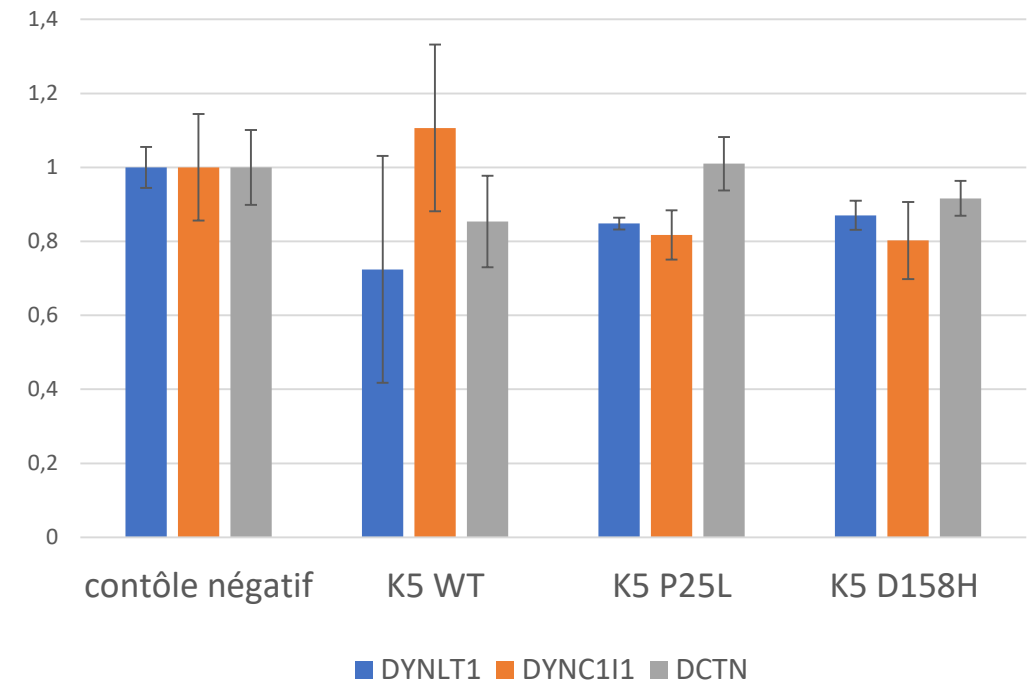
→ Problème dans le transport des mélanosomes causé par un effet de K5 sur la dynéine ?

- Pas d'interaction K5/dynéine



Co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules HaCaT

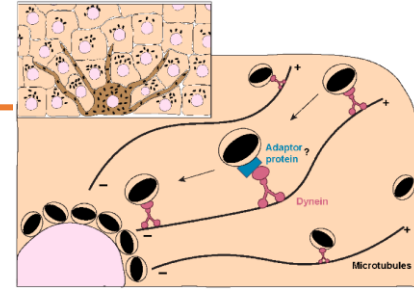
- Pas d'effet de la mutation P25L sur l'expression de la dynéine



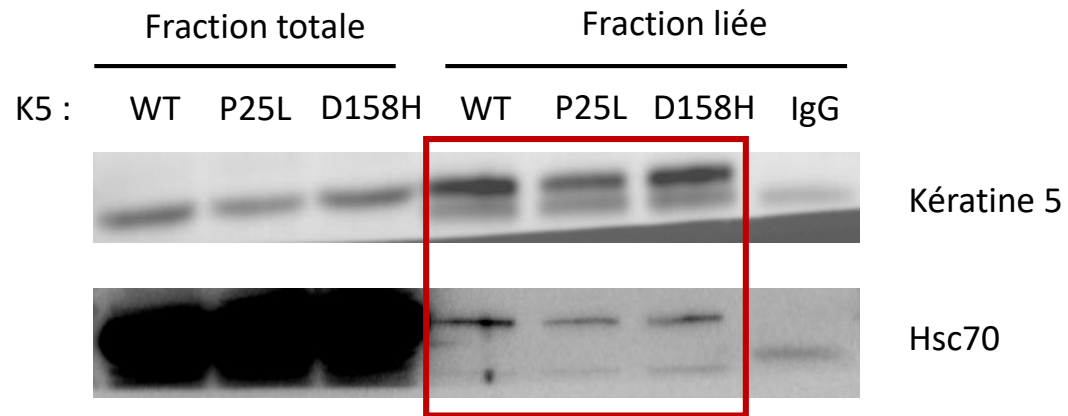
qPCR, ARN extraits de cellules HaCaT

Résultats liés à la 1^{ère} hypothèse

→ Problème dans le transport des mélanosomes causé par la dégradation des protéines impliquées ?



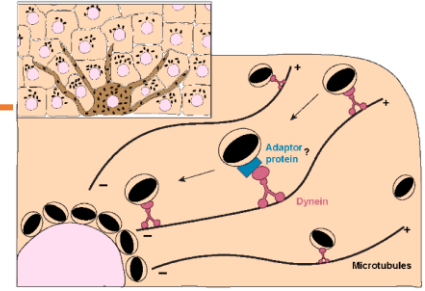
- Interaction entre K5 and Hsc70 (impliqué dans la régulation de la dégradation des protéines) mais pas de différence entre les conditions



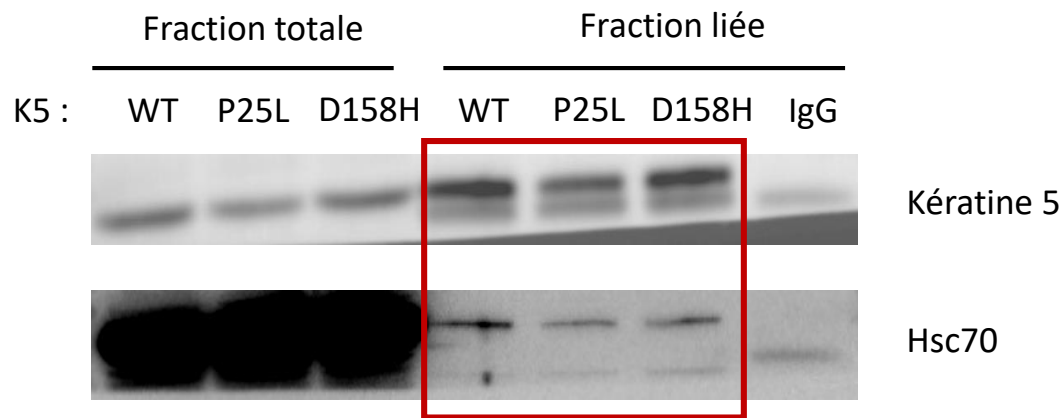
Co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules HaCaT

Résultats liés à la 1^{ère} hypothèse

→ Problème dans le transport des mélanosomes causé par la dégradation des protéines impliquées ?

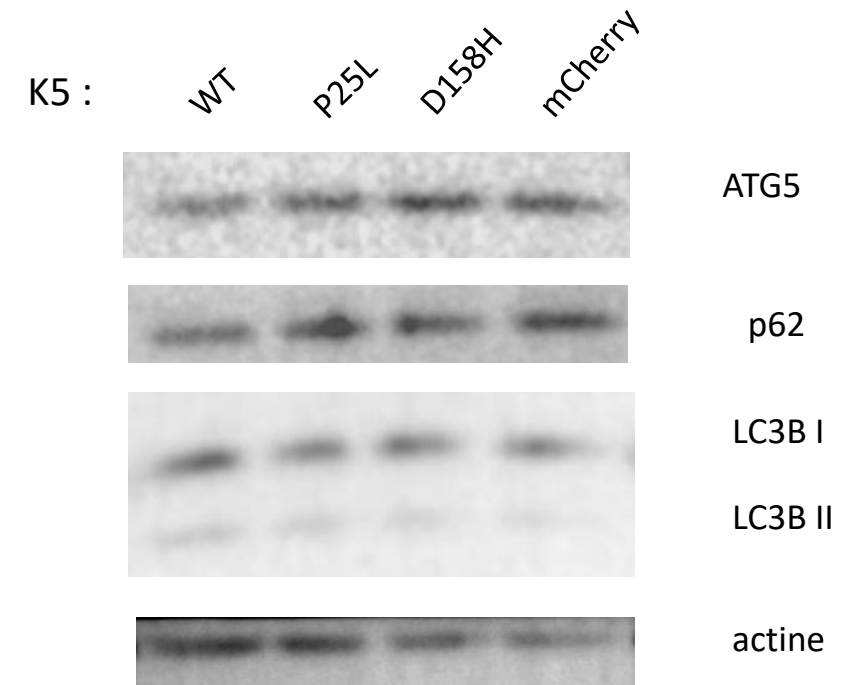


- Interaction entre K5 and Hsc70 (impliqué dans la régulation de la dégradation des protéines) mais pas de différence entre les conditions



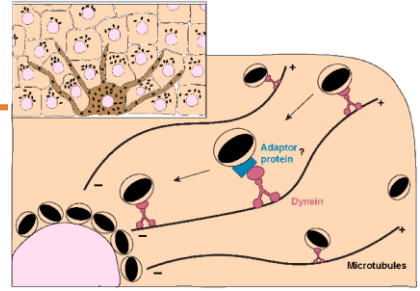
Co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules HaCaT

- Pas de différence dans l'activation de la voie de l'autophagie



Western-Blot à partir de lysats de cellules HaCaT

Expériences planifiées liées à la 1^{ère} hypothèse



→ Présence ou absence de modifications post-traductionnelles sur la kératine 5 mutée par rapport à la WT ?

→ Interactome de la kératine 5 modifié lorsque celle-ci est mutée ?

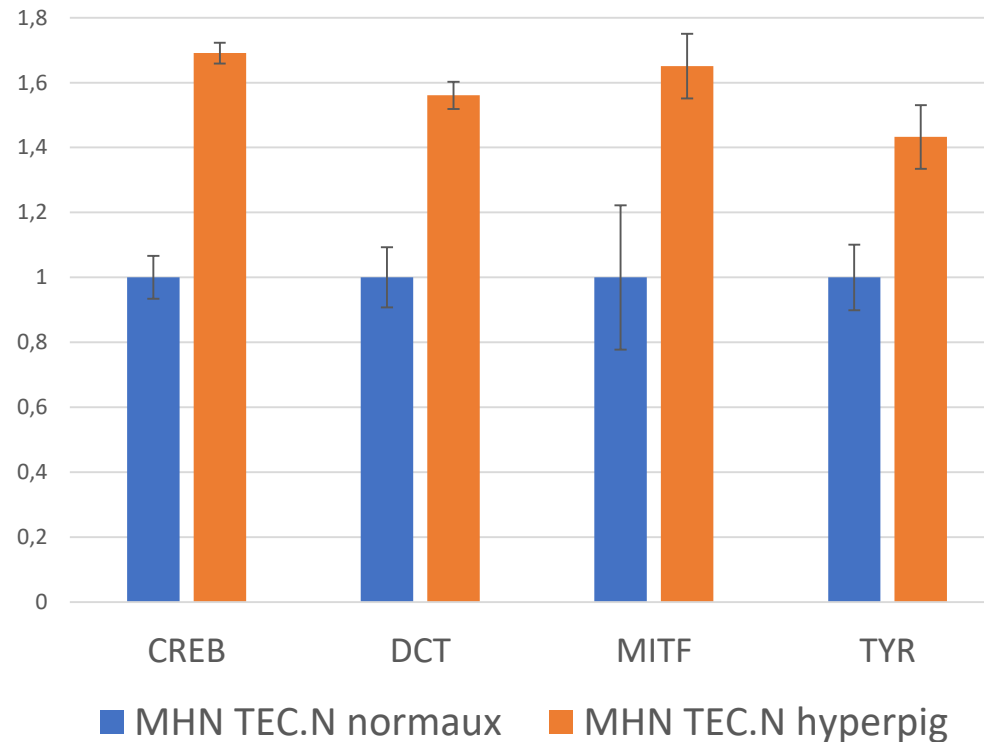
- Immunoprécipitation de la kératine 5 WT ou mutée à partir de lysats de HaCaT et analyse en spectrométrie de masse

→ Expériences en cours

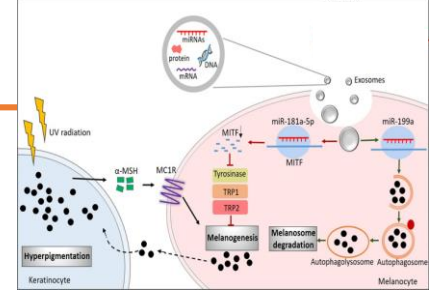
Résultats liés à la 2^{de} hypothèse

→ Différence de mélanogenèse entre les zones normales et les zones hyperpigmentées ?

- Augmentation de l'expression des gènes de la mélanogenèse dans les MHN isolés de la zone hyperpigmentée par rapport à ceux de la zone normale (biopsie du patient TEC.N)



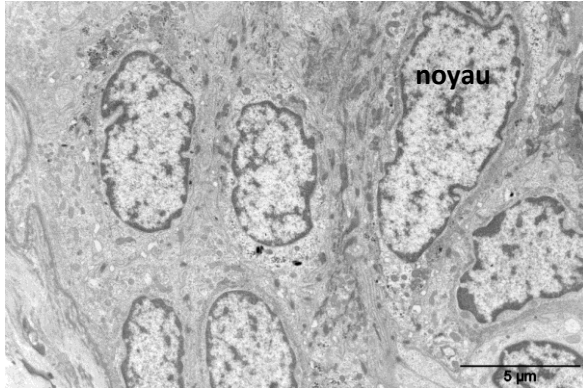
qPCR : ARN extraits des MHN du patient TEC.N



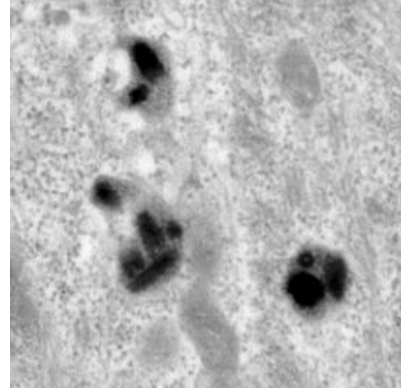
Résultats liés à la 2^{de} hypothèse

→ Différence de mélanogénèse entre les zones normales et les zones hyperpigmentées ?

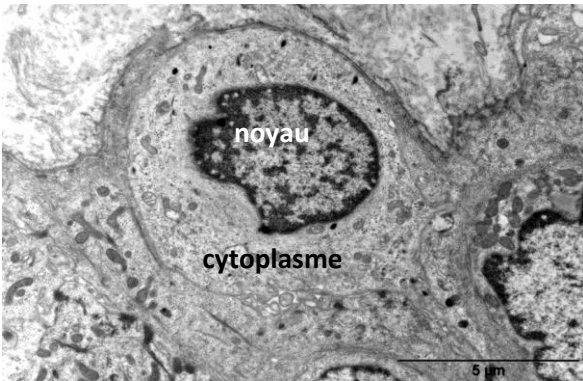
Zone normale



kératinocytes



mélanosomes

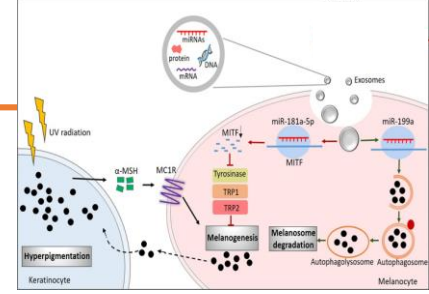


mélanocyte

→ Très peu de mélanosomes visibles dans les kératinocytes

→ Mélanocytes contenant peu de mélanosomes

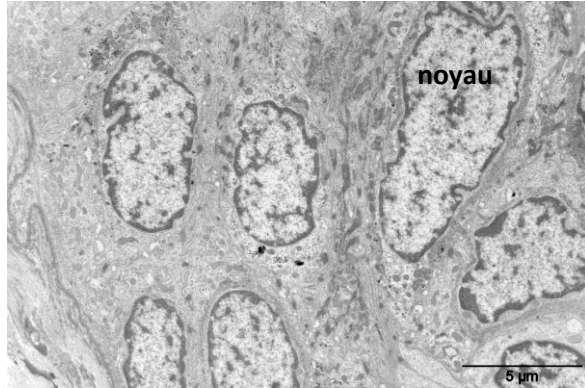
→ Aspect des mélanosomes : certains larges and isolés, mais plusieurs petits regroupés en cluster (typique des peaux claires)



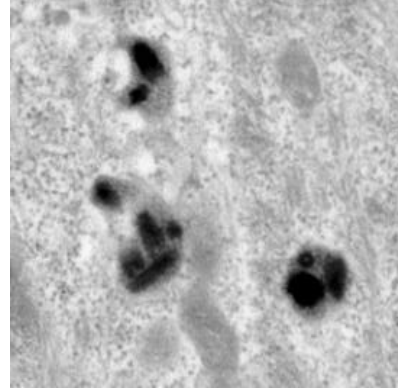
Résultats liés à la 2^{de} hypothèse

→ Différence de mélanogénèse entre les zones normales et les zones hyperpigmentées ?

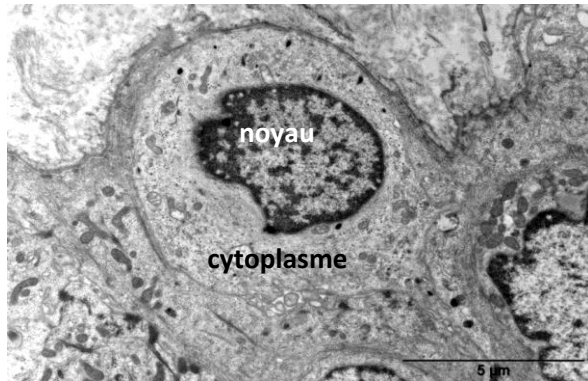
Zone normale



kératinocytes



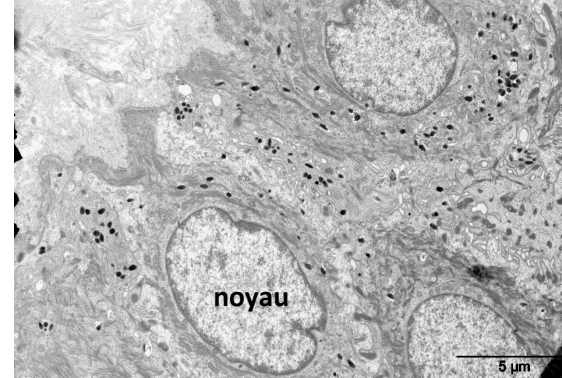
mélanosomes



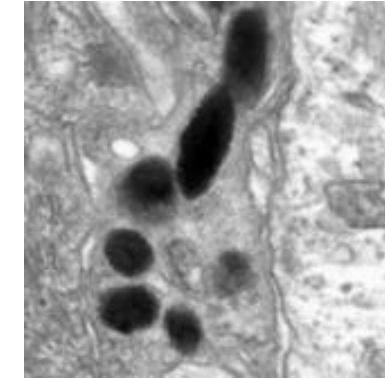
mélanocyte

- Très peu de mélanosomes visibles dans les kératinocytes
- Mélanocytes contenant peu de mélanosomes
- Aspect des mélanosomes : certains larges et isolés, mais plusieurs petits regroupés en cluster (typique des peaux claires)

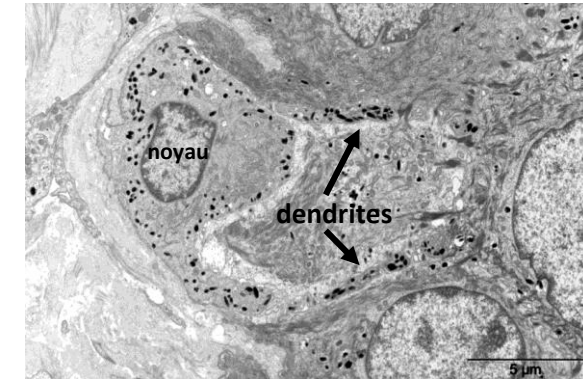
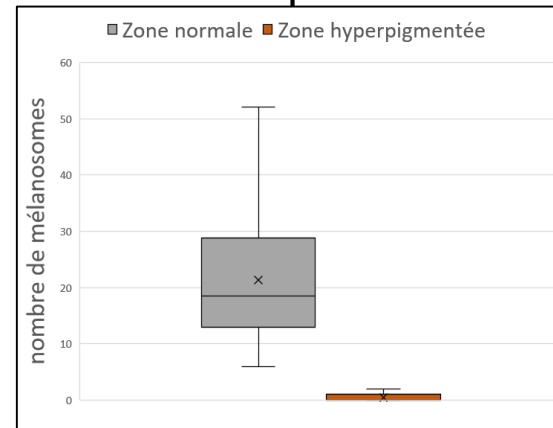
Zone hyperpigmentée



kératinocytes

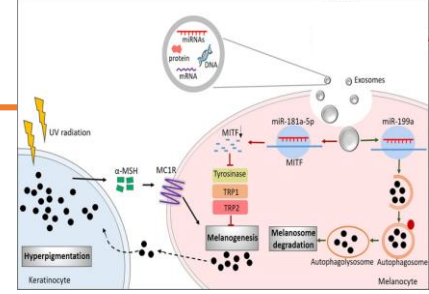


mélanosomes



mélanocyte

- Beaucoup de mélanosomes visibles dans les kératinocytes, présents aussi dans les couches supérieures de l'épiderme
- Mélanocytes remplis de mélanosomes
- Aspect des mélanosomes : larges et isolés (typique des peaux sombres)

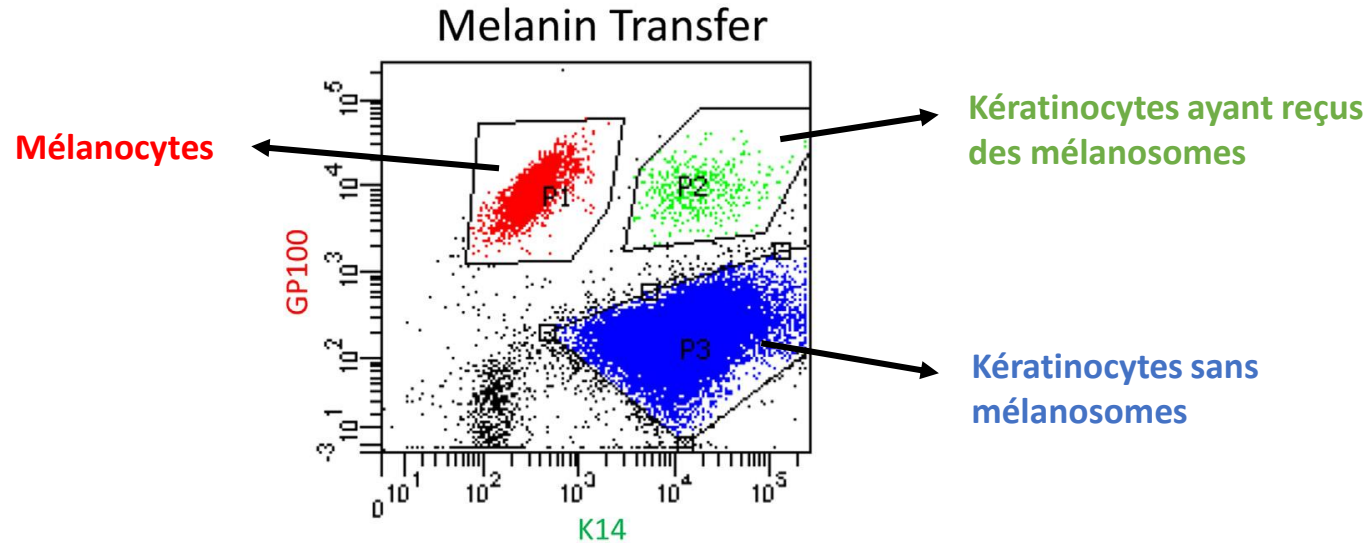


Expériences planifiées liées à la 2^{de} hypothèse

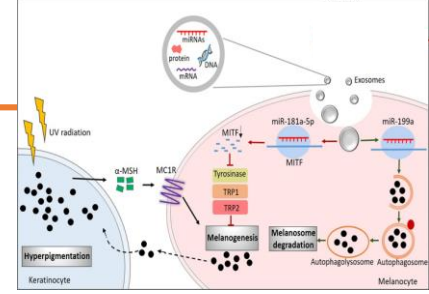
→ Différence de transfert de mélanine entre les HaCaT K5 WT ou mutée et des mélanocytes en culture?

Co-culture HaCaT/Hermes

- Marquage des HaCaT (K14) et des mélanosomes (gp100) et comptages de 3 populations en cytométrie de flux :

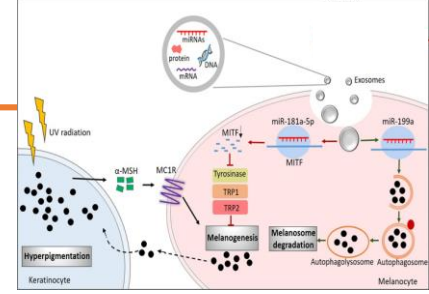


Phua et al, Star protocols 2023



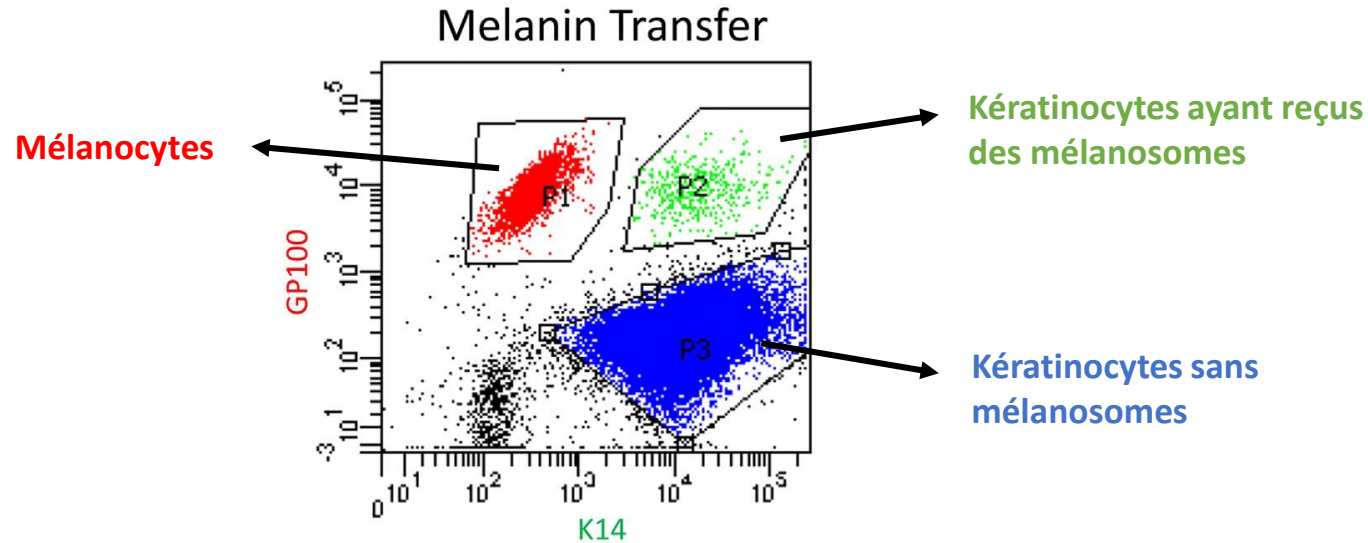
Expériences planifiées liées à la 2^{de} hypothèse

→ Différence de transfert de mélanine entre les HaCaT K5 WT ou mutée et des mélanocytes en culture?



Co-culture HaCaT/Hermes

- Marquage des HaCaT (K14) et des mélanosomes (gp100) et comptages de 3 populations en cytométrie de flux :



Phua et al, Star protocols 2023

- Tri et isolement des mélanocytes vivants en cytométrie de flux (marquage c-kit) et dosage de la mélanine/ observation de l'expression des gènes de la mélanogénèse

→ Protocoles à mettre au point

Expériences planifiées liées à la 2^{de} hypothèse

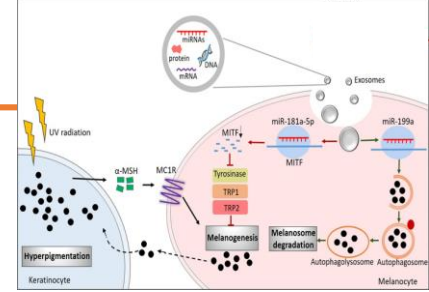
→ Différence dans les sécrétomes des HaCaT K5 WT ou mutée ?

- Analyse des sécrétomes de HaCaT K5 WT, P25L ou D158H par spectrométrie de masse

→ Protocole mis au point, échantillons à préparer et à envoyer à la plateforme

- Analyse des miARN contenus dans les exosomes sécrétés par les HaCaT K5 WT, P25L ou D158H, par RNA sequencing

→ Mise au point des protocoles d'extraction en cours



Prochaines étapes

→ Observation des modifications post-traductionnelles de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse

Prochaines étapes

- Observation des modifications post-traductionnelles de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Analyse de l'interactome de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse

Prochaines étapes

- Observation des modifications post-traductionnelles de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Analyse de l'interactome de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Observation de la mélanogenèse et du transfert de mélanine après co-culture et cytométrie de flux

Prochaines étapes

- Observation des modifications post-traductionnelles de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Analyse de l'interactome de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Observation de la mélanogenèse et du transfert de mélanine après co-culture et cytométrie de flux
- Analyse des sécrétomes des cellules HaCaT K5 WT ou mutée par spectrométrie de masse

Prochaines étapes

- Observation des modifications post-traductionnelles de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Analyse de l'interactome de la kératine 5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Observation de la mélanogenèse et du transfert de mélanine après co-culture et cytométrie de flux
- Analyse des sécrétomes des cellules HaCaT K5 WT ou mutée par spectrométrie de masse
- Mise au point des protocoles d'extraction des miARN exosomaux des cellules HaCaT K5 WT ou mutée pour une analyse en RNA sequencing

Merci pour votre attention !