

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTÉS DE MÉDECINE**

---

ANNÉE 2017

2017 TOU3 1562

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**  
**MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Maëlla SEVERINO FREIRE**

le 12 juillet 2017

**L'extinction du gène *PNPLA1* dans un modèle d'épiderme humain  
reconstruit pour tester une thérapie substitutive dans les  
ichthyoses congénitales et les autres pathologies dermatologiques  
liées à des perturbations des lipides du *stratum corneum***

Directeur de thèse : Pr Juliette MAZEREEUW-HAUTIER

**JURY**

Monsieur le Professeur Guy SERRE

Président

Madame le Professeur Juliette MAZERREUW-HAUTIER

Assesseur

Monsieur le Professeur Patrick CALVAS

Assesseur

Madame le Docteur Nathalie JONCA

Assesseur

Monsieur le Docteur Nicolas CHASSAING

Suppléant



**TABLEAU du PERSONNEL HU**  
**des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> septembre 2016**

**Professeurs Honoraires**

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. ESCAT Jean		
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel		
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques		
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard		

**Professeurs Émérites**

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur SALVAYRE Bernard
Professeur MURAT	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur LOUVET P.	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur Jacques LAGARRIGUE
Professeur CARATERO Claude	
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	
Professeur COSTAGLIOLA Michel	
Professeur ADER Jean-Louis	
Professeur LAZORTHES Yves	
Professeur LARENG Louis	
Professeur JOFFRE Francis	
Professeur BONEU Bernard	
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	
Professeur MAZIERES Bernard	
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	
Professeur SIMON Jacques	
Professeur FRAYSSE Bernard	
Professeur ARBUS Louis	

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépat-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. LOPEZ Raphael	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépat-Gastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAVAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédéric	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MAZIERES Julien	Pneumologie	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépat-Gastro-Entérologie		
<b>P.U. Médecine générale</b>		<b>P.U. Médecine générale</b>	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		<b>P.A Médecine générale</b>	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophthalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLE Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

**M.C.U. - P.H.**

M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
M. MONTOYA Richard	Physiologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BRILLAC Thierry

**M.C.U. - P.H.**

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BISMUTH Michel	Médecine Générale
M. BISMUTH Serge	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves  
 Dr CHICOULAA Bruno  
 Dr IRI-DELAHAYE Motoko  
 Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre  
 Dr ANE Serge  
 Dr BIREBENT Jordan

## **Remerciement :**

Je tiens tout d'abord à remercier mes parents, pour leur soutien au cours de ces longues années d'études, je les remercie d'avoir toujours été présent pour moi et de m'avoir soutenu dans mes choix.

Je pense très fort à ma sœur qui ne peut pas être là mais qui m'encourage de tout son cœur et que j'aime beaucoup.

Au reste de ma famille, qui est éloignée, à ma grand-mère, mes oncles et ma tante, mes cousins et ma cousine, mais qui me soutiennent.

A ma belle-famille, qui m'a soutenue depuis qu'elle me connaît.

A Cyril, mon conjoint, qui est là pour m'épauler, et qui continuera à être là, à mes côtés pour me soutenir. Depuis 3 ans, notre amour est sans faille et j'espère continuera ainsi.

A mon maitre, président du jury :

**Monsieur le Pr Guy SERRE**

**Professeur des Universités (Biologie Cellulaire)**

**Praticien Hospitalier (Biologie Cellulaire)**

Vous m'avez fait un très grand honneur en acceptant d'être mon président de jury. Merci de m'avoir accueilli et de m'avoir donné ma chance au sein de votre équipe au laboratoire de l'UDEAR. Grâce à vous, j'ai appris la rigueur et à aimer la recherche. Ce fut pour moi une belle rencontre et j'espère pouvoir poursuivre dans cette nouvelle voie.

A mon maitre, ma directrice de thèse :

**Madame le Pr Juliette MAZEREEUW-HAUTIER**

**Professeur des Universités de Toulouse (Dermatologie et Vénérologie)**

**Praticien Hospitalier (Dermatologie),**

**Centre de référence des maladies rares de la peau**

Merci Juliette de m'avoir donné le goût d'apprendre et d'explorer d'autres horizons. Tu m'as accueilli avec bienveillance au sein de ton équipe que ce soit à l'hôpital ou au laboratoire. Merci pour ton soutien tout au long de mon internat. Tu as su être là au cours de mon internat pour m'aiguiller et me soutenir. J'ai pu bénéficier de ta rigueur, de ton enseignement et de ton bon sens clinique. Merci pour ta confiance. Nous avons pu travailler ensemble sur beaucoup de projets. J'espère que notre collaboration se poursuivra au-delà de l'internat.

A mon membre du jury :

**Madame le Dr Nathalie JONCA,**

**Maître de Conférences Universitaire (Biologie Cellulaire)**

**Praticien Hospitalier (Biologie Cellulaire)**

**Responsable de l'équipe 1, « barrière cutanée », à l'UDEAR**

Merci de m'avoir appris à aimer la science et la recherche fondamentale, un aspect qui peut, pour nous, interne en médecine, paraître mystérieux et complexe. Merci d'avoir accepté de m'encadrer durant mon année recherche et de ma thèse. J'espère pouvoir poursuivre dans cette voie et continuer à apprendre auprès de vous.

A mon membre du jury :

**Monsieur le Pr Patrick CALVAS**

**Professeur des Universités de Toulouse (Génétique Médicale),**

**Praticien Hospitalier (génétiq ue Médicale)**

Je suis honorée que vous ayez accepté mon invitation pour faire partie de mon jury.

Je vous remercie de l'intérêt que vous portez pour mon travail. C'est une chance pour moi, que vous ayez accepté de juger mon travail.



A mon membre du jury :

**Monsieur le Dr Nicolas CHASSAING**

**Maitre de Conférences Universitaire (Génétique Médicale)**

**Praticien Hospitalier (Génétique Médicale)**

Je vous remercie d'avoir accepté mon invitation. Nous avons eu la chance de pouvoir collaborer ensemble et je vous remercie de m'avoir apporté votre aide à ce moment-là. Merci de juger cette fois ci mon travail de thèse.

A mes aînés, qui ont participé à ma formation :

**Au Pr Carle Paul**, avec qui j'ai beaucoup appris grâce à son investissement dans l'enseignement, son implication clinique. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis.

**Au Pr Nicolas Meyer**, je te remercie pour ton aide et ton enseignement précieux au cours de mon internat.

**Au Dr Cristina Livideanu**, je te remercie de m'avoir prise sous ton épaule au début de mon internat et de m'avoir encadré. Merci de m'avoir donné le goût à la chirurgie et au laser. Je n'oublierai jamais les moments passés ensemble à travailler.

**Au Dr Jean Nougué**, merci de m'avoir transmis votre savoir. Ce fut un réel plaisir de vous avoir connu au cours de mon internat. J'ai pu, à vos côtés, apprendre beaucoup.

**Au Dr Aude Maza**, que j'apprécie beaucoup, avec qui j'ai aimé travailler et j'ai beaucoup appris en pédiatrie.

**Au Dr Serge Boulinguez**, merci d'être là pour m'aider quand il y en a besoin.

**Au Dr Christian Aquilina**, merci de m'avoir encadré au cours de mon semestre en HDJ, j'admire ton dévouement pour les patients et ton implication dans l'enseignement.

**Au Dr Françoise Giordano-Labadie**, merci de m'avoir encadré en HDJ et de m'avoir transmis votre savoir.

**Au Dr Marie Claude Marguery**, grâce à vous j'ai pu découvrir les aspects de la photobiologie.

**Au Dr Rolland Viraben**, avec qui j'ai pu travailler à Albi. Merci de m'avoir transmis vos connaissances.

**Au Dr Isabelle Galera**, que j'ai pu apprendre à connaître en dermato-pédiatrie et avec qui j'ai beaucoup appris.

**Au Dr Marianne Thomas**, qui a su être là pour m'aider en hospitalisation, merci.

**Au Dr Céline Pauwels**, avec qui j'ai appris à m'organiser et à être meilleure.

**Au Dr Isabelle Dreyfus**, merci d'avoir été là au cours de mon semestre en dermato-pédiatrie et de m'avoir fait confiance.

## A mes co-internes :

- De promo :

*Elisabeth*, tu es la première personne que j'ai connue à Toulouse et j'en suis heureuse. Tu as été un pilier pour notre premier stage ensemble en hospitalisation. Tu as su me faire découvrir la joie de vivre à Toulouse. Je te remercie pour les belles années que l'on a vécu ensemble au cours de l'internat et je suis contente de poursuivre notre aventure ensemble en tant que chefs !

*Juliette*, merci pour tous les bons moments que l'on passe ensemble. Tu sais me faire rire, tu apportes de la joie et de la bonne humeur. Je pense beaucoup à nos moments passés ensemble à refaire le monde. Je te remercie d'être présente et je suis heureuse de pouvoir poursuivre un bout de chemin avec toi à Larrey.

- Les plus jeunes :

*Philippine*, merci pour les petits moments passés ensemble à l'internat et en dehors. J'espère que ton aventure Bordelaise t'apportera de belles choses.

*Camille*, avec ton calme tu arrives à nous apaiser et avec tes voyages tu nous as fait rêver. J'espère pouvoir travailler à tes côtés prochainement.

*Chloé*, tu es toujours de bonne humeur et tu gardes le sourire quoiqu'il arrive. Cela fait plaisir. J'espère que ton futur se passera bien pour toi.

*Eline*, ou bébé Eline pour les plus intimes. On a surmonté ensemble des épreuves pas faciles notamment en hospitalisation. Mais j'en garde que des bons souvenirs. Et j'espère que cela va se poursuivre.

*Clothilde B* ou Grande Clot, qui reste de bonne humeur quelque soit les circonstances et qui donne du pep's à son entourage. Je n'oublierai jamais les vidéos de « chats » et le fait que tu as lancé la mode de la bague chat ! Cela restera une « marque de fabrique » des internes de dermatologie de Toulouse.

*Florian*, toujours là pour nous faire rire et nous donner envie de voyager avec ses photos mystères Insta.

*Marie*, qui me fait rire en nous racontant ses histoires anecdotiques.

*Marion F* ou Barbie, la guerrière du laser quest. Merci d'être présente pour nous redonner de la bonne humeur quand il faut.

*Marion G*, la fashion victime avec ces chaussures, ☺. Merci pour ta bonne humeur au quotidien, travailler avec toi est un plaisir.

*Guillemette*, merci pour les bons moments passés sur Toulouse.

*Clothilde G* ou petite clot, merci beaucoup pour ton aide et ton soutien quand j'en avais besoin.

Et au plus jeunes, *Timila*, *Aurore* et *Manon* que je ne connais pas encore très bien mais avec qui, je sais, j'aurais beaucoup de plaisir à travailler.

A mes futurs collègues :

*Perrine*, merci de me soutenir quand ça ne va pas et de m'aider quand j'en ai besoin. On ne se connaît pas depuis très longtemps mais je suis heureuse d'avoir appris à te connaître.

*Claire*, que j'ai connue en tant qu'interne puis maintenant en tant que chef. Ça a toujours été un plaisir de travailler à tes côtés et je te souhaite tout pleins de bonheur pour la suite.

*Marie Lina*, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler en hospitalisation et qui me rassure quand j'en ai besoin.

*Marie T*, on ne se connaît pas encore très bien mais j'espère qu'une belle amitié se développera.

A tout le personnel para médical avec qui j'ai travaillé :

*Florence*, sans qui l'hospitalisation n'aurait pas pu tourner.

Une pensée aux infirmières *Pauline*, *Emilie*, *Marion*, *Elodie*, *Lucie*, *Céline*, *Anne-Marie*, *Françoise*, *Marie-Christine*. Merci d'être là pour m'épauler quand il faut.

Merci aux secrétaires *Fred*, *Cathy*, *Sandrine*, *Aurélie*, *Françoise* d'être là pour la prise de rdv, changement de planning....

Merci aux aides-soignantes de m'avoir aidée quand il y avait besoin.

Et à tous les autres que je n'ai pas citer.

A toute l'équipe de L'UDEAR :

Merci à tout le monde de m'avoir intégré au sein de votre unité.

Je remercie tout particulièrement *Mélanie* pour sa « très grande » aide depuis que je suis arrivée. Heureusement que tu étais là pour m'aiguiller au début.

Je remercie tout le groupe 1 (*Marie*, *Sarra*, *Sabrina*, *Mickael*) avec qui j'ai passé de très bon moment dans l'open space.

J'ai été également ravie de rencontrer les membres des autres équipes (*Michel*, *Corinne*, *Marie-Claire* et tous les autres) avec qui j'ai pu partager et apprendre de leurs savoirs.

A mes amis :

*Laetitia*, une amitié qui est née dans le service de dermatologie et qui se poursuit depuis. Dommage que tu sois partie ! ☺

*Lauriane*, avec qui j'ai pu prendre des pauses thé et papotage au 6<sup>e</sup>.

*Marc*, un inconditionnel fan d'arsenal et le meilleur joueur de fléchettes de Toulouse.

*Sandrine* et *Gildas*, notre couple emblématique avec qui on passe de supers moments. Merci de nous faire partager cela.

*Pitchou*, le DJ de toutes nos soirées, qui nous a fait voyager au sein d'un monde peu connu.

*Doudoux*, pour ces moments inoubliables et on sait pourquoi, ☺

*Ludz*, notre grand footballeur, souvent blessé malheureusement et avec qui on passe de bels soirées.

*Kelly*, que j'ai connu en dermatologie et qui depuis reste mon amie. J'espère que notre amitié ne s'éteindra jamais.

*Lousiane*, avec qui on passe également de bonnes soirées.

*Julien*, pour sa joie de vivre et sa bonne humeur.

*Carine*, *Coralie* et *Emilie* avec qui je partage des moments girly et avec qui je garde de beaux souvenirs.

*Cécile*, qui m'a fait passer de sacrée soirée à Toulouse et grâce à qui j'ai pu connaître Cyril.

*Karine*, ma mascotte de Montaubau, toujours présente pour m'apporter ton aide et je t'en remercie.

*Pauline*, *Flavien* et *Henri*, avec qui j'ai partagé de « douloureux » moments à Lyon.

Et a tout ce que je n'ai pas cités, parce que vous êtes nombreux, j'ai une pensée pour vous, parce que grâce à vous tous, j'ai passé de supers moments et je garde que de bons souvenirs des moments passés ensemble.

## *Serment d'Hippocrate*

*Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples,  
je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale,  
de l'honneur et de la probité.*

*Je pratiquerai scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades,  
mes confrères et la société.*

## Table des matières

Liste des abréviations .....	15
INTRODUCTION .....	16
MATERIELS ET METHODES .....	19
RESULTATS .....	26
1. L'extinction du gène <i>PNPLA1</i> dans les EHRs altère la morphologie de l'épiderme .....	26
2. L'extinction du gène <i>PNPLA1</i> dans les EHRs affecte partiellement la différenciation terminale des kératinocytes .....	27
3. L'extinction de <i>PNPLA1</i> affecte la structure du <i>stratum corneum</i> , induit un défaut de biogenèse des corps lamellaires et une réduction de la taille des grains de kératohyaline .....	29
4. L'extinction du gène <i>PNPLA1</i> affecte l'organisation des lipides extracellulaires du <i>stratum corneum</i> et la maturation lipidique des enveloppes cornées .....	30
5. L'extinction du gène <i>PNPLA1</i> altère la fonction barrière de l'épiderme .....	32
6. L'extinction du gène <i>PNPLA1</i> dans les EHRs affecte la synthèse des $\omega$ -O-acylcéramides .....	32
7. Mise en place de traitements topiques contenant les $\omega$ -O-acylCer sur les EHRs dans le but de restaurer l'imperméabilité épidermique .....	35
DISCUSSION.....	37
CONCLUSION.....	41
Remerciements .....	42
Références .....	43
Tables et Figures supplémentaires .....	45
Annexes.....	52

## Liste des abréviations

- PNPLA1 : Patatin-like phospholipase domain-containing protein 1
- ARCI : ichtyoses congénitales autosomiques récessives
- $\omega$ -O-acylCer :  $\omega$ -O-acylcéramides
- SC : stratum corneum
- ECL : enveloppe cornée lipidique
- EC : enveloppe cornée
- EHR : épiderme humain reconstruit
- shARN: small-hairpin RNA
- RT : transcription inverse
- GK : grains de kératohyaline
- CLs : corps lamellaires



Le gène « *patatin-like phospholipase domain-containing protein 1* » ou *PNPLA1* est l'un des douze gènes impliqués dans les ichtyoses congénitales autosomiques récessives ou ARCI. Le terme ARCI fait référence à un groupe hétérogène des maladies Mendéliennes de la cornification rare. Les ARCI incluent 3 types majeurs (l'ichtyose lamellaire, l'érythrodermie congénitale ichtyosiforme et l'ichtyose harlequin) et 3 types mineurs (le bébé collodion à guérison spontanée, la forme acrale de bébé collodion à guérison spontanée et l'ichtyose en maillot de bain) (1). La prévalence des ARCI est estimée à moins de 1/100.000 naissances (2). A la naissance, la présentation clinique la plus commune des ARCI est le "bébé collodion" puis l'évolution clinique peut être variable tant sur le plan cutané que sur la sévérité des lésions. Les anomalies n'atteignent que la peau et plus de la moitié des patients présentent des symptômes invalidants. A ce jour, il n'existe pas de traitements curatifs mais seulement symptomatiques. Les symptômes peuvent être améliorés par l'application d'émollients et, pour certains patients qui ont une atteinte cutanée sévère, la prescription de rétinoïdes oraux peut être discutée (3).

Grall et coll. sont les premiers à avoir démontré que *PNPLA1* était un gène causal d'ARCI chez l'Homme grâce à l'identification, dans un premier temps, de mutations *PNPLA1* dans un modèle spontanée d'ARCI chez le chien golden retriever. Ils ont ensuite identifié deux mutations différentes du gène *PNPLA1* dans deux familles dont certains membres étaient atteints d'ARCI (4).

Depuis, plusieurs auteurs ont rapporté des mutations du gène *PNPLA1* chez des patients atteints d'ARCI (4-12). Aujourd'hui, ce gène serait muté chez 3% des patients atteints de ce type d'ichtyose (10).

*PNPLA1* est un des neuf membres de la famille des PNPLA, qui sont caractérisés par la présence d'un domaine « patatin » hautement conservé (13).

Diverses activités lipolytiques et acyltransférases leur ont été attribuées, leur conférant un rôle clé dans le métabolisme lipidique (13-14). En 2007, Toulza et coll. ont montré que *PNPLA1* était fortement exprimé dans la couche granuleuse de l'épiderme (15). Après avoir été longtemps négligé, la caractérisation fonctionnelle de *PNPLA1* a été récemment établie chez l'Homme et la souris. En effet, des travaux menés au laboratoire ainsi que par deux autres équipes ont montré que *PNPLA1* était indispensable à la dernière étape de synthèse des  $\omega$ -O-acylcéramides épidermiques ( $\omega$ -O-acylCer) grâce à une activité transacylase (4, 12 : **cf annexe**, 16-18).

L' $\omega$ -O-acylCer est un céramide spécifique de l'épiderme, composé de chaînes N-acyl ultra-longues (habituellement plus de 30 et 32 carbones) avec un groupe  $\omega$ -hydroxyl estérifié par l'acide linoléique (19). Ces lipides représentent 7 à 12% (moyenne 9%) de l'ensemble des céramides de la couche cornée. Les  $\omega$ -O-acylCer jouent un rôle central dans la formation et l'homéostasie de la perméabilité épidermique. Ils sont essentiels à l'organisation des lipides du *stratum corneum*. En effet, ce sont des précurseurs des lipides formant l'enveloppe cornée lipidique (ECL). L'ECL est liée à la partie protéique de l'enveloppe cornée (EC) qui constitue une véritable « coque » rigide et résistante délimitant les cornéocytes. Les  $\omega$ -O-acylCer participent également à l'agencement caractéristique et remarquablement organisé des lipides extracellulaires en « lamelles lipidiques » (ou lamellae) dans la matrice intercornéocytaire (20).

Par conséquent, en l'absence de *PNPLA1*, les  $\omega$ -O-acylCer ne sont plus synthétisés, ce qui conduit à la désorganisation de la matrice lipidique intercornéocytaire et à un défaut de formation de l'ECL, entraînant une altération majeure de la perméabilité épidermique (4, 12, 16, 17).

A ce jour, il n'existe aucune thérapie de substitution ou essai clinique chez les patients atteints d'ARCI. Fait intéressant, Grond et coll. (16) ont montré que l'application topique de lipides purifiés à partir d'épiderme de souris sauvages sur la peau de souriceaux déficients en *Pnpla1* (knockout *Pnpla1*) permettait de rétablir la formation de l'ECL des cornéocytes. Ceci indique que l'épiderme knockout *Pnpla1* exprime toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique nécessaires à la formation des ECL en présence d'  $\omega$ -O-acylCer exogène.

Les souris knockout *Pnpla1* ne sont pas un modèle approprié pour le développement pharmacologique de nouveaux traitements topiques car elles meurent précocement après la naissance d'une importante perte en eau trans-épidermique secondaire au défaut de perméabilité (12, 16, 17). Pour y remédier, nous avons choisi d'induire une extinction de l'expression du gène *PNPLA1* dans un modèle d'épiderme humain reconstruit (EHR) en utilisant la technologie des « small-hairpin » ARN (shARN). Ces EHRs shPNPLA1 s'avèrent être des outils intéressants pour tester l'efficacité et la tolérance des traitements locaux. Notre objectif est d'appliquer de l' $\omega$ -O-acylCer sur les EHRs shPNPLA1 et d'évaluer les conséquences sur la perméabilité épidermique. Ce traitement de substitution pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante pour les patients atteints d'ARCI mutés *PNPLA1*.

Ce travail, conduit *in vitro*, constitue donc une première étape pour déterminer si cette stratégie de substitution peut être bénéfique pour les patients mutés *PNPLA1*.

**- Lentivirus shARN**

Pour induire une extinction du gène *PNPLA1* dans les kératinocytes primaires, nous avons utilisé des lentivirus MISSION pLKO. 1-puro vector-based contenant un gène de résistance à la puromycine et un shARN sous le promoteur U6 et le promoteur hPGK respectivement (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Deux shARNs ciblant *PNPLA1* (shPNPLA1) étaient testés (shPNPLA1a (séquence: position nucléotidique 1475-1495 sur la séquence de l'ARNm, NCBI Référence Séquence: NM\_0011457171) 5'-CCGGCCTCTGGTTCATGTGAAGGAACTCGAGTTCCTTCACATGAACCAGAGGTT TTTG-3'; shPNPLA1b (séquence: position nucléotidique 1934-1954 sur la séquence de l'ARNm, NCBI Référence Séquence: NM\_0011457171) 5'-CCGGCCGTCAGCAAGCCTTATGTAAGTTCGAGTTACATAAGGCTTGCTGACGGTT TTTG-3'. Un shARN qui ne ciblait aucun gène humain connu (shC) était utilisé comme contrôle (5' -CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC-3').

**- Culture de kératinocyte, transfection et épiderme humain reconstruit**

Les kératinocytes humains primaires étaient obtenus à partir de peau de prépuce après avoir eu le consentement écrit et signé des parents. Afin d'induire la prolifération, les kératinocytes étaient mis dans du milieu de culture Dermalife (CellSystems, Troisdorf, Germany) en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les kératinocytes étaient transfectés avec des lentivirus contenant soit shPNPLA1 soit shC avec un taux d'infection à 5 particules virales par cellules en présence de 4 µg/ml de protamine sulfate. Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture était remplacé par du Dermalife contenant de la puromycine pour la sélection des cellules infectées. Quand les kératinocytes recouvraient 70% de la flasque, ils ont été utilisés pour produire les EHR sur les filtres en polycarbonate comme décrit précédemment

(21). Pour cela, 300.000 kératinocytes primaires humain ont été repris dans du milieu Epilife froid (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) contenant 1.5 mmol/L de calcium et ont été ensuiteensemencés dans des inserts de culture en polycarbonate (aire de 0.63 cm<sup>2</sup> avec des pores de 0.4 mm de diamètre; Merck Millipore, Billerica, MA). Après 24 heures d'incubation à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules étaient exposées en interface air-liquide (jour 0) et les EHR étaient mis en incubation à 37°C avec une humidité relative de 50% contenant 5% de CO<sub>2</sub>. 50 mg/mL vitamin C (Sigma-Aldrich) et 10 ng/mL de facteur de croissance des kératinocytes (Sigma-Aldrich) étaient ajoutés dans le milieu de culture. Le milieu de culture était renouvelé toutes les 48 heures jusqu'à 11 jours après l'interface air-liquide. Les expériences ont été effectuées avec des kératinocytes humains normaux provenant d'un individu.

#### - **Immunohistochimie-Anticorps**

A 11 jours, les échantillons d'EHRs étaient fixés dans du formaldéhyde à 4% contenant du tampon et de la paraffine intégrée. Après déparaffinage et hydratation, les échantillons étaient bloqués avec du tampon phosphate salin contenant 2% d'albumine de sérum bovin et 0.05% Tween-20. Puis ils étaient incubés avec les anticorps primaires (Table supplémentaire S1). Concernant l'immunocoloration de CDSN, une étape supplémentaire de démasquage a été réalisée. Après incubation avec l'anticorps secondaire correspondant dilué à 1:1000 (Alexa Fluor 555 or 488 anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 555 or 488 anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555 anti-goat IgG, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), les noyaux étaient colorés avec du 40,60-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich). Le marquage des lipides (Oil red, rouge de Nile et anticorps anti-TGM1) ont été réalisés sur des cryocoupes d'EHR.

Les lames ont été montées au Mowiol et elles ont été observées avec le microscope Nikon Eclipse 80i fluorescence équipé d'une caméra digital Nikon DXM 1200C et d'un logiciel d'analyse d'image NIS (Nikon, Tokyo, Japan).

- **Extraction des protéines épidermiques et western blot**

A 11 jours, les EHRs ont été lysés dans 300 µl de tampon Laemmli et bouilli deux fois. L'ensemble des protéines extrait de l'épiderme a été séparé par SDS-PAGE et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires (listés dans Table supplémentaire 1) puis avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) (Life Technologies). Les produits de réaction ont été détectés par chimioluminescence avec le kit ECL (Pierce/ Thermo Scientific, Rockford, IL). Les quantités de protéines ont été normalisées par détection de l'ACTINE, GAPDH ou YWAZ.

- **Extraction ARN et RT-PCR quantitative en temps réel**

L'ARN total de chaque EHR a été extrait par RNeasy (Qiagen) et la quantité d'ARN a été mesurée avec le Nanodrop 1000 (ThermoScientific). La transcription inverse a été effectuée en utilisant le kit Superscript III 1st strand cDNA Synthesis (Thermo Fischer Scientific). Les tests d'amplification ont été réalisés avec le 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA), en utilisant du Sybr quantitative PCR SuperMix W/ROX (Invitrogen Life Technologies) et des amorces spécifiques (Table supplémentaire S2). La fluorescence a été quantifiée en tant que valeurs Ct (seuil). Les échantillons ont été analysés en triplicats (avec une différence entre les trois valeurs Ct < 0,3). Les niveaux relatifs d'expression des gènes entre les échantillons ont été déterminés à l'aide de l'expression du gène ménage *GAPDH* pour la normalisation.

#### - **Test de perméabilité au Lucifer yellow**

A 11 jours, 500µl de 1 mg de Lucifer yellow (Sigma-Aldrich, L0259) a été ajouté sur le *stratum corneum* des EHRs. Après une incubation à 37°C pendant 2, 4, 6, 12 et 24 heures, la concentration du colorant dans le milieu de culture a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence, Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific, Waltham, MA) avec une lumière d'excitation et d'émission à 425 et 550 nm, respectivement.

#### - **Microscopie électronique par transmission**

Chaque EHR a été coupé en petit fragment de 4mm<sup>2</sup>. Ils ont d'abord été fixés dans du glutaraldéhyde à 2% en tampon Cacodylate (0.1 M, pH 7.2, EMS, Hatfield, PA) pendant 24 h à 4°C, puis secondairement fixés au tetroxide d'osmium 1% en tampon cacodylate (Cacodylate 0.1 M, OsO<sub>4</sub> 1%, EMS) à 4°C.

Les échantillons ont ensuite été déshydratés par plusieurs lavage à concentration différentes en acétone et suivi d'un enrobage à la résine Spurr's. Après 48 heures de polymérisation à 60°C, des coupes ultra fines (80 nm épaisseur) ont été montées sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone. Les coupes ont été colorées par le contrastant Uranylless (Delta Microscopies) et au citrate de plomb. Les grilles ont été examinées au microscope électronique en transmission (Jeol JEM-1400, JEOL Inc) à 80 kV. Les images ont été acquises en utilisant une caméra digitale (Gatan Orius, Gatan Inc).

#### - **Purification et analyse des enveloppes cornées**

Les enveloppes cornées (ECs) étaient isolées dans du tampon RLT (Qiagen, RNeasy Kits) et du β-mercaptoethanol (10 µl de β -mercaptoethanol pour 1 ml de tampon RLT) puis vortexées pendant 1 minute. Les ECs ont été chauffées à 95°C

pendant 10 minutes avec agitation, puis centrifugées à 12,000 g et resuspendues dans du tampon contenant 2% SDS. Cette procédure a été répétée trois fois. Les ECs purifiées ont été nettoyées deux fois dans du tampon contenant 0.2% SDS, puis resuspendues dans ce même tampon et stockées à 4 °C.

Afin d'évaluer la maturité des ECs, des concentrations appropriées ECs en suspension ont été déposées sur une lame et séchées à l'air. Les lames ont été fixées dans l'acétone à -20° pendant 10 minutes puis hydratées en tampon phosphate salin. L'anticorps primaire puis l'anticorps secondaire ont été incubés chacun successivement pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, les ECs ont été colorées avec une solution Rouge Nile (1 µg/ml) pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames ont été montées au Mowiol. Les images ont été prises avec le microscope à fluorescence Nikon eclipse 80i microscope équipé d'une caméra digitale Nikon DXM 1200C et du logiciel d'analyse d'image NIS.

- **Extraction des lipides, chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et analyse des sphingolipides**

Pour les expériences, les chercheurs étaient en simple aveugle concernant l'identité des échantillons. Le tissu séché a été extrait trois fois avec des mélanges de chloroforme/méthanol/eau. Ensuite, le culot résiduel a été, de nouveau, lavé 3 fois avec du méthanol et deux fois avec du méthanol à 95% avant que des lipides liés aux protéines ne soient libérés avec du KOH 1 M dans du méthanol à 95%, à 60 ° C, en 2 heures et ensuite neutralisés avec de l'acide acétique. Les extraits groupés ont été dessalés avec des cartouches RP-18 et des aliquots correspondant à 0,1 mg de poids sec de l'épiderme ont été mélangés avec des lipides standards pour l'analyse par LC-MS/MS en utilisant les instruments Aquity I-class UPLC et Xevo TQ-S "triple-



quadrupole”, tous deux de Waters. Les lipides ont été séparés sur une colonne CSH-C18 de 100 mm (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm, Waters) en utilisant un gradient entre 57% de solvant A (50% d'eau, 50% de méthanol) et 95% de solvant B (99% d'isopropanol, 1% de méthanol), contenant tous deux 10 mM de formiate d'ammonium et 0,1% d'acide formique en tant qu'additifs (Tableau supplémentaire S3).

Les lipides analysés sur Figure 4-C ont été listés dans la table supplémentaire S4 et ont été détectés par « multi-reaction monitoring » (MRM). Les normes internes suivantes ont été utilisées pour la quantification: Cer(d18:1;14:0)\*, Cer(d18:1;19:0)\*, et Cer(d18:1;31:0)\* ont été utilisés pour quantifier Cer[NS]-, [AS]-, [OS]- et [POS]-. GlcCer(d18:1;14:0)\*, GlcCer(d18:1;19:0)\*, GlcCer(d18:1;25:0)\*, et GlcCer(d18:1;31:0)\* ont été utilisés pour quantifier GlcCer [NS]-, [AS]-, et [OS]-. SM (d18:1;12:0) de Avanti Polar lipids, SM(d18:1;17:0) de Avanti Polar lipids, SM(d18:1;10:0-pyrene) de Sigma Aldrich (N-(10-[1-pyrene]decanoyl) sphingomyelin, P-4275) et SM(d18:1;31:0)\* ont été utilisés pour quantifier SM[NS]-, [AS]-, et [OS]-. Pour ces sphingolipides, une courbe d'étalonnage a été calculée à partir des normes internes pour chaque échantillon dans Microsoft-Excel [fonction “VARIATION”]. Pour tenir compte des changements potentiels d'intensités qui sont dues à l'augmentation du ratio m/z des ions sphingolipides. Cer [EOP]- (d18:1;h32:0;18:2) a été utilisé pour quantifier Cer [EOS]-and GlcCer [EOS]-. Pour la quantification, on a pris en compte un facteur de 0,11 résultant du rapport d'intensité des concentrations égales de norme interne Cer [EOP]- (d18:1;h32:0;18:2) à un standard externe Cer [EOS]- (d18:1;h32:0;18:2), toutes deux publiées précédemment (22). Pour la quantification des GlcCer [EOS]-, le ratio d'intensité des normes internes Cer [NS]-sans GlcCer [NS]-(0.4) a également été pris en compte. Pour déterminer le changement de Cer [EOS]- dans les échantillons des EHR, Cer [1-O-ENS]- (18:1;d18:1;17:0) a été utilisé

comme norme interne. \*: Les normes internes marquées avec \* ont été synthétisées précédemment (23).

- **Application topiques d' $\omega$ -O-acylCer sur les EHRs**

Omega-O-acylCer était dissous dans de l'éthanol seul ou dans un mélange d'éthanol et de propylène glycol (30/70%) à la concentration de 5 $\mu$ g/ml puis soniqués. A partir de 4 jours, les lipides dissous dans leur véhicule ou le véhicule seul ont été appliqués sur les EHRs, toutes les 48 heures. L'impact sur la perméabilité cutanée a été analysé par le test au Lucifer yellow à 2, 4, 6, 12 et 24 heures, et complété par l'analyse histologique de ces EHRs.

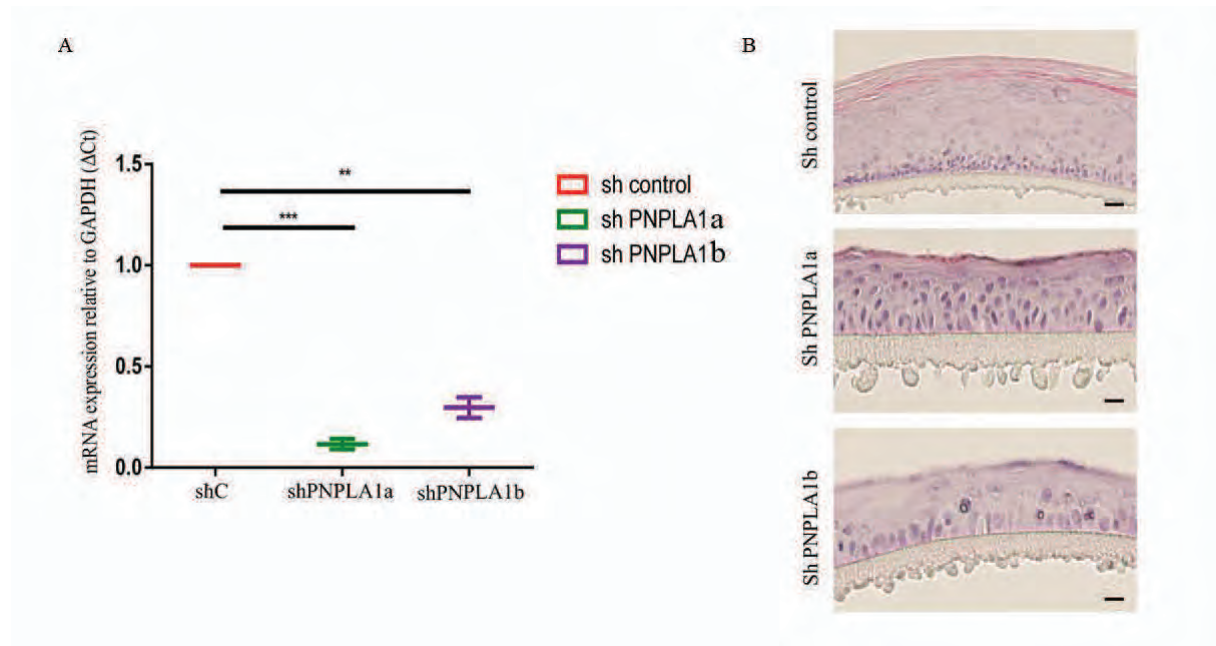
- **Analyse statistique**

Toutes les données ont été représentées par une moyenne +/- un écart-type. Les différences significatives ont été déterminées avec le test de Student. La valeur-P <0.05 (\*) ou <0.01 (\*\*) était considéré comme être statistiquement significative.

## 1. L'extinction du gène *PNPLA1* dans les EHRs altère la morphologie de l'épiderme

L'extinction du gène *PNPLA1* a été réalisée en utilisant des ARN interférents dans des kératinocytes humains normaux primaires. Elle était de 90 et 70% en utilisant les shPNPLA1a et shPNPLA1b par rapport au shARN contrôle (shC), respectivement (Figure 1-A).

Des épidermes entièrement différenciés ont été obtenus après 11 jours de culture avec les deux shPNPLA1 et le shC. Leurs morphologies ont été analysées par examen histologique après coloration hématoxyline-éosine. L'EHR shC était similaire à un épiderme humain normal. Au contraire, les EHRs obtenus avec les shPNPLA1a et shPNPLA1b étaient plus mince avec une réduction du nombre des couches de cellules vivantes. On observait également dans les EHRs shPNPLA1 des vacuoles périnucléaires dans les couches de kératinocytes vivants ainsi qu'un SC moins épais associé à un aspect plus compact (Figure 1-B).



**Figure 1 : Diminution de l'expression de *PNPLA1* et altération de la morphologie des EHRs produits à partir de kératinocytes shPNPLA1.** (A) Analyse de l'expression du gène *PNPLA1* par RT-qPCR des EHRs obtenus à partir des kératinocytes transfectés par shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. Les barres d'erreurs correspondent au calcul des écarts types pour deux expériences de transfection indépendantes, chaque analyse de qPCR a été réalisée en triplicats. (B) Analyse

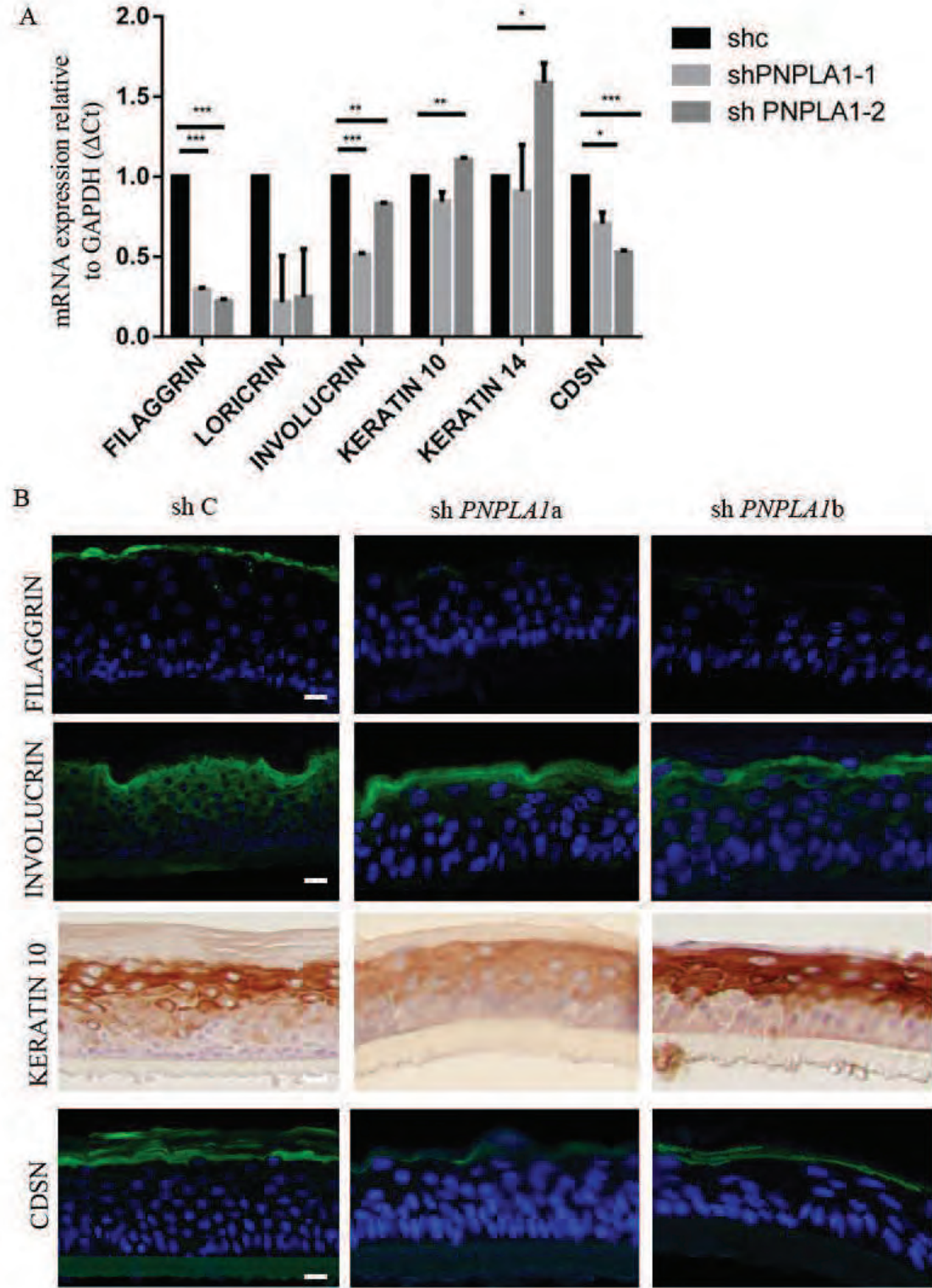
histologique par coloration à l'hématoxyline-éosine des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. La représentation d'une des deux expériences est montrée. Echelle = 10 µm.

## **2. L'extinction du gène *PNPLA1* dans les EHRs affecte partiellement la différenciation terminale des kératinocytes**

Pour étudier la différenciation des kératinocytes dans les EHRs, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression d'un panel de gènes exprimés dans les différentes couches de l'épiderme (Figure 2-A). Une diminution significative de l'expression des gènes *FLG*, *INV* et *CDSN* a été observée ( $p < 0.05$ ) dans les EHRs shPNPLA1 par rapport aux EHRs shC. On a également noté une tendance à la diminution du gène *LOR* dans les EHRs shPNPLA1 en comparaison aux EHRs shC alors que l'expression du gène *KRT10* était inchangée. L'expression du gène *KRT14*, caractéristique de la couche basale de l'épiderme, était similaire entre les EHRs shC et les EHRs shPNPLA1. En accord avec ces résultats, l'analyse immunohistologique de Ki67, un marqueur de prolifération, a montré que l'extinction du gène *PNPLA1* n'affectait pas la prolifération des kératinocytes basaux (données non montrées).

L'expression de plusieurs gènes de différenciation tardive de l'épiderme a également été évaluée au niveau protéique par immunoblot et les bandes détectées ont été quantifiées pour la cornéodesmosine et la (pro)filaggrine (Figure S1). La quantité totale de profilaggrine, des formes intermédiaires et matures de filaggrine, de loricrine, de cornéodesmosine et d'involucrine, n'a pas été modifiée dans les deux EHRs shPNPLA1 par rapport à l'EHR shC. Quelques-uns de ces marqueurs de différenciation ont aussi été analysés par coloration immunohistologique (Figure 2-B). L'involucrine et la kératine 10 ont montré un immunomarquage similaire au niveau des couches suprabasales dans les EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. En revanche, nous avons noté une nette diminution de l'intensité de marquage en immunofluorescence de la cornéodesmosine et de la profilaggrine dans la couche granuleuse des EHRs des deux shPNPLA1. Il est intéressant de noter que la

distribution de la cornéodesmosine était modifiée, avec une diminution du marquage péricellulaire. Ceci était conforme à la fragilité du SC comme nous avons pu le remarquer lors de la manipulation des EHRs shPNPLA1. Les grains de kératohyaline (KG) où la profilaggrine est stockée, étaient de taille réduite (voir la section suivante).





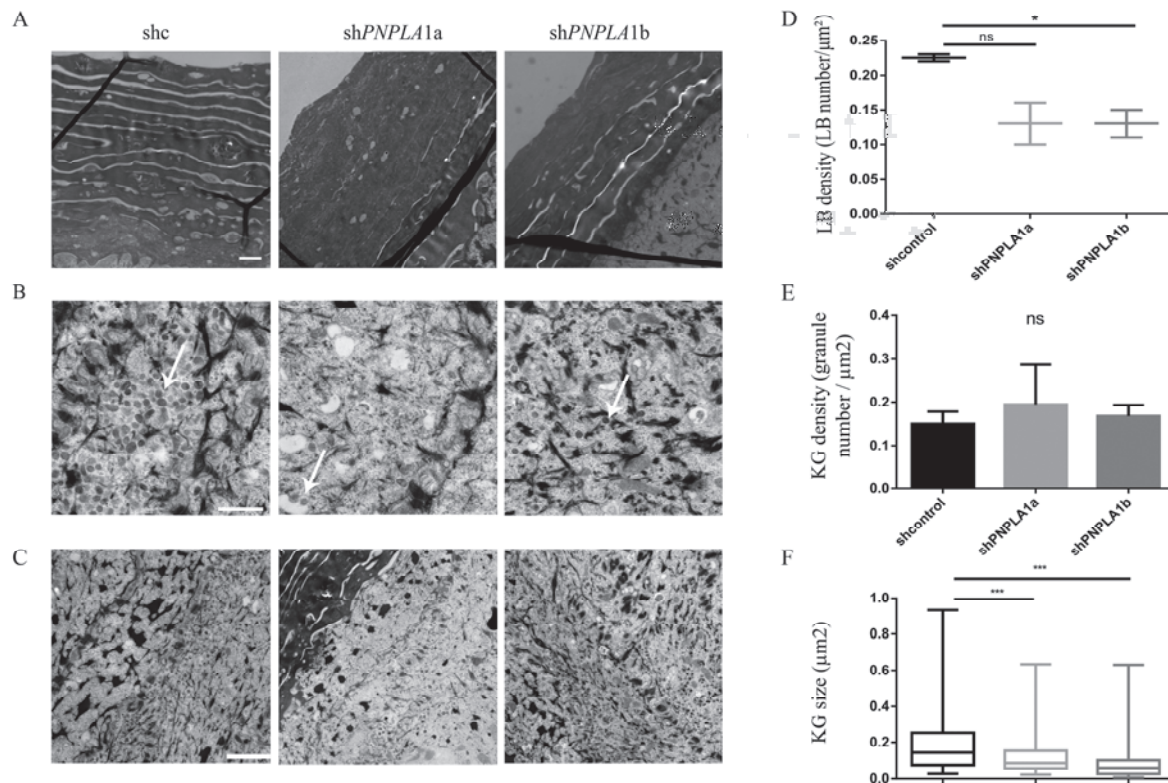
**Figure 2 : Impact de l'extinction du gène *PNPLA1* sur l'expression des gènes codant pour des marqueurs de différenciation terminale de l'épiderme.** (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *FILAGGRINE*, *LORICRINE*, *INVOLUCRINE*, *KERATINE 10*, *KERATINE 14* et *CORNEODESMOSINE (CDSN)* des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. P-value <0.05 (\*) ou <0.01 (\*\*/\*\*\*). (B) Analyse par immunofluorescence ou immunohistochimie de coupes des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b en utilisant des anticorps anti- (pro)filaggrine, involucrine, keratine 10 et cornéodesmosine. Echelle = 10 µm

### **3. L'extinction de *PNPLA1* affecte la structure du *stratum corneum*, induit un défaut de biogenèse des corps lamellaires et une réduction de la taille des grains de kératohyaline**

L'analyse en microscopie électronique à transmission des EHRs shC objective un SC communément organisé avec des espaces intercornéocytaires réguliers. Les composants structuraux typiques du SC et de la couche granuleuse des EHRs shC étaient semblables à ceux de la peau humaine normale, incluant des cornéodesmosomes, des desmosomes, des GK et des corps lamellaires (CLs). L'examen ultrastructural des EHRs shPNPLA1, en comparaison aux EHRs shC, a montré un SC plus mince et plus compact avec une réduction substantielle des espaces intercornéocytaires (Figure 3-A). Ceci était plus prononcé pour les EHRs shPNPLA1a. Les cornéodesmosomes ne semblaient pas être modifiés (données non représentées). Ces résultats obtenus avec les EHRs shPNPLA1 sont semblables aux anomalies du SC déjà rapportés chez l'Homme et la souris déficients pour *PNPLA1/Pnpla1*.

Comme les CLs sont importants dans le métabolisme lipidique, nous avons analysé leur morphologie et leur densité dans les trois assises les plus externes de la couche granuleuse. Nous n'avons pas observé de différence significative sur le plan morphologique des CLs entre les EHRs shC et shPNPLA1 (Figure 3-B). Cependant leur densité est apparue plus faible dans les EHRs shPNPLA1a et shPNPLA1b que dans les EHRs shC. Cela a été confirmé par des mesures quantitatives des CLs faites à partir de photographies réalisées aléatoirement ( $p < 0,01$  : EHR shPNPLA1b, tendance à une diminution : EHR shPNPLA1a) (Figure 3-D).

Enfin, la microscopie électronique a révélé une réduction spécifique de la taille des GKs dans les EHRs shPNPLA1 ( $p < 0,01$ ) par rapport aux EHRs shC, alors que leur densité n'était pas modifiée (Figure 3-C, E et F).



**Figure 3 : L'extinction du gène *PNPLA1* modifie la morphologie du *stratum corneum* (SC), diminue la densité des corps lamellaires (CLs) et la taille des grains de kératohyaline (GK).** (A-C) Analyse ultrastructurale en microscopie électronique à transmission du SC (A), des CLs (B) et des GKs (C) des EHRs shC, shPNPLA1a and shPNPLA1b. On note un aspect plus compact avec une diminution des espaces intercornéocytaires du SC dans les EHRs shPNPLA1a et b par rapport au EHR shC, ainsi qu'une densité réduite des CLs (flèches blanches) et une réduction de taille des GKs dans le cytosol des kératinocytes granuleux des EHRs des deux shPNPLA1 par rapport au EHR shC. Echelle = 1  $\mu\text{m}$ . Pour chaque EHR, des coupes ultrafines ont été examinées à partir de deux expériences indépendantes. (D) Quantification de la densité des CLs dans le cytoplasme des trois assises de la couche granuleuse des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. La quantification a été réalisée sur 15 photographies faites de façon aléatoire. La densité des CLs a été définie par le rapport du nombre de CLs sur l'aire du cytoplasme (en  $\text{mm}^2$ ). Les barres d'erreurs représentent le calcul des écarts types, test de Student non apparié, P-value  $< 0.05$  (\*). (E, F) L'histogramme montre la densité (E) et la taille (F) des GKs dans les trois assises de la couche granuleuse des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. La quantification a été réalisée sur 10 photographies faites de façon aléatoire. Les barres d'erreurs représentent le calcul des écarts types, test de Student non apparié, P-value  $< 0.05$  (\*) et P-value  $< 0.01$  (\*\*).

#### 4. L'extinction du gène *PNPLA1* affecte l'organisation des lipides extracellulaires du *stratum corneum* et la maturation lipidique des enveloppes cornées

Nous avons analysé la distribution des lipides dans l'épiderme par coloration histologique des lipides à l'Oil Red O (Figure 4-A). Nous avons visualisé de nombreux points dans les espaces intercornéocytaires des EHRs shPNPLA1a et shPNPLA1b, qui n'ont pas été observés dans le SC des EHRs shC. Cette accumulation inhabituelle de lipides, semblable à des perles, était compatible avec les observations en microscopie électronique à transmission, ce qui suggère une désorganisation des lipides intercornéocytaires du SC des EHRs shPNPLA1.

Pour évaluer l'impact de l'extinction du gène *PNPLA1* sur les lipides du SC liés de manière covalente aux ECs, nous avons purifié les ECs des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. Nous avons évalué leur maturité en combinant une coloration au rouge de Nile à un immunomarquage de l'involucrine. Environ 25% des ECs des EHRs shC étaient colorées de manière homogène par le rouge de Nile. En revanche, seules quelques ECs des EHR shPNPLA1a et une proportion encore plus faible d'ECs des EHRs shPNPLA1b étaient colorées par le rouge de Nile alors que la majorité des ECs de ces EHRs ont fortement réagi avec l'anticorps anti-involucrine (Figure 4-B). Cela indique qu'une partie des ECs des EHRs shC présentaient une monocouche lipidique externe liée de manière covalente aux protéines et étaient donc matures, tandis que les ECs des EHRs shPNPLA1a et shPNPLA1b présentaient très majoritairement une couverture lipidique défectueuse et étaient essentiellement constituées de protéines réticulées. De plus, les ECs des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b ont été analysées en microscopie optique. Nous avons noté un rendement considérablement réduit de la purification des ECs à partir des EHRs shPNPLA1a et shPNPLA1b par rapport au rendement de purification obtenu avec les EHRs shC (données non représentées). Ceci était conforme à l'aspect plus mince du SC démontré à l'examen histologique et en microscopie électronique (Figure 1-A, 3-A). De plus, la morphologie des ECs de nos différents EHRs était



clairement distincte. Les ECs des EHRs shC présentait soit une morphologie angulaire, soit la forme ovoïde d'un ballon. En comparaison, les ECs des EHRs shPNPLA1a étaient plus grandes, arrondies et associées à de nombreux débris cellulaires et les ECs des EHRs shPNPLA1b étaient moins nombreuses, dysmorphiques et fragiles.

### **5. L'extinction du gène *PNPLA1* altère la fonction barrière de l'épiderme**

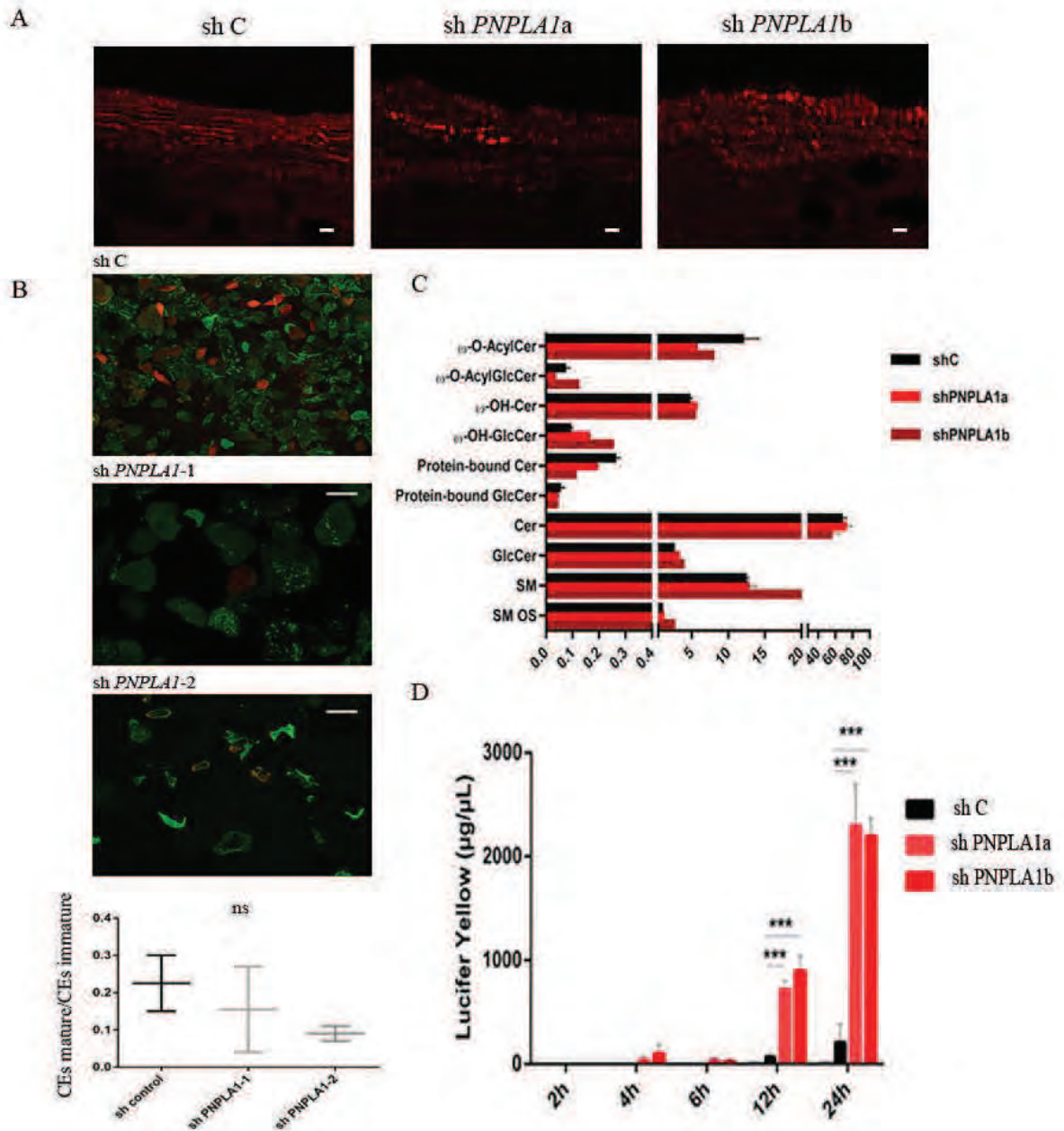
La perméabilité épidermique des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b complètement différenciés a été évaluée par un test de pénétration au Lucifer yellow. Vingt-quatre heures après le dépôt du Lucifer yellow à la surface du SC des EHRs, la concentration de colorant mesurée dans le milieu de culture était multipliée par un facteur de 7,5 et 7,1 dans les EHRs shPNPLA1a et les EHRs shPNPLA1b, respectivement, par rapport aux EHRs shC (Figure 4-D). Ainsi, la perméabilité de l'extérieur vers l'intérieur de l'épiderme était profondément altérée dans les EHRs shPNPLA1.

### **6. L'extinction du gène *PNPLA1* dans les EHRs affecte la synthèse des $\omega$ -O-acylcéramides**

Comme les céramides sont des composants des lamelles intercornéocytaires et des lipides de l'EC, nous avons étudié par analyse LC-MS/MS la composition des céramides épidermiques dans nos modèles EHRs (Figure 4-C et Figure S2). En comparaison avec les EHRs shC, une diminution de 34 à 46% des céramides estérifiés par l'acide linoléique ( $\omega$ -O-acylCer) a été observée dans les EHRs shPNPLA1b et shPNPLA1a, respectivement. En parallèle, les  $\omega$ -OH-Cer, précurseurs des  $\omega$ -O-acylCer, sont apparus légèrement augmentés dans les EHRs shPNPLA1a et shPNPLA1b en comparaison avec les EHRs shC. Enfin, par rapport

aux EHRs shC, le niveau de céramides liés de manière covalente aux protéines a diminué de 26 et 57% dans les EHRs shPNPLA1a et les EHRs shPNPLA1b, respectivement.

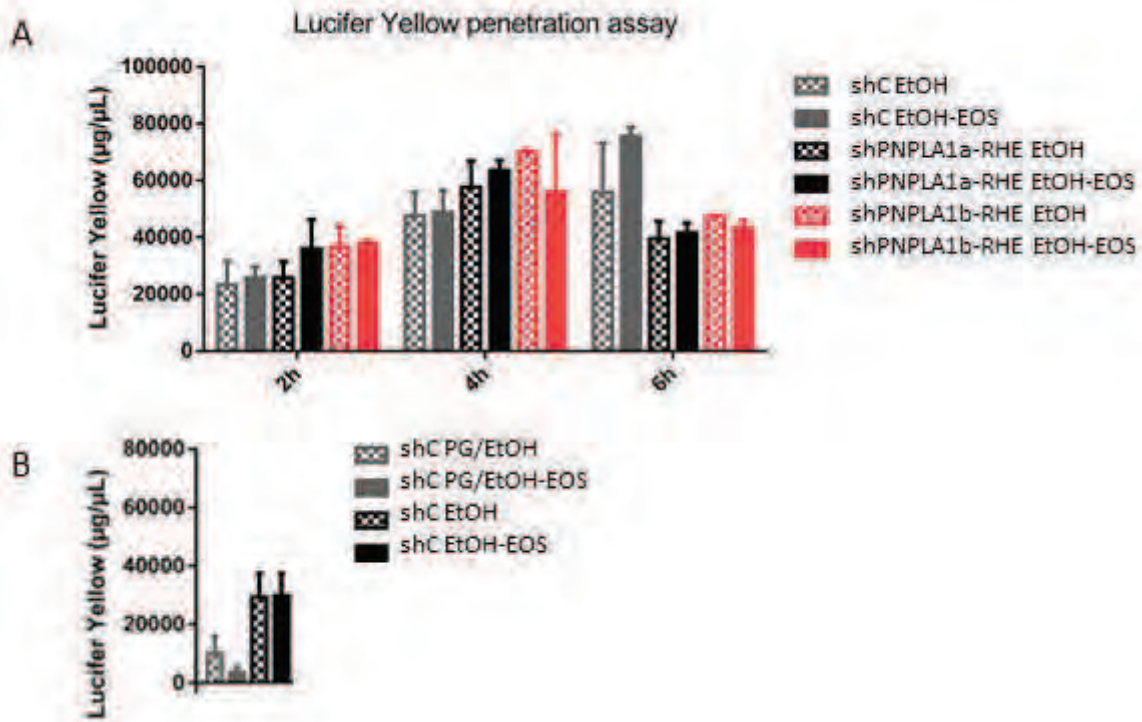
Nous avons également examiné l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides du SC par RT-qPCR et par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques (Figure S3). Nous avons constaté une différence significative de l'expression du gène *ELOVL4* et aucune différence dans l'expression des autres gènes codants pour des enzymes et des cofacteurs impliqués dans la synthèse des lipides du SC (*GBA1*, *CERS3*, *ABCA12*, *ABHD5*, *DGAT2*, *CYP4F22*, *ALOX12B* et *LIPN*) dans les EHRs shPNPLA1 par rapport aux EHRs shC (Figure S3-A). En accord avec ces résultats, les marquages en immunofluorescence de TGM1 et d'ABCA12 étaient similaires dans les 3 types d'EHRs (Figure S3-B). Ainsi, globalement, la perturbation dans la composition des céramides provoquée par l'extinction du gène *PNPLA1* n'était pas corrélée avec des changements majeurs dans le niveau d'expression d'autres gènes impliqués dans la même voie métabolique.



**Figure 4 : Effet de l'extinction de *PNPLA1* sur le métabolisme lipidique et la perméabilité épidermique.** (A) Coloration des lipides à l'Oil Red O sur des coupes d'EHRs shC, sh*PNPLA1a* et sh*PNPLA1b*. On note une accumulation en lipides neutres dans les EHRs sh*PNPLA1a* et sh*PNPLA1b* en comparaison à l'EHR shC. Echelle = 10 $\mu\text{m}$ , n=2. (B) Double marquage au rouge de Nile (rouge) et par l'anticorps anti-involucrine (vert) des ECs purifiées des EHRs shC, sh*PNPLA1a* et sh*PNPLA1b*. Echelle = 100 $\mu\text{m}$ . L'histogramme montre la quantification des ECs matures (ratio ECs matures / ECs immature) réalisé sur 5 photographies faites en microscopie optique. Les barres d'erreurs représentent le calcul des écarts types, test de Student non apparié. (C) Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) des lipides extraits des EHRs shC, sh*PNPLA1a* et sh*PNPLA1b*. Toutes les espèces de sphingolipides quantifiées par LC-MS/MS sont listées dans la table supplémentaire S4. n =2. (D) La perméabilité épidermique a été évaluée par un test de pénétration au Lucifer yellow sur les EHRs shC, sh*PNPLA1a* et sh*PNPLA1b*. La solution de Lucifer yellow a été déposée sur le SC des EHRs et la concentration du colorant a été mesurée dans le milieu de culture entre 0 à 24 heures. Les barres d'erreurs représentent le calcul des écarts types, test de Student non apparié, P-value <0.01 (\*\*\*), En (A) et (B), n = 2; en (C), n =3.

## **7. Mise en place de traitements topiques contenant les $\omega$ -O-acylCer sur les EHRs dans le but de restaurer l'imperméabilité épidermique**

Le défi dans la mise en place des tests de substitution utilisant l' $\omega$ -O-acylCer était de trouver un véhicule compatible avec la faible solubilité de ce céramide tout en préservant sa capacité à pénétrer le SC, sans pour autant altérer les propriétés du SC. Dans une première série d'essais, nous avons effectué l'application topique d' $\omega$ -O-acylCer dissous dans de l'éthanol sur les EHRs. L'impact sur la perméabilité épidermique a été évalué par un test de pénétration au Lucifer yellow (Figure 5-A). Malheureusement, nous avons obtenu une altération drastique de la perméabilité épidermique avec l'éthanol seul, indiquant que ce véhicule n'était pas approprié. Au cours de nouveaux essais, nous avons testé deux véhicules différents uniquement sur les EHRs shC : l'éthanol seul et un mélange propylène glycol-éthanol (70/30) (figure 5-B). Contrairement à l'éthanol, l'application de propylène glycol-éthanol n'a pas modifié la fonction barrière épidermique des EHRs shC. Ainsi, le mélange propylène glycol-éthanol, dans lequel l' $\omega$ -O-acylCer reste soluble, pourrait convenir pour l'application topique de ce céramide sur les EHRs. Ces nouveaux essais doivent maintenant être réalisés



**Figure 5 : Mise en place des tests de substitution sur les EHRs.** (A) Une solution de Lucifer yellow a été appliquée à la surface du SC des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b traités par l' $\omega$ -O-acylCer dilué en éthanol ou par de l'éthanol seul. Le passage du colorant à travers l'épiderme a été évalué par mesure de sa concentration dans le milieu de culture après 2, 4 et 6 heures d'incubation à 37°C. (B) Les mêmes mesures ont été réalisées xx h après avoir traité des EHRs shC par de l'éthanol ou le mélange propylène glycol seul ou contenant de l' $\omega$ -O-acylCer. En (A) et (B), les barres d'erreurs représentent le calcul des écarts types, n =3. EtOH : éthanol, PG : propylène glycol, EOS :  $\omega$ -O-acylCer.

Le modèle *in vitro* d'ARCI mutée *PNPLA1* que nous avons mis en place est basé sur l'utilisation d'un modèle d'épiderme tridimensionnel (21) et la technologie des shARNs permettant d'éteindre l'expression du gène *PNPLA1*. L'extinction du gène *PNPLA1*, dont l'efficacité est de 70 à 90% dans nos EHRs, a un impact sur l'organisation des lipides et la fonction du SC. En effet, nous avons obtenu une diminution de 34 et 46% des  $\omega$ -O-acylCer dans les EHRs shPNPLA1a et shPNPLA1b, respectivement. Comme attendu, cette diminution est associée à une perturbation de l'organisation de la matrice lipidique intercornéocytaire, comme en témoigne la réduction des espaces intercornéocytaires et l'accumulation anormale de lipides neutres dans le SC. D'autre part, le niveau de céramides liés aux protéines est nettement réduit, en particulier dans le cas des EHRs shPNPLA1b. Ceci est en accord avec le défaut de la composante lipidique des ECs correspondantes. Ces défauts sont associés à une altération drastique de la perméabilité épidermique des EHRs, révélée par une augmentation anormale du passage du Lucifer yellow à travers l'épiderme en culture. Au total, le phénotype observé dans notre modèle *in vitro* d'EHR shPNPLA1 est conforme aux phénotypes décrits dans les modèles murins *Pnpla1*<sup>-/-</sup> (12, 16, 17), le modèle spontané canin muté pour *PNPLA1* (4) et les patients atteints d'ARCI portant une mutation *PNPLA1* (4-12). Ainsi, les altérations épidermiques obtenues après l'extinction du gène *PNPLA1* entraîne dans les EHRs shPNPLA1 des conditions similaires à celles observées dans la maladie humaine causée par la mutation de ce gène (4-12).

Contrairement à notre modèle d'EHR shPNPLA1, où une petite quantité d' $\omega$ -O-acylCer est encore synthétisée, le niveau d' $\omega$ -O-acylCer et de ses dérivés glycosylés est à peine détectable chez les souris mutantes *Pnpla1*<sup>-/-</sup>. Cependant, la plupart des patients atteints d'ARCI mutés *PNPLA1* sont porteurs de mutations faux-

sens du gène qui peuvent entraîner une activité enzymatique résiduelle. En effet, les tests enzymatiques réalisés *in vitro* avec deux formes recombinantes de PNPLA1 porteuses de mutations de type faux-sens entraînent une diminution du taux d' $\omega$ -O-acylCer de 60% par rapport à la forme recombinante non mutée de PNPLA1 (18). Ainsi, notre modèle EHR shPNPLA1 est certainement plus proche de l'épiderme des patients portant des mutations faux-sens. D'autres stratégies expérimentales pour modifier l'expression du gène *PNPLA1*, par exemple en utilisant la technologie CrisprCas9, pourraient être appliquées à notre système d'EHR pour créer des modèles plus proches des situations où l'activité de PNPLA1 est totalement réprimée.

A la lumière de ces résultats, notre modèle semble être une alternative intéressante pour mener des études physiopathologiques et des tests thérapeutiques. En particulier, les EHRs shPNPLA1 sont des outils prometteurs pour tester l'efficacité de thérapies de substitution sur l'amélioration des propriétés et des fonctions du SC. Ces tests pourraient constituer une première étape dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques chez des patients atteints d'ARCI présentant une mutation de *PNPLA1*. En effet, à ce jour, les patients atteints d'ARCI n'utilisent que des traitements locaux de lipides non physiologiques tels que la vaseline, largement disponible et peu coûteuse, qui agissent très rapidement. Un inconvénient majeur de ces produits est que l'homéostasie de la perméabilité épidermique n'est que partiellement rétablie (24). Ainsi, le développement d'une thérapie substitutive locale spécifique serait particulièrement bénéfique pour les patients atteints d'ARCI.

Nous avons débuté des tests thérapeutiques avec l'application locale d' $\omega$ -O-acylCer sur les EHRs shPNPLA1. Le premier défi était d'identifier un véhicule compatible avec la faible solubilité des  $\omega$ -O-acylCer mais permettant au céramide



d'exercer une action bénéfique au niveau du SC. Nous avons donc testé deux véhicules différents : l'éthanol seul et un mélange propylène glycol-éthanol (70/30%). Nous avons choisi ces véhicules car les  $\omega$ -O-acylCer pouvaient y être solubilisés. Cependant, la toxicité de l'éthanol sur les EHRs devait au préalable être testée dans les conditions expérimentales que nous avons définies (volume et temps d'application...) (25). Les premiers essais ont indiqué que l'application d'éthanol seul altérerait de façon importante la perméabilité des EHRs, ce qui n'était pas le cas du propylène glycol-éthanol. Nous utiliserons donc ce dernier véhicule dans les expériences à venir. Ensuite, si nous obtenons une amélioration de la barrière épidermique après traitement local des EHRs shPNPLA1 par les  $\omega$ -O-acylCer, un développement pharmacologique pourra être initié afin d'optimiser l'effet bénéfique de ce céramide. En particulier, la formulation devra respecter le rapport physiologique des lipides du SC (céramides / cholestérol / acides gras libres). En effet, il a été démontré que si ce rapport n'est pas respecté, il pouvait y avoir un retard dans la réparation de la perméabilité (24).

Le développement d'un traitement topique contenant de l' $\omega$ -O-acylCer ou ses dérivés serait intéressant dans les cas des patients atteints d'ARCI due à une mutation *PNPLA1* mais aussi dans le cas d'autres ARCI causées par des mutations de gènes impliqués dans la synthèse des acylcéramides (*CERS3*, *CYP4F22*), l'empaquetage (*ABCA12*) ou la formation de la couverture lipidique des enveloppes cornées (*TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*) (26). De façon similaire aux ARCI, d'autres formes d'ichtyoses affectant le métabolisme lipidique comme le syndrome « ichtyose-prématurité » (mutation du gène *FATP4*) ou le syndrome Chanarin-Dorfman (mutation du gène *CGI58/ABHD5*) (27), dans lesquelles la synthèse des  $\omega$ -O-acylCer est altérée, pourraient également être améliorées par cette thérapie substitutive. Enfin, d'autres pathologies dermatologiques présentant une altération de



la perméabilité épidermique ainsi qu'un profil lipidique et une organisation du SC aberrants, même si ces anomalies lipidiques ne sont pas le facteur déclenchant de la maladie, peuvent être concernées par ces thérapies de substitution. C'est le cas des ichtyoses résultant de la mutation de gènes impliqués dans la cohésion du SC (par exemple *SPINK5* dans le syndrome de Netherton) ainsi que des maladies dermatologiques inflammatoires chroniques fréquentes comme la dermatite atopique (28) ou le psoriasis (29).

Dans toutes ces pathologies dermatologiques, un niveau réduit en  $\omega$ -O-acylCer apparaît comme une caractéristique commune parmi les perturbations lipidiques décrites (27). En effet, Motta et coll. (29) ont démontré une diminution relative des  $\omega$ -O-acylCer (environ 40%) dans la peau lésionnelle de patients psoriasiques. Concernant les patients atteints de dermatite atopique, un déficit général des lipides du SC incluant les  $\omega$ -O-acylCer a été rapporté, ainsi qu'une diminution du niveau des  $\omega$ -OHCer liés aux protéines (de 75% dans la peau non lésionnelle à 85% en zone lésionnelle) (28). Enfin à ce jour, il existe des preuves évidentes que l'apport de lipides physiologiques du SC, s'ils sont livrés en quantité suffisante et dans des rapports molaires appropriés, sont efficaces dans le traitement de la dermatite atopique modérée voire sévère (30).

Par ailleurs, l'innocuité et l'efficacité du traitement topique peuvent varier d'un patient à un autre et dépendre également de la pathologie considérée. En effet, comme déjà mentionné, l'hétérogénéité lipidique est très importante pour restaurer la barrière cutanée (24). Ainsi, non pas un seul lipide, mais un mélange lipidiques devrait être appliqué sur une peau affectée, et une combinaison spécifique de lipides devrait être déterminée pour optimiser l'efficacité du traitement d'une pathologie donnée.

Nos résultats actuels montrant l'efficacité de l'extinction du gène *PNPLA1* dans les EHRs devront être consolidés par la répétition des expériences avec des kératinocytes primaires provenant d'autres donneurs sains. De plus, il pourrait être intéressant de développer des modèles d'EHRs plus sophistiqués, par exemple en ajoutant y intégrant des lymphocytes T, d'autres cellules immunitaires ou en modifiant le pH (26). Cela élargirait les champs d'application potentiels de nos EHR. En ce qui concerne les essais de traitement topique, nos travaux pourraient être complétés en testant diverses molécules proches des  $\omega$ -O-acylCer et potentiellement actives, telles que leurs formes glycosylées qui sont plus solubles. Enfin, nous avons l'intention de consolider l'évaluation de l'impact des traitements substitutifs sur la perméabilité épidermique par la mesure de la perte en eau trans-épidermique en plus des tests de pénétration de colorant au Lucifer yellow, et de compléter ces analyses par l'examen d'autres paramètres comme l'architecture des lamelles lipidiques extracellulaires (en microscopie électronique en transmission) et la formation de l'enveloppe cornée lipidique (par double marquage des lipides et de l'involucrine d'ECs purifiées et/ou quantification des lipides liés à des protéines par analyse LC-MS/MS).

En conclusion, l'application topique d' $\omega$ -O-acylCer ou de ses dérivés glycosylés pourrait constituer une stratégie thérapeutique simple et peu coûteuse particulièrement intéressante dans le cas d'ichtyoses associées à un déficit lipidique du SC, mais aussi d'autres pathologies dermatologiques plus fréquentes comme le psoriasis ou dermatite atopique, qui présentent également un défaut de perméabilité épidermique et des anomalies du métabolisme des céramides du SC.

Vu pour...  
Le Doyen de la Faculté  
de Médecine Toulouse - France



**Didier CARRIÉ**

le 21.06.2017  
  
**P<sup>r</sup> Guy SERRE - Directeur**  
**UDEAR**

U1056 Inserm - UPS  
Hôpital Purpan  
Place du D<sup>r</sup> Baylac - TSA 40031  
31059 TOULOUSE cedex 9 - France

### Remerciements :

Je souhaite remercier Florence Capilla, du plateau technique d'histopathologie (US006 Inserm). Je remercie également Danièle Daviaud et Astrid Canivet du plateau technique d'imagerie (Inserm UMR 1043-CNRS UMR 5282, CPTP Toulouse) et Dominique Goudounèche du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB, Faculté de Médecine Rangueil, Toulouse) ainsi que Roger Sandhoff (Lipid Pathobiochemistry Group, Department of Cellular and Molecular Pathology, German Cancer Research Center DKFZ, Heidelberg, Germany) pour les analyses LC-MS/MS.



## Références :

- (1) Oji V, Tadini G, Akiyama M, *et al.* Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63:607-41.
- (2) Traupe H, Fischer J, Oji V. Nonsyndromic types of ichthyoses - an update. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12:109-21.
- (3) Richard G. Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, *et al.*, éditeurs. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 12 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1420/>
- (4) Grall A, Guaguère E, Planchais S, *et al.* PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat Genet.* 2012;44:140-7.
- (5) Fachal L, Rodríguez-Pazos L, Ginarte M, *et al.* Identification of a novel PNPLA1 mutation in a Spanish family with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Br J Dermatol.* 2014;170:980-2.
- (6) Ahmad F, Ansar M, Mehmood S, *et al.* A novel missense variant in the PNPLA1 gene underlies congenital ichthyosis in three consanguineous families. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016; 30:e210-e213.
- (7) Lee E, Rahman OU, Khan MT, *et al.* Whole exome analysis reveals a novel missense PNPLA1 variant that causes autosomal recessive congenital ichthyosis in a Pakistani family. *J Dermatol Sci.* 2016;82:46-8.
- (8) Pigg MH, Bygum A, Gånemo A, *et al.* Spectrum of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis in Scandinavia: Clinical Characteristics and Novel and Recurrent Mutations in 132 Patients. *Acta Derm Venereol.* 2016;96:932-937.
- (9) Vahidnezhad H, Youssefian L, Saeidian AH, *et al.* Gene-Targeted Next Generation Sequencing Identifies PNPLA1 Mutations in Patients with a Phenotypic Spectrum of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis: The Impact of Consanguinity. *J Invest Dermatol.* 2017;137:678-685.
- (10) Zimmer AD, Kim GJ, Hotz A, *et al.* Sixteen novel mutations in PNPLA1 in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis reveal the importance of an extended patatin domain in PNPLA1 that is essential for proper human skin barrier function. *Br J Dermatol.* 17 Janv 2017.
- (11) Boyden LM, Craiglow BG, Hu RH, *et al.* Phenotypic Spectrum of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis Due to PNPLA1 Mutation. *Br J Dermatol.* 17 Janv 2017.
- (12) Pichery M, Huchénq A, Sandhoff R, *et al.* PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Hum Mol Genet.* 2017; 26:1787-1800.
- (13) Wilson JC, Collins PM, Klipic Z, *et al.* Identification of a novel glycosyltransferase involved in LOS biosynthesis of *Moraxella catarrhalis*. *Carbohydr Res.* 2006; 341:2600-6.
- (14) Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, *et al.* Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res.* avr 2009;50 Suppl:S63-68.
- (15) Toulza E, Mattiuzzo NR, Galliano MF, *et al.* Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol.* 2007; 8(6):R107.
- (16) Grond S, Eichmann TO, Dubrac S, *et al.* PNPLA1 Deficiency in Mice and Humans Leads to a Defect in the Synthesis of Omega-O-Acylceramides. *J Invest Dermatol.* 2017; 137:394-402.
- (17) Hirabayashi T, Anjo T, Kaneko A, *et al.* PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun.* 2017;8:14609.
- (18) Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, *et al.* PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid  $\omega$ -O-acylcéramide. *Nat Commun.* 2017;8:14610.

- (19) Breiden B, Sandhoff K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:441-52.
- (20) Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FE, *et al*. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res*. 1998; 39: 186-96.
- (21) Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, *et al*. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol*. 2012;21:871-5.
- (22) Opalka L, Kovacik A, Sochorova M, *et al*. Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Org Lett*. 2015;17:5456–9.
- (23) Jennemann R, Sandhoff R, Langbein L, *et al*. Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J Biol Chem*. 2007;282:3083–94.
- (24) Feingold K, Elias P. The important role of lipids in the epidermis and their role in the formation and maintenance of the cutaneous barrier. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:279.
- (25) Opálka L, Kováčik A, Sochorová M, *et al*. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org Lett*. 2015;17:5456-9.
- (26) Breinden B, Sandhoff K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:441-52.
- (27) Van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, *et al*. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:295-313.
- (28) Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K. Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2002;119:166-73.
- (29) Motta S, Monti M, Sesana S, *et al*. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1182:147-51.
- (30) Elias PM, Wakefield JS. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:781-791.

Tables et Figures supplémentaires :

**Table S1:** Anticorps primaires

Antigène	Clone N°/Nom	Entreprise	Dilution	Application
<b>Involucrine</b>	SY5	Sigma-Aldrich	1/50 1/1000	IF WB
<b>Loricrine</b>	PRB-145P	Covance	1/1000 1/10000	IF WB
<b>Cornéodesmosine</b>	G36-19 mAb	Home made <sup>1</sup>	1/1000 1/1000	IF WB
<b>Filaggrine</b>	AHF3	Home made <sup>2</sup>	1/1000 1/10000	IF WB
<b>ALOX12B</b>	Sc-98852	Santa Cruz Biotechnology	1/1000	WB
<b>ABCA12</b>	LSC87290	Ls Bio	1/200	IF
<b>ABCA12</b>	Sc-134467	Santa Cruz Biotechnology	1/500	WB
<b>TGM1</b>	A018	Zedira	1/100 1/2000	IF (cryosection) WB
<b>Ki67</b>	Ab16667	Abcam	1/200	IHC
<b>Keratine 10</b>	LH2	Santa Cruz Biotechnology	1/1000	IHC
<b>Actine (C4)</b>	MAB1501	Millipore	1/10000	WB
<b>YWHAZ</b>	AP8152c-ev	LabNetwork	1/1000	WB
<b>GAPDH</b>	Sc-32233	Santa Cruz Biotechnology	1/500	WB

<sup>1</sup> Serre G, Mills V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Reano A. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. J Invest Dermatol 1991. 97:1061-72. <sup>2</sup> Simon M, Sebbag M, Haftek M, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, Rakotoarivony J, et al. Monoclonal antibodies to human epidermal filaggrin, some not recognizing profilaggrin. J Invest Dermatol 1995. 105:432-7,

IF: immunofluorescence, IHC: immunohistochimie, WB: western blot.

**Table S2:** Séquences des amorces nucléotidiques utilisées en analyse qPCR

<b>Genes</b>	<b>Forwards</b>	<b>Reverse</b>
<b>PNPLA1*</b>	5'-TCAAAACCAAAAAGCGCCGT-3'	5'-CCGAATGTCTTGGGAAGCCT-3'
<b>ALOX12B</b>	5'-CTGTCGTCTCCGAGTACGTG-3'	5'-CCCTCCATGATGCGGTAGTC-3'
<b>ABHD5</b>	5'-GCAGCGTTTAAGGCCTGATTT-3'	5'-GCTGGAGCATTGGCCTTTTT-3'
<b>CYP4F22</b>	5'-CTTGTCTCTCGCCAATGCAC-3'	5'-CGATGCAATTCCTGGGTCCT-3'
<b>DGAT2</b>	5'-TGCAGTGCCATCCTCATGTA-3'	5'-TCTCGAAAGTAGCGCCACAC-3'
<b>ELOVL4</b>	5'-GCACTCAACGACACGGTAGA-3'	5'-ATCCCATGAATAACTCTCTGAAGAT-3'
<b>LIPN</b>	5'-TCCCACGGGCATTTTTACCA-3'	5'-ACACATCCATTGACTCTGATT-3'
<b>IVL</b>	5'-TGCCTCAGCCTTACTGTGAGT-3'	5'-TGGGTATTGACTGGAGGAGG-3'
<b>FLG</b>	5'-TGAACAAGGTTACATTTATTGC-3'	5'-TGGATTCTTCAGGATTTGCC-3'
<b>CDSN</b>	5'-ACTGCTGCTGGCTGGTCT-3'	5'-AGAGCTTCTGGCACTGGAAA-3'
<b>LOR</b>	5'-GTGCTTTGGGCTCTCCTTC-3'	5'-GAGTAGCCGCAGCCAGAAC-3'
<b>K10</b>	5'-TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC-3'	5'-GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA-3'
<b>K14</b>	5'-ATCCTGCTGGACGTGAAGAC-3'	5'-GGAGGAGGTCACATCTCTGG-3'
<b>GBA1</b>	5'-GCAGCCAGAACAGAAGTTCC-3'	5'-ATCAGGGGTGTCTGCATAGG-3'
<b>CERS3</b>	5'-GGATCACGATGGACTCGTCT-3'	5'-TTGCCTTGTGGAATGTTTGA-3'
<b>ABCA12</b>	5'-GGAGTCTGTATGCAGCACGA-3'	5'-CTTCCTTTCATGCCTCCTG-3'
<b>GAPDH</b>	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

\*Reference sequence *PNPLA1*: NM\_001145717.1

**Table S3:** UPCL-gradient utilisé pour diluer les sphingolipides des colonnes CSH-C18

Time [min]	Flow rate [mL/min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
Initial	0.35	57	43
0.2	0.35	57	43
0.4	0.35	50	50
4.0	0.35	30	70
10.0	0.35	5	95
11.0	0.35	5	95
11.5	0.35	1	99
12.0	0.35	57	43
14.0	0.35	57	43

Solvent A: 50 % methanol, 50 % water, 10 mM ammonium formiate, 0.1 % formic acid

Solvent B: 99 % isopropanol, 1 % methanol, 10 mM ammonium formiate, 0.1 % formic acid

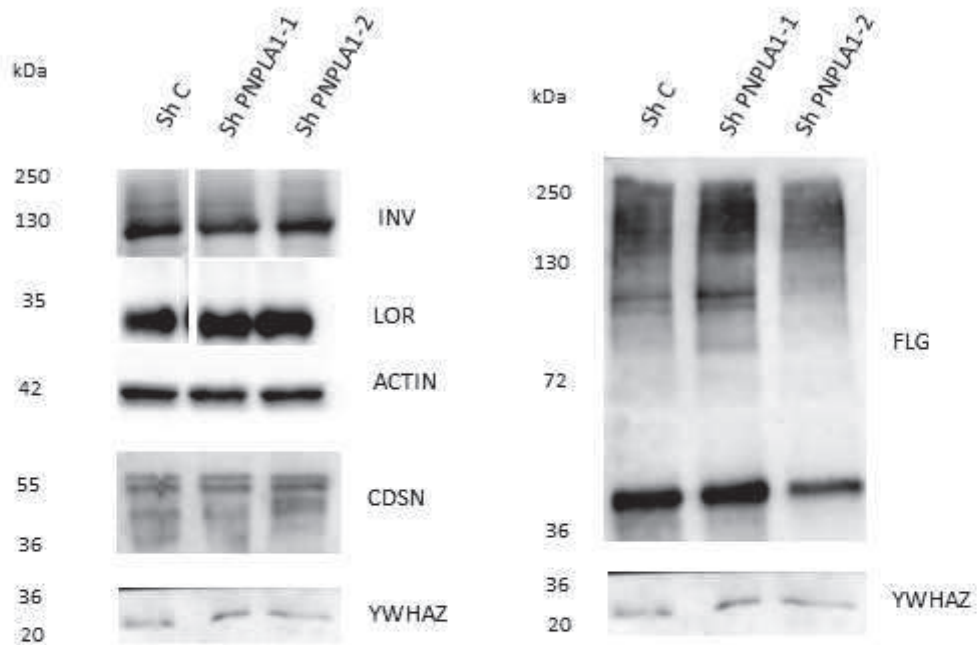


**Table S4:** Différentes espèces de sphingolipides analysés

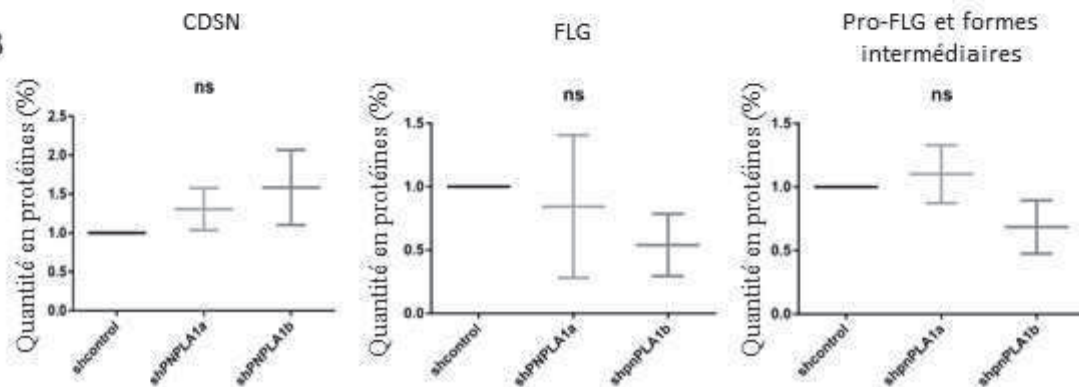
NS-CER	AS-CER	OS/POS-CER	$\omega$ -EOS-CER	1-O-ENS-CER	1-O-EAS-CER	1-O-EOS-CER	X
(d18:1,16:0)	<b>(d18:1,h16:0)</b>	(d18:1,h28:0)	(d18:1,h30:0-18:2)	(X:0;d18:1,16:0)	(X:0;d18:1,h16:0)	(X:0;d18:1,h30:0)	14
(d18:1,18:0)	(d18:1,h18:0)	(d18:1,h30:0)	(d18:1,h32:0-18:2)	(X:0;d18:1,18:0)	(X:0;d18:1,h26:0)	(X:0;d18:1,h32:0)	16
(d18:1,20:0)	(d18:1,h20:0)	<b>(d18:1,h32:0)</b>	(d18:1,h34:0-18:2)	(X:0;d18:1,20:0)		(X:0;d18:1,h32:1)	18
(d18:1,22:0)	(d18:1,h22:0)	<b>(d18:1,h34:0)</b>	(d18:1,h36:0-18:2)	(X:0;d18:1,22:0)		(X:0;d18:1,h34:1)	20
(d18:1,23:0)	(d18:1,h23:0)	(d18:1,h36:0)	(d18:1,h30:1-18:2)	(X:0;d18:1,24:0)		(X:0;d18:1,h34:2)	22
<b>(d18:1,24:0)</b>	(d18:1,h24:0)	(d18:1,h30:1)	(d18:1,h32:1-18:2)	(X:0;d18:1,26:0)		(X:0;d18:1,h36:1)	24
<b>(d18:1,26:0)</b>	(d18:1,h25:0)	(d18:1,h32:1)	(d18:1,h34:1-18:2)	(X:0;d18:1,28:0)		(X:0;d18:1,h36:2)	26
(d18:1,28:0)	(d18:1,h26:0)	(d18:1,h34:1)	(d18:1,h36:1-18:2)	(X:0;d18:1,30:0)			
(d18:1,30:0)		(d18:1,h36:1)	(d18:1,h34:2-18:2)	(X:0;d18:1,32:0)			
(d18:1,32:0)		(d18:1,h32:2)	(d18:1,h36:2-18:2)	(X:0;d18:1,32:1)			
(d18:1,34:0)		(d18:1,h34:2)		(X:0;d18:1,34:1)			
(d18:1,36:0)		(d18:1,h36:2)					
(d18:1,16:1)							
(d18:1,22:1)							
(d18:1,23:1)							
(d18:1,24:1)							
(d18:1,30:1)							
(d18:1,32:1)							
(d18:1,34:1)							
(d18:1,36:1)							
(d18:1,24:2)							
(d18:1,32:2)							
(d18:1,34:2)							
(d18:1,36:2)							

**Figure S1 :**

**A**



**B**



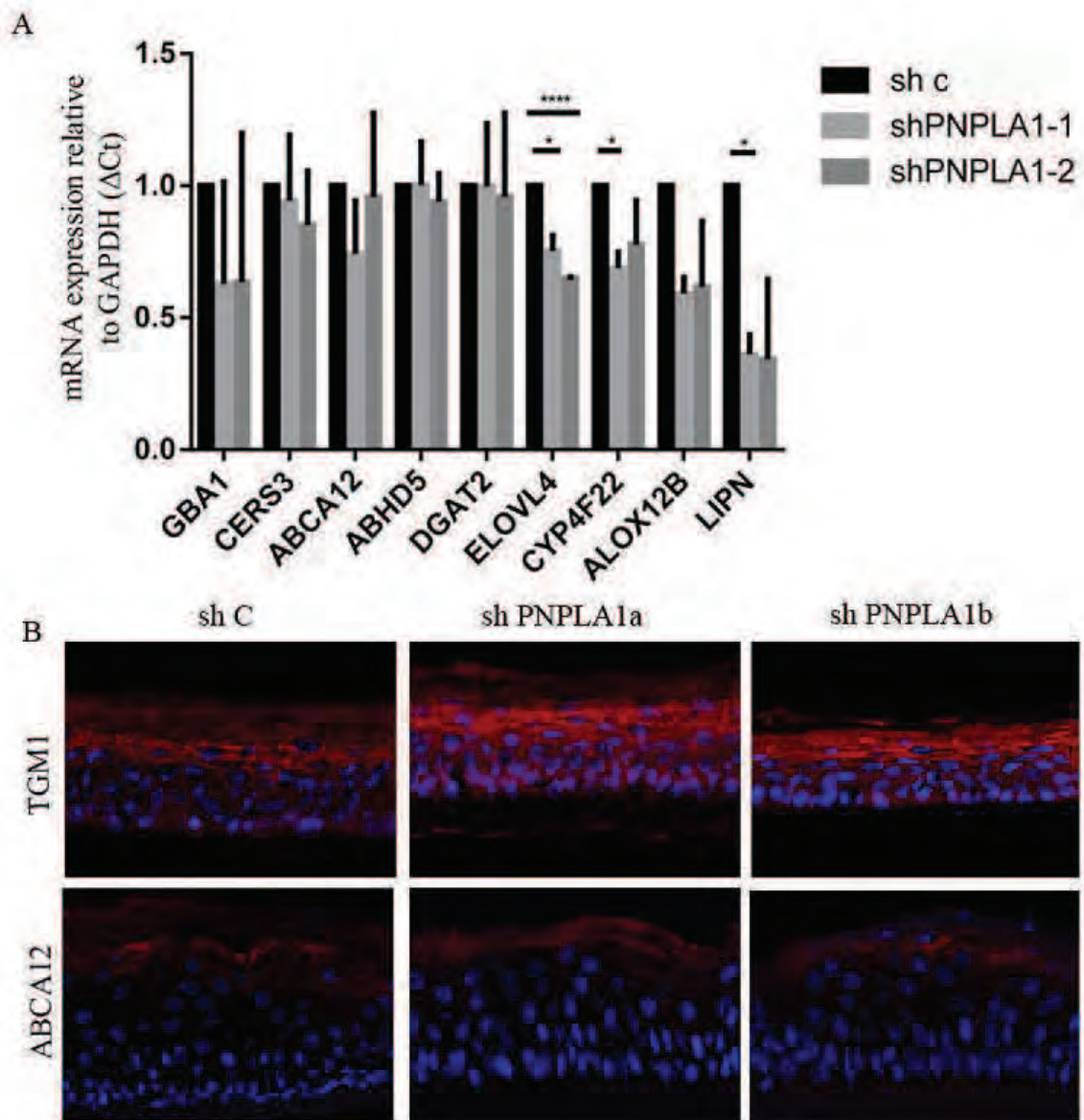
**Figure supplémentaire 1:** (A) Analyse de l'actine, YWHAZ et GAPDH et de divers marqueurs de la différenciation épidermique dans des extraits protéiques des EHRs shC, shPNPLA1a etPNPLA1b en western blot : loricroine (lor), involucrine (inv), cornéodesmosine (cdsn) et filaggrine (flg). n=2 (B) Quantification des bandes détectées en (A) pour la cornéodesmosine, la profilaggrine, les formes intermédiaires et mature de la filaggrine. n=2. ns: non significatif.

**Figure S2:**

Sphingolipid			
mol% (of SLs)	shC	shPNPLA1a	shPNPLA1b
NS/AS-Cer	67,24	71,55	54,92
OS-Cer	4,65	5,58	5,40
EOS-Cer	12,04	5,64	7,96
POS-Cer	0,26	0,19	0,11
SM NS/AS	12,27	12,63	24,94
SM OS	0,86	1,01	2,49
NS/AS-HexCer	2,47	3,17	3,76
OS-HexCer	0,09	0,16	0,25
EOS-HexCer	0,07	0,03	0,12
POS-HexCer	0,05	0,04	0,04

**Figure Supplémentaire 2** : Valeurs absolues obtenues pour les sphingolipides représentés sur la Figure 4-C

Figure S3 :



**Figure Supplémentaire 3 : Effet de l'extinction de *PNPLA1* sur le métabolisme lipidique.** (A): Analyse par RT-qPCR des gènes du métabolisme lipidique des EHRs shC, shPNPLA1a et shPNPLA1b. Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type, n = 2. Test de Student non apparié, P-value < 0.05 (\*) et P-value < 0.01 (\*\*\*\*) (B): Marquage en immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-TGM1 et anti-ABCA12 de coupes des EHRs shC, shPNPLA1a and shPNPLA1b.

**Annexes :** Vous trouverez ci-joint, un article sur le modèle murin *Pnpla1*<sup>-/-</sup>, un travail auquel j'ai participé au laboratoire à l'UDEAR à Toulouse au cours de mon internat, afin de préparer ma demande de bourse pour l'année recherche réalisée pendant l'année scolaire 2016/2017 (Master 2 recherche de la biologie de la peau, Université Lyon 1, sous l'égérie de Jérôme Lamartine et Jean-François Nicolas).



Human Molecular Genetics, 2017, Vol. 26, No. 10 1787–1800

doi: 10.1093/hmg/ddx079

Advance Access Publication Date: 27 March 2017

Original Article

ORIGINAL ARTICLE

## PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier

Mélanie Pichery, Anne Huchenoq, Roger Sandhoff, Maëlla Severino-Freire, Sarra Zaafouri, Lukás Opálka, Thierry Levade, Vanessa Soldan, Justine Bertrand-Michel, Emeline Lhuillier, Guy Serre, Annabel Maruani, Juliette Mazereeuw-Hautier, et Nathalie Jonca.

### Résumé:

L'ichthyose congénitale autosomique récessive (ARCI) est un groupe hétérogène de génodermatose monogénique qui englobe les troubles, non syndromiques, de la cornification. La pathophysiologie des ARCI a été liée à une perturbation du métabolisme lipidique de l'épiderme qui altère la fonction du *stratum corneum*, conduisant à des défauts de perméabilité cutanée. La caractérisation fonctionnelle de certains gènes impliqués dans les ARCI a contribué à l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans la synthèse, le transport ou le traitement des lipides épidermiques. Récemment, *PNPLA1* a été identifié comme gène responsable d'ARCI. Alors que d'autres membres de la famille PNPLA sont des éléments clés dans le métabolisme lipidique, la fonction de *PNPLA1* est restée incertaine. Nous avons identifié 5 nouvelles mutations du gène *PNPLA1* chez des patients atteints d'ARCI, principalement localisée dans le domaine enzymatique actif de *PNPLA1*. Afin d'étudier le rôle biologique de *PNPLA1*, nous avons étudié un modèle de souris mutant *Pnpla1*<sup>-/-</sup>. Les souris *Pnpla1*<sup>-/-</sup> meurent rapidement après la naissance à cause d'un défaut sévère de la perméabilité cutanée. La peau des souris *Pnpla1*<sup>-/-</sup> présentait un important défaut de la composition et de l'organisation des lipides de l'épiderme. La quantification des différents céramides épidermiques des souris *Pnpla1*<sup>-/-</sup> a mis en évidence un blocage de la production des ω-O-acylcéramides ainsi qu'une accumulation concomitante de leurs précurseurs. La quasi-perte des ω-O-acylcéramides dans le *stratum corneum* était responsable d'une couverture lipidique défectueuse des enveloppes encapsulant les cornéocytes, aussi appelé enveloppe cornifiée, et très probablement, désorganisait la matrice lipidique extracellulaire.

Enfin, ces défauts de synthèse des  $\omega$ -O-acylcéramides et de formation des enveloppes cornifiées ont également été mis en évidence dans le *stratum corneum* des patients mutés *PNPLA1*. Ensemble, nos données appuient que *PNPLA1* / *Pnpla1* est un acteur clé dans la formation des  $\omega$ -O-acylcéramides, un processus crucial pour la fonction de perméabilité épidermique.



## ORIGINAL ARTICLE

# PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier

Mélanie Pichery<sup>1</sup>, Anne Hucheq<sup>1</sup>, Roger Sandhoff<sup>2,3</sup>, Maella Severino-Freire<sup>1,4</sup>, Sarra Zaafouri<sup>1</sup>, Lukáš Opálka<sup>5</sup>, Thierry Levade<sup>6</sup>, Vanessa Soldan<sup>7</sup>, Justine Bertrand-Michel<sup>8</sup>, Emeline Lhuillier<sup>1,9</sup>, Guy Serre<sup>1</sup>, Annabel Maruani<sup>10</sup>, Juliette Mazereeuw-Hautier<sup>1,4</sup> and Nathalie Jonca<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unité Différenciation Epithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde (UDEAR), UMR 1056 Inserm - Université de Toulouse, Place du Dr Baylac, Hôpital Purpan, TSA 40031, F-31059 Toulouse, Cedex 9, France, <sup>2</sup>Lipid Pathobiochemistry Group within the Department of Cellular and Molecular Pathology, German CanCER Research Centre (DKFZ), 69120 Heidelberg, Germany, <sup>3</sup>Centre for Applied Sciences at Technical Universities (ZAFH)-Applied Biomedical Mass Spectrometry (ABIMAS), 68163 Mannheim, Germany, <sup>4</sup>Reference Centre for Rare Skin Diseases, Larrey Hospital, Toulouse, France, <sup>5</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové 50005, Czech Republic, <sup>6</sup>Laboratoire de Biochimie Métabolique, IFB, CHU Purpan, 31059 Toulouse, France; INSERM UMR 1037, CRCT, Université Paul Sabatier Toulouse-III, 31062 Toulouse, France, <sup>7</sup>Plateforme de Microscopie Électronique Intégrative (METi), CBI (Centre de Biologie Intégrative) CNRS FR3743, Bat IBCG, F-31062, Toulouse, France, <sup>8</sup>MetaToul-Lipidomic Core Facility, Inserm U1048, Toulouse, France, <sup>9</sup>Plateau de Génomique GeT-Purpan, Genotoul, Hôpital Purpan, Place du Dr Baylac - TSA 40031, F-31059 Toulouse, Cedex 9, France and <sup>10</sup>University François Rabelais Tours, 37000 Tours, CHRU Tours, Department of Dermatology, Unit of Paediatric Dermatology, 37044 Tours, France

\*To whom correspondence should be addressed at: Unité Différenciation Epithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde (UDEAR), UMR 1056 Inserm - Université de Toulouse, Place du Dr Baylac, Hôpital Purpan, TSA 40031, F-31059 Toulouse, Cedex 9, France. Tel: +33 561158434; Fax: +33 561499036; Email: nathalie.jonca@inserm.fr

## Abstract

Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a heterogeneous group of monogenic genodermatoses that encompasses non-syndromic disorders of keratinization. The pathophysiology of ARCI has been linked to a disturbance in epidermal lipid metabolism that impaired the *stratum corneum* function, leading to permeability barrier defects. Functional characterization of some genes involved in ARCI contributed to the identification of molecular actors involved in epidermal lipid synthesis, transport or processing. Recently, PNPLA1 has been identified as a gene causing ARCI. While other members of PNPLA family

Received: December 12, 2016. Revised: January 27, 2017. Accepted: February 27, 2017

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

are key elements in lipid metabolism, the function of PNPLA1 remained unclear. We identified 5 novel PNPLA1 mutations in ARCI patients, mainly localized in the putative active enzymatic domain of PNPLA1. To investigate Pnpla1 biological role, we analysed Pnpla1-deficient mice. KO mice died soon after birth from severe epidermal permeability defects. Pnpla1-deficient skin presented an important impairment in the composition and organization of the epidermal lipids. Quantification of epidermal ceramide species highlighted a blockade in the production of  $\omega$ -O-acylceramides with a concomitant accumulation of their precursors in the KO. The virtually loss of  $\omega$ -O-acylceramides in the *stratum corneum* was linked to a defective lipid coverage of the resistant pericellular shell encapsulating corneocytes, the so-called cornified envelope, and most probably disorganized the extracellular lipid matrix. Finally, these defects in  $\omega$ -O-acylceramides synthesis and cornified envelope formation were also evidenced in the *stratum corneum* from PNPLA1-mutated patients. Overall, our data support that PNPLA1/Pnpla1 is a key player in the formation of  $\omega$ -O-acylceramide, a crucial process for the epidermal permeability barrier function.

## Introduction

The outermost layer of the skin, the *stratum corneum* (SC), is the essential interface between the body and the outside environment. It mainly fulfils the permeability barrier function of the epidermis by attenuating the transepidermal loss of water and electrolytes and by preventing entry of toxic or pathogenic agents. The SC results from the stacking of corneocytes, the flattened dead cells resulting from epidermal terminal differentiation of the underlying keratinocytes. Corneocytes are encapsulated in the cornified envelope (CE), a highly insoluble protein shell covalently linked on its extracellular side to a lipid monolayer (1,2). These cells are tightly linked to each other by corneodesmosomes and are embedded in a mortar-like lipid extracellular matrix, a complex mixture of Ceramides (Cer), cholesterol and free fatty acids, highly organized in a multi-layered lipid structure called lipid lamellae (3,4). Most components of this lipid-rich extracellular matrix are produced by granular keratinocytes. Their precursors such as glucosyl(acyl)Cer, phospholipids and sphingomyelin are stored in the tubulo-vesicular secretory organelles called lamellar bodies. At the *stratum granulosum*/SC interface, these lipid precursors are released and processed into mature products that form continuous lamellar lipid structures surrounding the corneocytes (5).

Cer of the SC have a complex composition (Supplementary Material, Table S1) (6) with a high level of  $\omega$ -OH-Cer with an ultra-long acyl chain (C28-C36) (7), which is to a great extent  $\omega$ -esterified with fatty acids, predominantly linoleic acid, to give rise to  $\omega$ -O-acylCer (8). These latter epidermal-specific Cer is essential for lipid-matrix organization into lamellae and for the formation of the corneocyte lipid envelope since it is the precursor of protein-bound Cer (2,7). Although the SC lipids play a major role in the skin's vital properties, some mechanisms of lipid production are still to be described. The recent identification of genes involved in inherited lipid metabolism disorders provided new insights into pathways leading to the synthesis, transport, maturation and/or organisation of SC lipids (9,10).

There is growing evidence that the pathophysiology of Autosomal Recessive Congenital Ichthyoses (ARCI) is closely linked to a disturbance in SC lipid metabolism. ARCI are rare non-syndromic ichthyoses belonging to the heterogeneous group of Mendelian disorders of cornification (11). At birth many patients are "collodion babies". The skin phenotype subsequently consists in generalised scaling and variable erythroderma, with a wide spectrum of clinical presentations from lamellar ichthyosis to congenital ichthyosiform erythroderma. To date, mutations associated with ARCI have been described in 10 genes: ABCA12 (ARCI4; MIM 601277/242500), ALOX12B (ARCI2; MIM 242100), ALOXE3 (ARCI3; MIM 606545), CERS3 (ARCI9; MIM

615023), CYP4F22 (ARCI5; MIM 604777), LIPN (ARCI8; MIM 613943), NIPAL4 (ARCI6; MIM 612281), PNPLA1 (ARCI10; MIM 615024), SDR9C7 and TGM1 (ARCI1; MIM 242300) (12,13). Some of them have been addressed in many studies which have demonstrated their involvement in SC lipid metabolism. However, the function of the proteins encoded by NIPAL4, LIPN, SDR9C7 and PNPLA1 remains unclear.

Patatin-like phospholipase domain containing 1 (PNPLA1) is one of the 9 members of the PNPLA family, characterized by a highly conserved "patatin" domain. These proteins have diverse lipolytic and acyltransferase activities and play a key role in lipid metabolism (14,15). PNPLA1 is the less characterized member of this family. In human, the protein is expressed in the epidermis, predominantly in the granular layer (16,17). In mice, it was very recently reported that absence of functional Pnpla1 impaired the generation of  $\omega$ -O-acylCer leading to a lack of functional corneocyte-bound lipid envelope (18). Impairment of  $\omega$ -O-acylCer synthesis was confirmed using a PNPLA1-deficient cultured human keratinocytes.

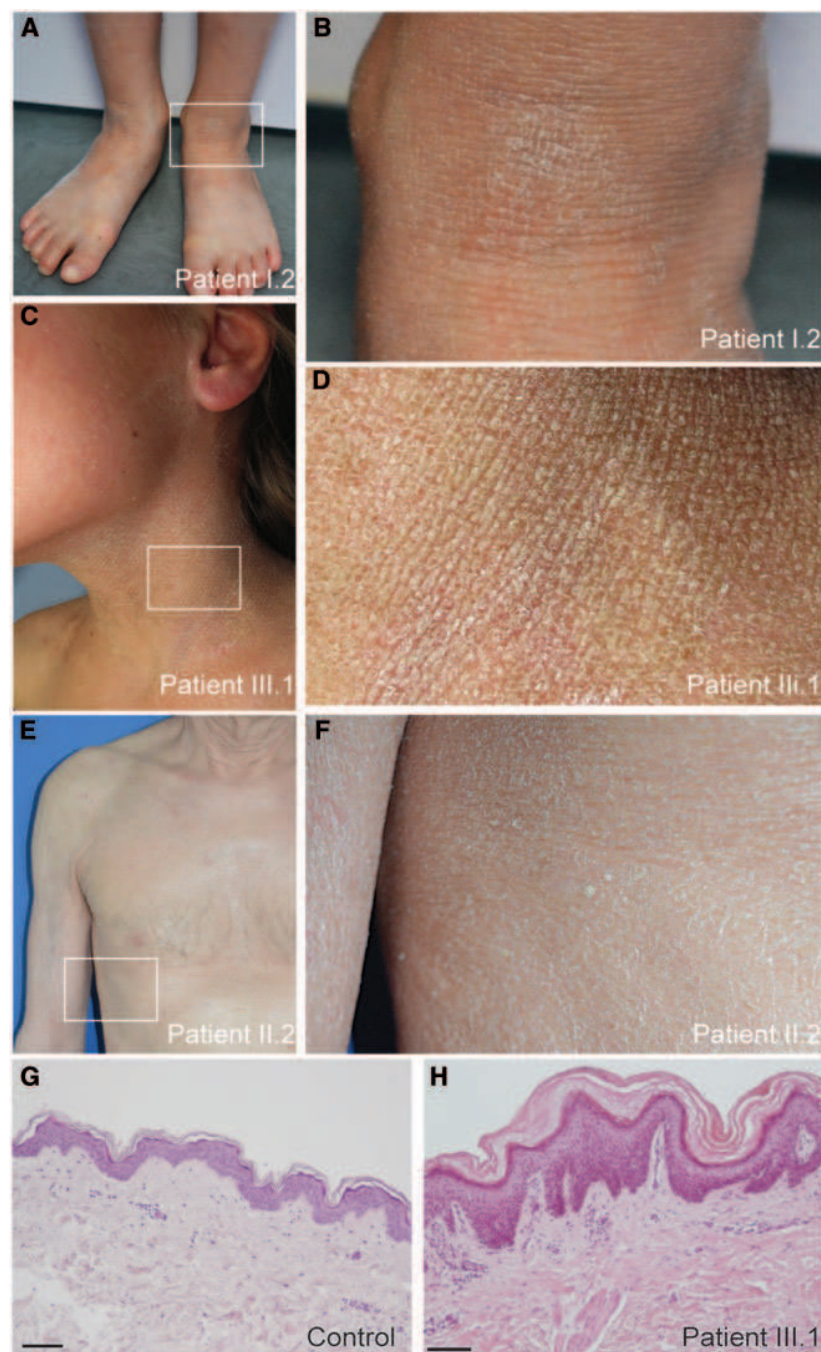
Here, using mice with targeted inactivation of Pnpla1, we confirm that the absence of Pnpla1 led to neonatal lethality due to severe epidermal permeability defects. This was accordingly associated to a blockade of  $\omega$ -O-acylCer synthesis that led to a profound impairment of the cornified lipid envelope. Electron microscopic observations, further suggested an impairment of the intercorneocyte lipid organization. In addition, our detailed profiling of epidermal sphingolipids revealed an increase in 1-O-acylCer production in Pnpla1-deficient epidermis. Finally, we describe five novel PNPLA1 mutations in patients with ARCI. Using SC from PNPLA1-mutated patients, we directly demonstrated a blockade of  $\omega$ -O-acylCer synthesis and an impairment of CE lipid coverage.

## Results

### Identification of novel PNPLA1 mutations in patients suffering from ARCI

A total of 5 patients from 3 non-consanguineous Caucasian families exhibited common characteristic features of ARCI (Table 1). There was no significant intra familial variability. Patients from family I were born as collodion babies. The disease remained stable over time for the majority of patients, whereas some reported a mild improvement. The patients were aged between 7 and 65 years. Some of them were treated with acitretin during certain periods of their life. All had a similar phenotype with diffuse ichthyosis of moderate severity, comprising fine whitish or soft brown scales with mild erythroderma and no keratoderma of the palms and soles. Some patients also presented with mildly brown hyperkeratotic skin





**Figure 1.** Clinical and histological features of patients with *PNPLA1* mutations. (A,B) Ankles and feet skin in patient I.2. (C,D) Neck skin in patient III.1. (E,F) Skin of the upper body in patient II.2. (B,D,F: enlargement of corresponding surrounded area in A,C,E). (G,H) Hematoxylin-eosin stained sections from healthy donor skin (control) and *PNPLA1*-mutated patient III.1 (scale bars = 50  $\mu$ m).

in the folds (Fig. 1A–F). Remarkably, the affected siblings from family II suffered from keratoconus and also had ectropion. Histopathological examination of skin biopsies from affected individuals showed acanthosis, hypergranulosis and compact hyperkeratosis (Fig. 1G–H).

These clinical and histological features indicated ARCI. Mutation screening of the patients' genomic DNA was performed by next generation sequencing for patient I-1, II-2 and III-1. No disease-causing variations were detected in the genes

*TGM1*, *NIPAL4*, *ALOX12B*, *CYP4F22*, *ALOXE3*, *ABCA12* and *LIPN*, triggering ARCI and present in our custom panel. However, the 3 patients had two heterozygous mutations in *PNPLA1* (Supplementary Material, Table S2). These mutations were confirmed by Sanger sequencing of the corresponding exons in the patients, as well as in the siblings of patient I-1 and patient II-2 (Table 1). We confirmed that the mutations were compound heterozygous by sequencing the corresponding exons from their respective parents or children. This was consistent with

Table 1. Clinical and genetic data of patients suffering from ARCI

Family	Patient	Sex (M/F)	Age at evaluation (Y)	Collodion baby at birth	Improvement over time	Ectropion	Hyperkeratosis	Acitretin in the past	PNPLA1 Nucleotide variant <sup>a</sup>	PNPLA1 Amino acid change <sup>b</sup>
I	1	M	12	+	+	-	+	-	c.[418T>C];[=], c.[820_820delC];[=]	[p.Ser140Pro];[=], [p.Arg274Glyfs*7];[=]
	2	F	7	+	+	-	+	-	c.[418T>C];[=], c.[820_820delC];[=]	[p.Ser140Pro];[=], [p.Arg274Glyfs*7];[=]
II	1	M	65	-	-	*	-	+	c.[266C>T];[=], c.[418T>C];[=]	[p.Pro89Leu];[=], [p.Ser140Pro];[=]
	2	F	54	-	-	*	-	+	c.[266C>T];[=], c.[418T>C];[=]	[p.Pro89Leu];[=], [p.Ser140Pro];[=]
III	1	F	12	-	-	-	-	-	c.[335C>A];[=], c.[350C>T];[=]	[p.Ser112Tyr];[=], [p.Thr117Met];[=]

<sup>a</sup>Reference sequence PNPLA1, NM\_001145717.1.

<sup>b</sup>Reference sequence PNPLA1: NP\_001139189.2.

F, female, M, male; Y, years; \*, keratoconus.

the inheritance mode from non-consanguineous parents. These five novel mutations as well as the previously reported PNPLA1 mutations are detailed in Table 2 and Supplementary Material, Fig. S1 (17,19–21). Three of the novel mutations were already referenced in some databases but showed in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) a frequency < 1/10,000 with no homozygous individuals for the alternate allele. The deletion c.820\_820delC is predicted to lead to a frameshift and to generate a premature stop codon 24 nucleotides downstream of the deletion (p.Arg274Glyfs\*7). This mutation can be predicted to result in either mRNA decay or in the synthesis of a truncated protein. The four missense mutations were located in the patatin-like domain of PNPLA1. Their impact on PNPLA1 structure and function was assessed using the *in silico* protein prediction tools Polyphen-2 (22) and SIFT (23). Both analyses gave concordant results with damaging consequences for all the mutations except variation Pro89Leu for which a deleterious consequence was predicted by Polyphen-2 only. Altogether, these data strongly suggest that these newly identified mutations are involved in the clinical phenotype of the patients.

### *Pnpla1* invalidation in mice induces a lethal phenotype with major defects in the epidermal barrier

In order to better understand the function of PNPLA1 in the epidermis, we developed *Pnpla1* knockout (KO) mice on a C57BL/6 background (Supplementary Material, Fig. S2). KO mice were identified using a PCR-based genotyping strategy and absence of a detectable level of *Pnpla1* mRNA was confirmed by RT-PCR analysis (Supplementary Material, Fig. S3A). We checked *Pnpla1* expression in various murine tissues by quantitative RT-PCR analysis of wild type (WT) embryos. As expected, the highest *Pnpla1* mRNA level was detected in the skin. About half was expressed in the stomach with very low or undetectable levels in the other tissues we analysed (Supplementary Material, Fig. S3B). Thus, in mice, *Pnpla1* seems to be mainly expressed in cornified squamous epithelia. As *Pnpla1* KO mice were obtained by insertion of a promoterless cassette including LacZ in the first intron of the endogenous *Pnpla1* gene, the activity of the endogenous *Pnpla1* promoter could be analysed in KO mice by X gal coloration assays. LacZ-reporter gene expression was thereby detected in the skin and cornified stratified squamous epithelium of the digestive tract from KO mice, thus confirming the results obtained by quantitative RT-PCR (Supplementary Material, Fig. S3C). In particular, a blue labelling in the epidermis was observed from the granular layer, consistent with the late expression of *Pnpla1* during keratinocyte terminal differentiation previously reported in humans and dogs (16,17). Persistence of the staining in the SC most probably related to  $\beta$ -galactosidase stability, since no longer transcription nor translation occurred in this epidermal layer.

Heterozygous *Pnpla1*<sup>+/<sup>tm1a</sup></sup> mice were phenotypically indistinguishable from WT mice and reproduced normally. *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> mice were born at the expected Mendelian ratio (WT 28%, heterozygous 47% and homozygous 25%, n = 213), but died soon after birth. They were easily recognized by the appearance of their skin, which was taut and shiny without normal skin folds. They showed a reduced mobility and the milk stripe was absent. E18.5 embryos obtained by caesarean delivery showed the same phenotype. We observed eversions of the lips (eclabium) (Fig. 2A), and the weight of the KO mice was significantly reduced compared to WT and heterozygous embryos, although this difference was minor (data not shown). Histological

**Table 2.** Novel (this study) and known PNPLA1 mutations associated with ARCI

Nucleotide change <sup>a</sup>	Amino acid change <sup>a</sup>	Exon	Type of variation	Protein domain	Polyphen-2.1 <sup>b</sup>	SIFT <sup>b</sup>	dbSNP no.	MAF in ExAC	References
c.56C>T	p.Ser19Leu	Exon 2	Missense	patatin-like	1	0	–	–	(19)
c.100G>C	p.Ala34Pro	Exon 2	Missense	patatin-like	1	0.01	–	–	(19)
c.100G>A	p.Ala34Thr	Exon 2	Missense	patatin-like	0.979	0.01	–	–	(21)
c.176C>T	p.Ala59Val	Exon 2	Missense	patatin-like	1	0.02	–	–	(17)
c.266C>T	p.Pro89Leu	Exon 3	Missense	patatin-like	0.993	0.13	–	–	This report
c.335C>A	p.Ser112Tyr	Exon 3	Missense	patatin-like	0.996	0.01	rs369445146	8.239e-06	This report
c.350C>T	p.Thr117Met	Exon 3	Missense	patatin-like	1	0	rs371307766	2.473e-05	This report
c.374C>A	p.Thr125Asn	Exon 3	Missense	patatin-like	1	0	–	–	(19)
c.387C>A	p.Asp129Glu	Exon 3	Missense	patatin-like	0.983	0.012	–	–	(20)
c.391G>T	p.Glu131*	Exon 3	Nonsense	patatin-like	–	–	–	–	(17)
c.418T>C	p.Ser140Pro	Exon 3	Missense	patatin-like	0.957	0	rs781053760	2.148e-05	This report
c.421A>G	p.Lys141Glu	Exon 3	Missense	patatin-like	0.982	0.02	–	–	(19)
c.488C>T	p.Pro163Leu	Exon 4	Missense	patatin-like	1	0.07	–	8.242e-06	(19)
c.514G>A	p.Asp172Asn	Exon 5	Missense	patatin-like	1	0	rs373148099	8.357e-06	(19)
c.820_820delC	p.Arg274Glyfs*7	Exon 7	Frameshift	central region	–	–	–	–	This report

<sup>a</sup>Reference sequences PNPLA1: NM\_001145717.1, NP\_001139189.2.

<sup>b</sup>Polyphen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; SIFT: [http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html).

dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism Database; MAF, minimum allele frequency; ExAC, Exome Aggregation Consortium.

examination of the skin revealed mild acanthosis (Fig. 2B, upper panel). This was consistent with faint staining of the suprabasal keratinocytes from KO mice with anti-keratin 6 antibody, whereas the immunolocalisation of the cell proliferation marker Ki67 in the basal layer of the WT and KO epidermis was similar (Fig. 2B, lower panel). The most striking histological difference in comparison with the WT epidermis was a thick, compact SC without the normal basket-weave appearance. The keratohyalin granules also appeared smaller and less numerous in the *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> than in the WT skin (Fig. 2B, upper panel). In agreement, quantitative RT-PCR analysis, western blot and immunochemical analysis revealed a decrease in the expression of the late differentiation proteins filaggrin and loricrin, normally stored in these granules (Fig. 2C, Supplementary Material, Fig. S4). In contrast, we did not observe any difference in the mRNA level of involucrin, keratin 10, corneodesmosin and desmoglein 1 between WT and KO skin (Supplementary Material, Fig. S4A). However, higher corneodesmosin levels were detected by western blot in the KO skin, most probably resulting from the retention of corneodesmosomes in the compact and hyperkeratotic SC (Fig. 2C).

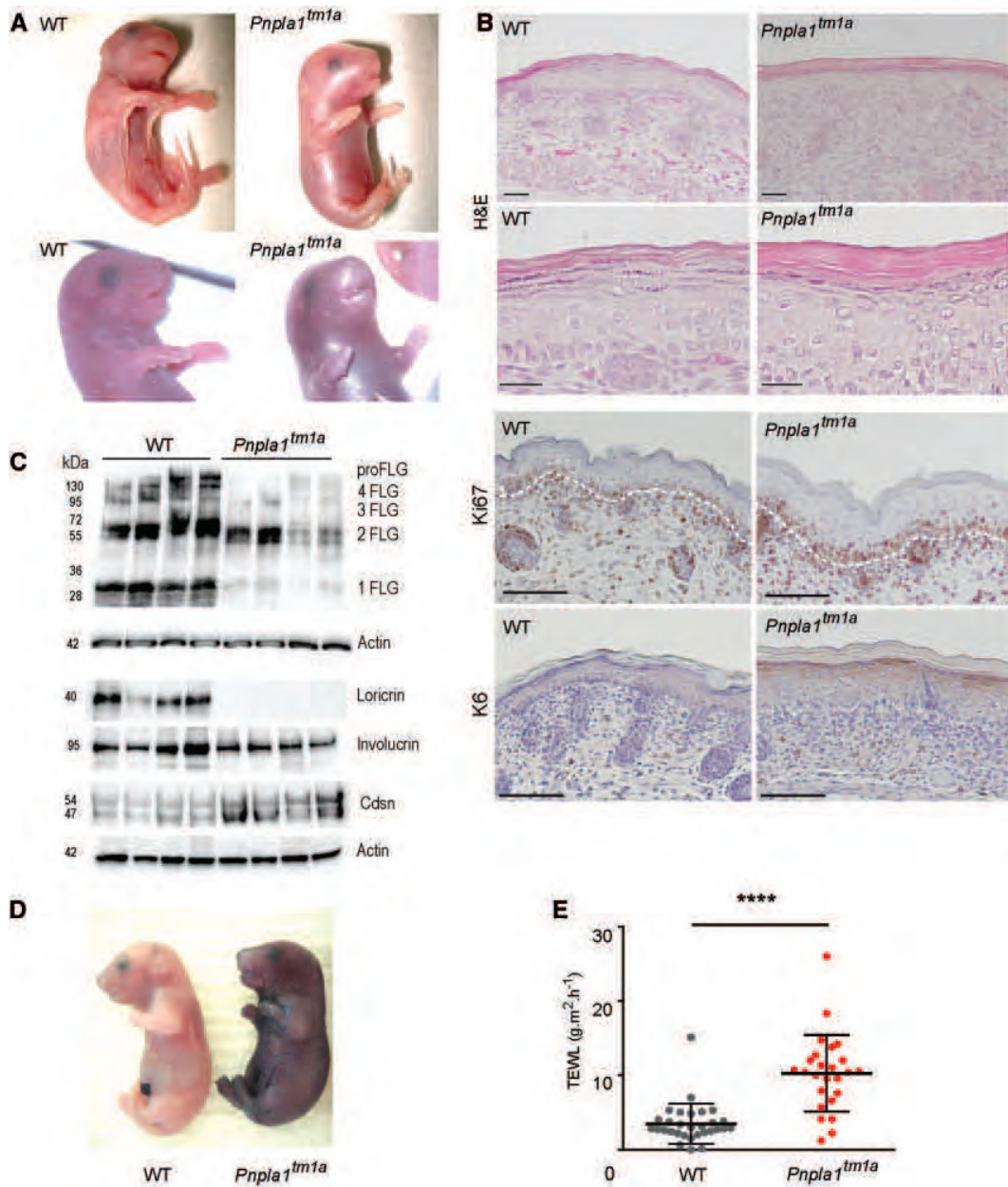
We assessed the outside-in permeability barrier by performing the dye penetration assay at E18.5 (24). The WT skin was completely impermeable, in contrast to the *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> skin which was permeable to toluidine blue dye, as indicated by unequivocal staining (Fig. 2D). We also assessed the inside-out water barrier by measuring the transepidermal water loss (TEWL) on whole embryos. *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> embryos showed a significantly increased TEWL in comparison to the WT (greater than two fold) (Fig. 2E). These findings clearly indicate that both the outside-in and the inside-out water barrier function were severely affected in the epidermis of *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> mice.

These macroscopic, histological and functional alterations observed in *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> murine skin are features that are reminiscent of ARCI and indicate that mice with defective *Pnpla1* develop a skin condition similar to human ARCI caused by *PNPLA1* mutations.

### Absence of *Pnpla1* in mice affects keratinocyte lipid organization in the SC

Electron microscopy (Fig. 3) confirmed hyperkeratosis of the skin in *Pnpla1*-deficient mice, as indicated by the presence of very compact and more numerous horny layers (Fig. 3A and B). Ultrastructural examination of the KO skin also confirmed that both the size and number of keratohyalin granules were reduced in comparison to WT skin (Fig. 3C and D). No difference in the morphology of the corneodesmosomes could be detected, but these junctional structures persisted to the upper layers of the cornified layer of the KO epidermis, consistent with the delay of the desquamation process (Fig. 3E–G). Of note, lipid droplets inside corneocytes were observed along the entire height of the SC (Fig. 3B,H). In addition, deposits resembling extruded contents of lamellar bodies in the transient zone were seen in the intercellular spaces of higher SC levels (Fig. 3I). Besides, the multilayer lipid structure, the lamellae, with the typical alternating electron-dense/electron-lucent repeat pattern were visualised in the SC of WT mice after ruthenium tetroxide post-fixation ( $n=5$ ) in an alternative manner, depending on the orientation of the section with respect to the electron beam. In contrast, we never observed such highly organized lamellae in the SC of *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> mice ( $n=3$ ) but only diffuse, loosely organized lipid structures in the intercellular spaces (Fig. 3J–L). We analysed lipid distribution in the epidermis by Oil Red O staining (Fig. 4A). We visualised some spots in the intercorneocyte space of the *Pnpla1*-deficient epidermis which were not observed in the WT epidermis. This uncommon accumulation of lipids in pearl-like structures was consistent with the electron microscopy observations in *Pnpla1*-deficient mice which suggested a disorganisation of the intercorneocyte lipids in the SC. Finally, to assess the impact of *Pnpla1* deficiency on covalently bound SC lipids, we purified CEs from WT and mutant epidermis and evaluated their maturity by a combination of Nile Red staining and involucrin immunostaining (Fig. 4B). The CEs from WT





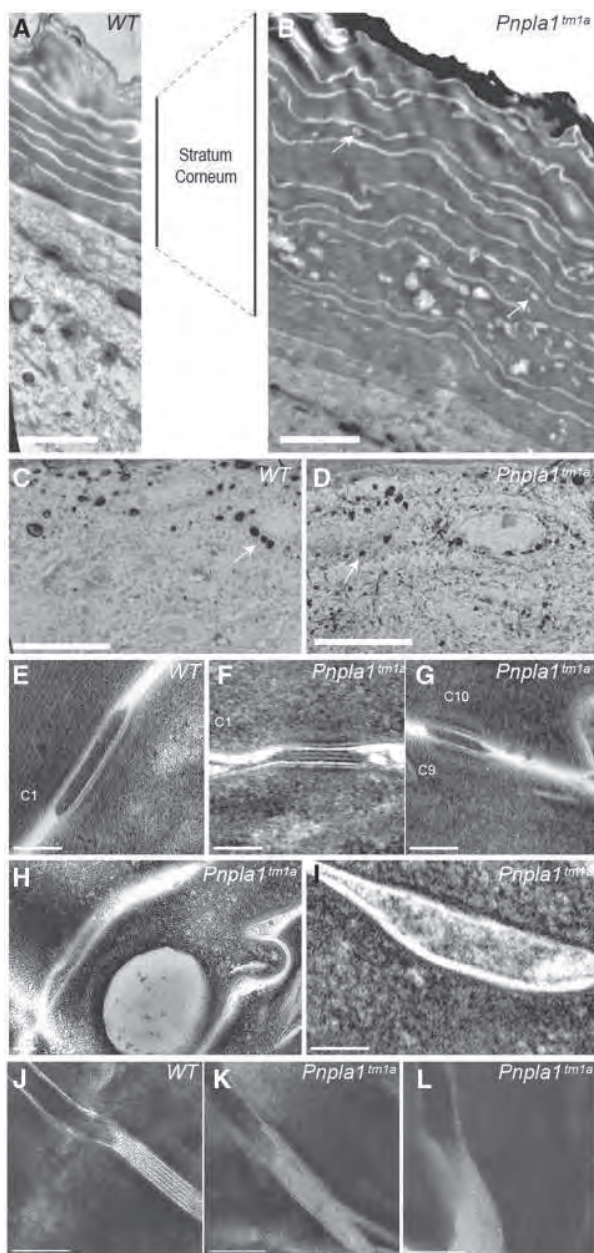
**Figure 2.** *Pnpla1* invalidation in mice induces a lethal phenotype with major defects in the epidermal barrier (A) Skin and lips appearance of WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*E18.5 embryos obtained by caesarean delivery. (B) Hematoxylin–eosin (H&E) coloration of skin sections from WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*E18.5 embryos (scale bars = 100  $\mu$ m and 30  $\mu$ m for low and high magnification images, respectively) (upper panel) and immunohistochemical staining of skin sections from WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*E18.5 embryos using antibodies specific to Ki67 and keratin 6 (K6) ( $n = 3$  for both genotype) (scale bars = 100  $\mu$ m) (lower panel). (C) Western blot analysis of Filagrin (FLG), Loricrin, Involucrin, Corneodesmosin (Cdsn) and Actin in protein extracts from WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*E18.5 embryos epidermis. (D) Barrier-dependent dye exclusion assay (toluidine blue) performed on WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*E18.5 embryos ( $n = 8$  for WT and  $n = 7$  for *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*). (E) Transepidermal Water Loss (TEWL) assay performed on whole body of E18.5 embryos ( $n = 30$  for WT and  $n = 25$  for *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ; Student's t-test.

mice were strongly and homogeneously stained with Nile Red, but were virtually all involucrin-negative. Conversely, only a few CE from KO epidermis were stained with Nile Red whereas most of them strongly reacted with the anti-involucrin antibody. This indicated that WT mice had mainly mature hydrophobic CE with a covalently linked external lipid monolayer, while CE from KO mice presented defective lipid coverage and were essentially composed of crosslinked proteins.

Taken together, these observations showed an obvious impairment of lipid processing and organization in the SC of *Pnpla1<sup>tm1a</sup>* mice.

#### *Pnpla1* is required for $\omega$ -O-acylCer synthesis in mice

Since Cer are shared components of the lamellae and the CE, we assessed the epidermal Cer composition using thin layer



**Figure 3.** *Pnpla1* deficiency in mice leads to important ultrastructural defects. (A–L) Transmission electron microscopy analysis of ultrathin sections of skin pieces (A–I) or cryosections (J–L) from WT (A, C, E, H, J) and *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> (B, D, F, I, K, L) E18.5 embryos. (A, B) SC appearance (scale bars = 2 μm); (C, D) Keratohyalin granules inside a granular keratinocyte (arrows) (scale bars = 100 nm); (E–G) Corneodesmosomes in the intercellular space of the SC (scale bars = 50 nm); (B, H) Lipid droplets inside corneocytes (arrows) (scale bars = 50 nm in H); (I) Deposits resembling extruded contents of lamellar bodies in intercellular space of the SC (scale bars = 100nm); (J–L) Lamellae visualization after ruthenium tetroxide post-fixation in the intercellular space of the SC (scale bars = 50 nm). (A–I): WT (n = 6) and *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> (n = 6) embryos were proceeded; (J–L): WT (n = 5) and *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> (n = 3) embryos were proceeded. Representative images are shown.

chromatography (Supplementary Material, Fig. S5A). *Pnpla1*-deficient mice had a modified sphingolipid profile with, in particular, disappearance of  $\omega$ -O-acylCer. Omega-O-acyl fatty acids (FA[EO]), the assumed degradation products of  $\omega$ -O-acylCer, were also dramatically reduced. LC-MS/MS analysis further

showed that in the *Pnpla1*-deficient epidermis, linoleic acid-esterified Cer (Cer[EOS]) had basically disappeared. Instead, mutant epidermis accumulated  $\omega$ -OH-Cer (Cer[OS]), an intermediate Cer species detected at low level in WT mice because it is normally processed rapidly in  $\omega$ -O-acylCer. Parallel to  $\omega$ -OH-Cer, corresponding glucosylCer (GlcCer[OS]) and corresponding free  $\omega$ -OH-fatty acid (FA[O]) also accumulated in the mutant mouse epidermis. At the same time,  $\omega$ -OH-Cer-corresponding sphingomyelins (SM[OS]), in tiny amounts in WT mice, increased in KO mice (Fig. 4C, Supplementary Material, Fig. S5B and C). Moreover, in accordance with reduced  $\omega$ -O-acylCer levels, we observed a significant albeit moderate increase in free linoleic acid (Fig. 4D). Consistent with the thin layer chromatography analysis, LC-MS/MS revealed a strong decrease in  $\omega$ -O-acyl fatty acids (FA[EO]) (Supplementary Material, Fig. S5C). Finally, the level of protein-bound Cer (Cer[POS]) and their catabolites, the protein-bound fatty acids (FA[PO]), was drastically reduced (Fig. 4C and Supplementary Material, Fig. S5C). As both species essentially derive from the lipid CE, this confirmed the defective lipid coverage of the CEs from *Pnpla1*-deficient mice observed by Nile Red/involutrin double staining.

Furthermore, although only a tendency, mutant mice doubled the proportion of 1-O-acylCer, a group of Cer esterified to very long acyl chains in the 1-O- position (25). In contrast to normal skin,  $\omega$ -OH-Cer was now also found to be 1-O-esterified (Cer[1-O-EOS]).

The perturbations in Cer composition caused by *Pnpla1* deficiency were not correlated with significant changes in the expression level of genes involved in epidermal lipid metabolism, as shown by qRT-PCR analysis (Supplementary Material, Fig. S5D).

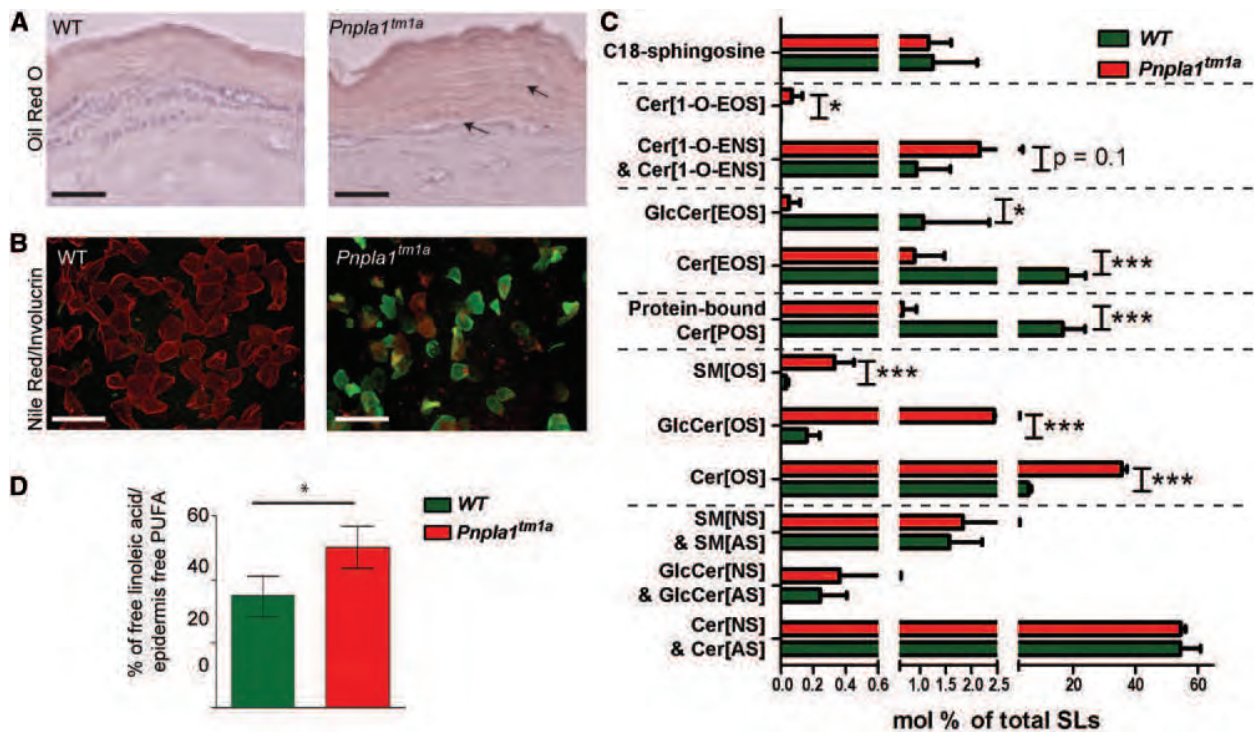
### Lipid perturbations revealed in mice are also present in PNPLA1-mutated patients with ARCI

In order to examine whether specific changes in SC lipids evidenced in the *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> mice were also present in our patients suffering from ARCI, we collected non-invasively successive tape strips from the skin of patients II.1, II.2 and healthy donors. CEs prepared from these strips were assessed for their maturity by Nile Red/involutrin double staining (Fig. 5A). CEs from healthy donors were mainly stained with Nile Red while a few were involutrin-positive. In contrast, almost all CEs prepared from patient II-1 reacted with the anti-involutrin antibody. Cer composition in the SC of healthy individuals and patients was examined by LC-MS/MS analysis of lipids prepared from the strips (Fig. 5B). As observed in *Pnpla1*-deficient mice, the results showed a dramatic reduction in  $\omega$ -O-acylCer and an accumulation in  $\omega$ -OH-Cer in the SC of patients II-1 and II-2. These latter observations, together with the strong resemblance of the skin phenotype between PNPLA1-mutated patients and *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> mice, corroborate an essential role of PNPLA1/*Pnpla1* in epidermal barrier permeability through its involvement in  $\omega$ -O-acylCer synthesis.

### Discussion

*Pnpla1* deficiency in mice led to neonatal lethality. *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> E18.5 embryos and newborns had a thick, taut and shiny skin with a shellacked appearance. This “collodion-like” appearance was strongly evocative of the collodion baby observed in humans. This phenotype was associated with impairment in the outside-in and inside-out permeability barrier function.





**Figure 4.** Alteration of SC lipids in *Pnpla1<sup>tm1a</sup>* mice and PNPLA1-mutated patients. (A) Oil Red O staining of lipids on skin sections from WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>* E18.5 embryos (arrows show neutral lipids accumulation; scale bars = 25  $\mu$ m). (B) Double staining of CEs from the epidermis of WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>* E18.5 embryos using Nile Red (red) and an antibody specific to involucrin (green) (scale bars = 100  $\mu$ m). (C) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of lipid extract from epidermis of WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>* E18.5 embryos. Only sphingolipids with the major sphingoid base C18-sphingosine were analyzed. Absolute molar data were normalized to the total amount of all sphingolipids, which were determined. All sphingolipid species quantified in LC-MS/MS are listed in Supplementary Material, Table S8A and B. For other normalization and for zoom in of minor subgroups see Supplementary Material, Figure S5B. (D) Gas-liquid chromatography (GC) analysis of lipid extract from epidermis of WT and *Pnpla1<sup>tm1a</sup>* E18.5 embryos. (A, B and D:  $n = 3$  for both genotypes; C:  $n = 9$  WT, 7 *Pnpla1<sup>tm1a</sup>*). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; Student's  $t$ -test.

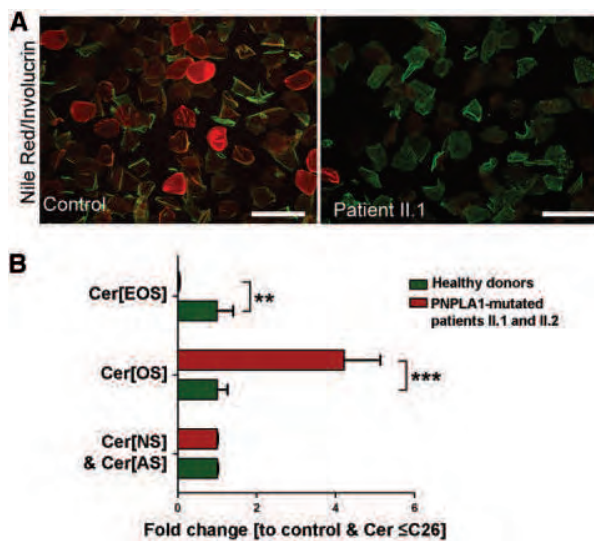
Furthermore, the tightness of the skin led to reduced mobility and thus failure to suckle maternal milk. Death usually occurs in a window of 12–24 h after birth in the case of non-feeding newborn mice (26). *Pnpla1*-deficient mice died mostly within the first 12 h of life. Thus, *Pnpla1*-deficient mouse lethality was most probably due to severe dehydration caused by both an inability to feed and epidermal barrier impairment. Similar lethal phenotypes have also been reported in mice invalidated for other genes causing ARCI (27–31). Concerning patients suffering from ARCI, a survey reported that mortality was as high as 50% in 1960 but nowadays is only 5% (32). Thus, the discrepancy in phenotype severity between humans and mice could result from the fact that, in contrast to mice, patients born as colloidion babies benefit from intensive care.

$\omega$ -O-acylCer are an epidermal-specific Cer species that are essential for the formation and maintenance of the epidermal barrier. Their production initially requires ultra-long chain (C26 to C36) fatty acid synthesis. This first step depends on fatty acid elongases encoded by *ELOVL1* and *ELOVL4* (12,33–35). Then CYP4F22, a member of the P450 cytochrome superfamily, preferentially  $\omega$ -hydroxylates C28–C36 ultra-long chain fatty acids and the latter are subsequently used by Ceramide synthase-3 to produce  $\omega$ -OH-Cer (28,36). Finally, a hitherto unknown acyltransferase catalyses the formation of an ester bond between fatty acid, predominantly linoleic acid, and the  $\omega$ -OH-Cer to form  $\omega$ -O-acylCer.

In this report, we confirm that *Pnpla1*-deficient mice had a blockade in  $\omega$ -O-acylCer synthesis. Quantification of different

species of Cer in the mutant epidermis highlighted a drastic reduction in  $\omega$ -O-acylCer with a concomitant accumulation of  $\omega$ -OH-Cer. A similar lipid profile was described in mice with triglyceride lipase cofactor *Abhd5* deficiency (37,38). *Abhd5* and *Pnpla1* are both required for  $\omega$ -O-acylCer synthesis from  $\omega$ -OH-Cer. In contrast to adipocyte triglyceride metabolism where it acts as a cofactor of adipocyte triglyceride lipase (*ATGL/Pnpla2*), *Abhd5* appears not to act likewise in epidermal triglyceride metabolism (38), leaving its molecular role in  $\omega$ -O-acylCer metabolism open. Regarding PNPLA1, it has been shown that it is not a triglyceride hydrolase (17,18). In accordance, our *Pnpla1*-deficient mice have a slight but significant increase in free fatty acid suggesting a defect in the incorporation rather than in the release of fatty acid. In conclusion, we propose that *Pnpla1* could be involved in free fatty acid incorporation on  $\omega$ -OH-Cer, the last step in  $\omega$ -O-acylCer production. However, an accurate characterization of PNPLA1 activity at the molecular level is required to confirm this hypothesis.

As recently shown by Grond et al. (18), impairment of  $\omega$ -O-acylCer was associated with an impairment of cornified lipid envelope in our *Pnpla1*-deficient mouse model. Our electron microscopy observations further suggest that those lipid abnormalities led to a defective intercorneocyte lipid organisation with absence of the typical lamellae structure. These observations are consistent with the important role of  $\omega$ -O-acylCer in the arrangement of intercorneocyte lamellae already reported in literature (39,40).



**Figure 5.** Lipid perturbations evidenced in mice are also present in *PNPLA1*-mutated patients with ARCI. (A) Double staining of CEs from healthy donors (control) and *PNPLA1*-mutated patient II.1 using Nile Red (red) and an antibody specific to involucrin (green) (scale bars = 100  $\mu$ m). (B) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of lipid extract from tape stripes from healthy donors or *PNPLA1*-mutated patients with ARCI. Only Sphingolipids with a C18-sphingosine were recorded. Fold changes of Cer species were determined by using an internal standard (see Methods). (A:  $n = 3$  healthy donors each 1 sample, patient II.1, 3 samples; (B)  $n = 6$  healthy donors each 1 sample, patients II.1 and II.2 each 3 samples). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \*\*\* $P \leq 0.001$  Student's *t*-test.

We also report that the lack of virtually all  $\omega$ -O-acylCer was associated with a slight increase in 1-O-acylCer in the *Pnpla1*-deficient epidermis. Interestingly, this includes the *de novo* appearance of 1-O-acylCer containing an  $\omega$ -OH-Cer backbone (Cer[1-O-EOS]) derived from  $\omega$ -OH-Cer accumulation. However, this latter represents less than 5% of all 1-O-acylCer. 1-O-acylCer is a new class of epidermal Cer esterified to (very) long acyl chains in 1-O- position, recently identified in humans and mice (25). 1-O-acylCer increase has previously been observed in barrier-deficient GlcCer-synthase deficient (keratinocyte-specific) mice (25) as well as in *CerS3*-deficient mice (unpublished data). Due to its predictive physicochemical properties, 1-O-acylCer has been proposed to contribute to water permeability barrier function. However, in our model, the overall increase in 1-O-acylCer is unable to compensate the drastic reduction of  $\omega$ -O-acylCer. Nevertheless, it would be interesting to further investigate the role of 1-O-acylCer in the SC.

We identified 5 novel *PNPLA1* mutations in patients with ARCI. The patatin-like domain of *PNPLA1* possesses the characteristic features shared by all members of the *PNPLA* family (14). Notably, it contains an active site with a serine-aspartate catalytic dyad and an oxyanion hole that stabilizes the enzyme-substrate transition state (41) (Supplementary Material, Fig. S1). It also presents a conserved core module where the nucleophilic serine is located in a tight turn between a  $\beta$ -sheet and an  $\alpha$ -helix in a well conserved  $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  core structure. The 4 novel missense mutations we identified occur in residues that are located in the patatin-like domain of *PNPLA1*, like the previously described mutations. None of these substitutions directly affected the catalytic dyad but conserved positions, which were predicted to be deleterious for the encoded protein. The fifth mutation we identified was a frameshift leading to a predicted protein

deleted of the C-terminal part of the full-length *PNPLA1*. This latter region contains a proline-rich domain which is conserved among the adiponutrin-like subgroup of the *PNPLA* family (*PNPLA1*-*PNPLA5*) and involved in lipid binding. In particular, some *PNPLA2* mutations causing Neutral Lipid Storage Disease (NLS) lead to a loss of the C-terminal domain of the encoded protein. This prevented the proper localization of the enzyme to lipid droplets (42,43). Furthermore, a homozygous nonsense mutation that led to the loss of 74 amino acids in the highly conserved C-terminal region of *PNPLA1* caused ARCI in dogs (17). Thus the frameshift mutation found in patients from family I most probably leads to a non-functional protein. Finally, our data suggest that *PNPLA1* mutations impaired *PNPLA1* activity. Indeed using SC from *PNPLA1*-mutated patients, we directly demonstrate a blockade of  $\omega$ -O-acylCer. Interestingly, we revealed a subsequent impairment of the lipid coverage of CE purified from *PNPLA1*-mutated patients.

In conclusion, detailed analysis of *Pnpla1*-deficient mice and analysis of SC from *PNPLA1*-mutated patients allow us to validate that *PNPLA1/Pnpla1* is an essential actor necessary for the formation of  $\omega$ -O-acylCer, an epidermis-specific Cer that plays a crucial role in the establishment and maintenance of the skin permeability barrier. This insight into the metabolism of SC lipids in the normal epidermis enhances our understanding of the pathophysiology of ARCI.

## Materials and Methods

### Subjects and primary samples

Skin biopsies and blood samples were collected for diagnosis and gathered in a biological collection ( $n^{\circ}$ DC-2011-1388, French National Ethics Committees). Clinical and genetic information on the subjects were reported in Table 1. Written informed consent was obtained from all patients or from their legal representative in the case of minors, allowing us to use the taken biological specimens collected for research purposes. Consequently, the work presented in this article did not have to be submitted to the local Ethics Committee.

### Molecular genetic analysis

DNA was isolated by standard procedures from peripheral white blood cells of the patients and their parents. Mutation screening was performed by next generation sequencing using the Personal Genome Machine (PGM, Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific), and the AmpliSeq technology (Ion Torrent). Using the AmpliSeq Designer tool (ampliseq.com; v2.0), an AmpliSeq Custom Panel was designed to cover 13 genes known to be involved in ichthyoses, comprising exonic regions, exon-intron boundaries as well as 3' and 5' Untranslated Regions (UTRs), i.e. a target region of 89.25 kb (Supplementary Material, Table S3). A total of 590 primer pairs, covering 92.14% of the target, were designed and synthesized.

Library construction and sequencing were performed at the GeT-Purpan core facility (Genome and Transcriptome, GenoToul, France). In brief, genomic DNA samples were checked for purity and quantity using Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) and a concentration was estimated using Qubit v3 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). Libraries were produced using 10 ng of genomic DNA for each sample and each pool of AmpliSeq primers, with the Ion AmpliSeq library kit v2.0 (Ion Torrent), and Ion Xpress Barcodes, following the guidelines of the supplier.

Final libraries were individually controlled and quantified on High Sensitivity DNA chips of BioAnalyzer (Agilent Technologies). Libraries from a total of 16 patients were then pooled, templated on Ion Sphere Particles using One Touch 2 instrument with HiQ kit, and finally sequenced on the Ion Torrent PGM using the sequencing HiQ chemistry, 200 bases run workflow, on a 316 v2 Ion chip.

The generated data produced were processed using Ion Torrent Suite Software (Thermo Fisher Scientific) for quality filtering, trimming, demultiplexing, aligning on the AmpliSeq design reference, and variant calling. 285,632 usable reads were produced for the 3 patients and the coverage per base was >30X for more than 95% of the bases. Variant caller files were then transferred using Ion Reporter Software (v5.0, <http://ionreporter.lifetechnologies.com/>, Thermo Fisher Scientific) for filtering and annotation of detected variants.

The PNPLA1 variants were confirmed by Sanger sequencing. In brief, the corresponding exons and intron-exon boundaries were amplified by polymerase chain reaction using specific primers (Supplementary Material, Table S4) and sequenced using the BigDye Terminator v3.1 chemistry (Applied Biosystems) and the ABI3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) available on the GeT-Purpan Core facility (GenoToul, France).

All variants have been submitted to NCBI ClinVar Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

### Generation of *Pnpla1*-deficient mice

*Pnpla1*-deficient (B6N-Tac;B6N-A<sup>tm1BrdPnpla1<sup>tm1a</sup>(K<sup>o</sup>MP)<sup>Wtsi</sup>/Ics</sup>, abbreviated to *Pnpla1*<sup>tm1a</sup> in this report) mice carry a knockout-first allele, in which a promoterless cassette including *LacZ* and *neo* genes was inserted in the first intron of the *Pnpla1* gene flanked by FRT sites. *LoxP* sites flank the critical exons (exon2 and 3 of *Pnpla1* gene in knockout-first design) (Supplementary Material, Fig. S2). See <http://www.mousephenotype.org/data/search/gene?kw=pnpla1> for more details.

### Animals

All experiments with animals were approved by local ethic committee UMS006 CEEA-122 and carried out according to our Institutions Guidelines and EU legislation. Mice were housed and maintained in the animal facilities (UMS006 Inserm, Toulouse) under pathogen-free conditions. Mice were killed by Cervical dislocation and decapitation. All efforts were made to minimize suffering.

Timed-matings were performed. Female mice in matings were checked for vaginal plugs and the gestational stage was estimated from the time of a positive plug + 0.5 days. Foetuses were collected on embryonic day 18.5 (E18.5).

### Mouse genotyping

Genomic DNA was isolated from mouse embryo-tails using Nucleospin (Macherey-Nagel). Genotypes were confirmed by PCR using Econotaq Plus Green (Euromedex). The *Pnpla1* forward primer (5'- GGGGCACCTTAAGGTGAGGATCGTT -3') and the *Pnpla1* reverse primer (5'- GAAAGCCTGTGACCACTGACCCAG -3') were used and produce a wild type PCR product of 247 bp and a cKO allele product of 297 bp.

### RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNAs from murine tissues were extracted with RNeasy (Qiagen). The quantity of RNA was determined using the Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Quality was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyser System with the RNA 6000 Nano kit. All the samples present a Ring Integrity Number (RIN) above 8. Reverse transcription was carried out using the PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara). Amplification assays were performed with the 7300 Real Time PCR system using the Sybr qPCR SuperMix with ROX (Invitrogen) and specific primer (Supplementary Material, Table S5). Fluorescence was quantified as Ct (threshold cycle) values. Samples were analysed in triplicate, with differences between the three Ct values lower than 0.3. Relative levels of gene expression between samples were determined using *Hprt* expression for normalisation. Specificity was assessed by sequencing the quantitative RT-PCR amplicons.

### Antibodies

The commercially available antibodies used in the study are listed in Supplementary Material, Table S6. Mouse monoclonal antibody F28-27, raised against human corneodesmosin and which cross reacts with the mouse counterpart, was used as previously described (44). Mouse monoclonal antibody AHF3, recognizing human (pro)filaggrin, was used as previously described (45).

### Light microscopy

Human and murine skin tissues were fixed in 4% formalin in PBS pH 7.4 for 24 h and then embedded in paraffin. For histological analysis, paraffin sections of 5 µm were stained with hematoxylin and eosin and mounted in Eukitt mounting medium (Euromedex). For immunohistological analysis, paraffin or cryosections (5 µm) were blocked in 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. For some antibodies, epitope retrieval was carried out for 40 min at 95 °C in Target Retrieval Solution pH 6.1 (DAKO) or in 50 mM glycine-HCl pH 3.5. Sections were then incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature. Dilutions of antibodies are listed (Supplementary Material, Table S6). Rabbit and mouse antibodies were detected with the ImmPRESS anti-rabbit IgG and the ImmPRESS anti-mouse IgG (peroxidase) kit (Vector Laboratories), respectively. Peroxidase activity was revealed with the ImmPACT DAB (Vector Laboratories). Sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt mounting medium. For immunofluorescence, Alexa Fluor® 555-conjugated goat anti-mouse IgG (Life technologies) was used at 1:1000 and sections were counterstained with DAPI and mounted in Mowiol.

For lipid staining, 5 µm-thick cryosections were fixed in 4% formalin in PBS pH 7.4 for 30 min at room temperature. Following a brief rinse in PBS and 30% isopropanol, sections were stained with freshly prepared Oil Red O (Sigma-Aldrich) working solution for 5 min at room temperature, rinsed in 30% isopropanol and distilled water, and mounted in Mowiol.

For β-Galactosidase detection with the chromogenic substrate X-Gal (X-Gal staining) 5 µm cryosections were stained using a LacZ Tissue staining kit (InvivoGen) overnight at 4 °C. Sections were then counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt mounting medium.



Images were taken using a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a Nikon DXM 1200C digital camera and NIS image analyses software. For immunofluorescence staining, images were acquired using an Apotome ZEISS Inv microscope equipped with AxioCam HRm Rev.3 and Zen 2012 software.

### Electron microscopy

The skin was cut in pieces of  $\approx 1\text{mm}^2$ , fixed in 2% glutaraldehyde in Cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2, EMS, Hatfield, PA) for 24 h at 4°C and post-fixed with 1% OsO<sub>4</sub> in Cacodylate buffer (Cacodylate 0.1 M, OsO<sub>4</sub> 1%, EMS) for 1 h at 4°C. For lamellae visualization, 50  $\mu\text{M}$  skin cryosections were fixed in 2% glutaraldehyde in Cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2, EMS, Hatfield, PA) for 24 h at 4°C and post-fixed with 1% OsO<sub>4</sub> in Cacodylate buffer (Cacodylate 0.1 M, OsO<sub>4</sub> 1%, EMS) for 1 h at 4°C followed by two post-fixation with 0.2% RuO<sub>4</sub>, 0.25% K<sub>3</sub>Fe (Cn)<sub>6</sub> in Cacodylate buffer for 1 h at 4°C.

Samples were then dehydrated in a graded acetone series and embedded in Spurr's resin. After 48 h of polymerization at 60°C, ultrathin sections (80 nm thick) were mounted on 75 mesh formvar-carbon coated copper grids. Sections were stained with Uranylless (Delta Microscopies) and lead citrate. Grids were examined with a TEM (Jeol JEM-1400, JEOL Inc) at 80 kV. Images were acquired using a digital camera (Gatan Orius, Gatan Inc).

### Skin barrier function assays

Epidermal barrier function was assessed as previously described (46). In brief, TransEpidermal Water Loss (TEWL) was measured on whole embryo using a TM 300 tewameter (Courage & Khazaka electronic). Data are expressed in  $\text{g/m}^2/\text{h}$ . For the dye penetration assay, E18.5 embryos were dehydrated in an ascending methanol series up to methanol 100%, rehydrated for 3 min in PBS and stained with 0.1% toluidine blue in PBS for 10 min at room temperature. After washing in PBS for 15 min, the embryos were photographed with a digital camera (Sony DSC-W50).

### Epidermal protein extraction and western blot

Dermo-epidermal cleavage of E18.5 embryo skin was performed by heat treatment and epidermal protein was sequentially extracted in three different fractions by the Fast Prep system (MP Biomedicals) using successive extraction buffers (EB) (EB 1: Tris 40 mM, EDTA 10 mM, NP40 1%, pH 7.4; EB2: Tris 40 mM, EDTA 10 mM, urea 8M, pH 7.4; EB3: Tris 40 mM, EDTA 10 mM, urea 8M, DTT 50 mM, pH 7.4). Determination of the protein content was assessed by Bradford quantification (BioRad). Equal volumes of protein extracts were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. The blots were probed with commercially available primary antibodies diluted as recommended by the manufacturer (Supplementary Material, Table S6) then with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Life Technologies) at 1:10000. Protein quantities were normalised by actin detection. Detection was performed with ECL-Prime Reagent (GE Healthcare).

### Isolation and analysis of cornified envelopes

Embryo mouse skin (1  $\text{mm}^2$ ) or tape stripping performed in patients and healthy controls were boiled in CE isolation buffer

(100 mM Tris-HCl pH 8.5, 20 mM DTT, 5 mM EDTA) containing 2% SDS for 10 min at 95°C, stirring vigorously. CEs were centrifuged at 12,000 *g* and resuspended in CE isolation buffer containing 2% SDS. This extraction procedure was repeated three times. Purified CEs were then washed three times in the isolation buffer containing 0.2% SDS and stored at 4°C.

CE maturity was assessed as described (47). In brief, appropriate concentrations of CE suspension were dropped onto a slide-glass and air-dried. They were fixed in acetone at -20°C for 10 min, and hydrated in phosphate-buffered saline. The primary antibody allowed a reaction for 1 h at room temperature. A secondary antibody was then applied for 1 h at room temperature. After washing, the CEs were stained with Nile red solution (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 30 min at room temperature. Slides were then mounted in Mowiol. Images were taken by fluorescence microscopy using a Nikon eclipse 80i microscope equipped with a Nikon DXM 1200C digital camera and NIS image analysis software.

### Lipid extraction and liquid chromatography tandem-mass spectrometric (LC-MS/MS) lipid analysis of sphingolipids

For all experiments, investigators were blinded for sample identity. The epidermis was separated from the dermis and extracted for lipids according to Jennemann et al. (28). In brief, the skin was incubated with thermolysin (2 h, 37°C) at pH 7.4. Then the epidermis was isolated with tweezers, cut in small pieces and freeze-dried. Dried tissue was extracted three times with mixtures of chloroform/methanol/water. Afterwards the residual pellet was washed again 3 times with methanol and two times with 95% methanol before protein bound lipids were released with 1 M KOH in 95% methanol at 60°C within 2 hours and subsequently neutralized with acetic acid. The pooled extracts were desalted with RP-18 cartridges and aliquots corresponding to 0.1 mg epidermis dry weight were mixed with internal lipid standards for analysis by LC-MS/MS using an Aquity I-class UPLC and a Xevo TQ-S "triple-quadrupole" instrument, both from Waters. Lipids were separated on a 100 mm CSH-C18 column (2.1  $\times$  100 mm; 1.7  $\mu\text{m}$ , Waters) using a gradient between 57% solvent A (50% water, 50% methanol) and 95% solvent B (99% isopropanol, 1% methanol), both containing 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid as additives (Supplementary Material, Table S7). Lipids analysed for Fig. 4C are listed in Supplementary Material, Table S8 and were detected by multi-reaction monitoring (MRM) (Supplementary Material, Table S8). The following internal standards were used for quantification: Cer(d18:1;14:0)\*, Cer(d18:1;19:0)\*, and Cer(d18:1;31:0)\* were used to quantify Cer[NS]-, [AS]-, [OS]- and [POS]-. GlcCer(d18:1;14:0)\*, GlcCer(d18:1;19:0)\*, GlcCer(d18:1;25:0)\*, and GlcCer(d18:1;31:0)\* were used to quantify GlcCer [NS]-, [AS]-, and [OS]-. SM (d18:1;12:0) from Avanti Polar lipids, SM(d18:1;17:0) from Avanti Polar lipids, SM(d18:1;10:0-pyrene) from Sigma Aldrich (N-(10-[1-pyrene]decanoyl) sphingomyelin, P-4275) and SM(d18:1;31:0)\* were used to quantify SM[NS]-, [AS]-, and [OS]. For these sphingolipids a calibration curve was calculated from the internal standards for each sample in Microsoft-Excel [function "VARIATION"] to consider potential changes of intensities which are due to increasing *m/z*-ratios of sphingolipid ions. Cer [EOP]- (d18:1;h32:0;18:2) was used to quantify Cer [EOS]- and GlcCer [EOS]-. For quantification a factor of 0.11 was considered, which resulted from the intensity ratio of equal concentrations of internal standard Cer [EOP]- (d18:1;h32:0;18:2) to external standard Cer [EOS]-

(d18:1;h32:0;18:2), both of which had been published previously(48). For quantification of GlcCer [EOS]-, the intensity ratio of internal standards Cer [NS]-over GlcCer [NS]- (0.4) was taken in addition into account. Cer [1-O-ENS]- (18:1;d18:1;17:0) from Avanti Polar Lipids was used to quantify Cer [1-O-ENS]-, [1-O-EAS]-, and [1-O-EOS]-as previously published(25). To determine the fold change of Cer [EOS]- in human samples, Cer [1-O-ENS]- (18:1;d18:1;17:0) was used as internal standard. \*: Internal standards marked with a \* had been synthesized previously (49).

### Liquid chromatography tandem-mass spectrometric (LC-MS/MS) analysis of $\omega$ -esterified and free $\omega$ -hydroxy fatty acids

The identical aliquots of the lipid extracts prepared for sphingolipid analysis were also used to determine free  $\omega$ -hydroxylated fatty acids and  $\omega$ -esterified fatty acids using the identical LC-MS/MS system and the identical chromatographic conditions as described for sphingolipid analysis. Multiple reaction monitoring was used to selectively detect free  $\omega$ -hydroxylated fatty acids and  $\omega$ -esterified fatty acids and the corresponding transition parameters are listed in Supplementary Material, Table S9. MRM screening was performed for the individual compounds listed in Supplementary Material, Table S10. Relative amounts were calculated from the peak area ratios of free ( $\omega$ -hydroxylated) fatty acids or  $\omega$ -esterified fatty acids over the internal standard  $^{13}\text{C}_{18}$ -stearic acid and normalized to the total amount of detected non-hydroxy or alpha-hydroxy fatty acids.

### Fatty acid methyl ester (FAME) analysis

The E18.5 embryo epidermis (15–30 mg) was crushed twice in 1.5 ml of methanol/5 mmol/L ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (2:1 vol/vol) using a Fast Prep (MP Biochemicals), then extracted according to Blich and Dyer (50) in dichloromethane/methanol/water (2.5: 2.5: 2.1, v/v/v), in the presence of the internal standards heptadecanoic acid (2  $\mu\text{g}$ ). The lipid extract was methylated in 14% boron trifluoride methanol solution (Sigma-Aldrich, 1 ml) and heptane (1 ml) at RT for 10 min. After adding water (1 ml) to the raw preparation, FAMES were extracted with heptane (3 ml), evaporated to dryness and dissolved in ethyl acetate (20  $\mu\text{l}$ ). FAMES (1  $\mu\text{l}$ ) were analysed by gas-liquid chromatography (51) on a Clarus 600 Perkin Elmer system using a Famewax RESTEK fused silica capillary columns (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness). The oven temperature was programmed from 110 °C to 220 °C at an increment of 2 °C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and the detector were heated 225 °C and 245 °C, respectively.

### Thin layer chromatography ceramide profiling

Ceramides from epidermis E18.5 embryos were analysed by means of high-performance thin layer chromatography. The lipid extract were dissolved in chloroform/methanol/water (10:10:1, vol/vol/vol), and deposited on a HPTLC LiChrospher Silica Gel 60 F254S glass plates (Merck), which had been developed with chloroform/methanol (9/1) and dried before. The TLC plates were developed with chloroform/methanol/acetic acid (60/35/8) until a height of 2.5 cm, dried, developed with chloroform/methanol/acetic acid (190/9/1) until a height of 8.5 cm, dried and developed with chloroform/methanol/acetic acid 190/9/1 until the top (10 cm). After drying, the chromatogram was sprayed with 10% (wt/vol) cupric sulphate hydrate in 8% (wt/vol) phosphoric acid

and charred by heating at 180 °C for 8 min. Standards are the same as those used for the LC-MS/MS analyses.

### Statistical analysis

All analyses were carried out using Microsoft Excel. Variance equality was initially assessed using the F-test (Fisher). Student's two-tailed t-tests, with or without equal variances, were then used. Data were presented as the mean  $\pm$  s.d. P-value  $\leq$  0.05 was considered to be statistically significant.

### Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

### Acknowledgements

We wish to thank all of the patients and their families who participated in this study.

We are grateful to Marion Roy, Sabrina Benaouadi and Patrick Aregui for their excellent technical assistance. We also wish to thank the staff of UMS 006, especially Rachel Balouzat, Sylvie Appolinaire and Guillaume Morera from the animal facilities, Florence Capilla and Talal Al Saati from the technical platform of 'histopathologie expérimentale'. We are grateful to Sophie Allard and Astrid Canivet from the imaging technical platform (Inserm UMR 1043-CNRS UMR 5282, CPTP, Toulouse) and Stephanie Balor from the Multiscale Electron Imaging platform (METi) at the 'Centre de Biologie Intégrative'. We wish to acknowledge Michel Simon (Inserm UMR1056, UDEAR, Toulouse) for critically reviewing the manuscript.

R.S. was supported by a joint grant ("ZAFH ABIMAS") from ZO IV by the Landesstiftung Baden-Württemberg and the Europäischer Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) to Carsten Hopf, L.O. was supported by the Czech Science Foundation [grant number 16-25687J]. The lipid analyses performed in the Toulouse INSERM Metatoul-Lipidomique Core Facility-MetaboHub were supported by the French National Research Agency [grant number ANR-11-INBS-010].

*Conflict of Interest statement.* None declared.

### Funding

A joint grant ("ZAFH ABIMAS") from ZO IV by the Landesstiftung Baden-Württemberg, Europäischer Fonds für regionale Entwicklung (EFRE), the Czech Science Foundation [grant number 16-25687J], and French National Research Agency [grant number ANR-11-INBS-010] and the French Society for Dermatology (SFD).

### References

1. Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 328–340.
2. Elias, P.M., Gruber, R., Crumrine, D., Menon, G., Williams, M.L., Wakefield, J.S., Holleran, W.M. and Uchida, Y. (2014) Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 314–318.
3. Feingold, K. and Elias, P. (2014) The important role of lipids in the epidermis and their role in the formation and maintenance of the cutaneous barrier. *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 279.
4. van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S. and Bouwstra, J.A. (2014) The important role of stratum corneum lipids for the

- cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 295–313.
5. Menon, G.K., Cleary, G.W. and Lane, M.E. (2012) The structure and function of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, **435**, 3–9.
  6. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S. and Ghidoni, R. (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**, 147–151.
  7. Rabionet, M., Gorgas, K. and Sandhoff, R. (2014) Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 422–434.
  8. Uchida, Y. and Holleran, W.M. (2008) Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J. Dermatol. Sci.*, **51**, 77–87.
  9. Borodzicz, S., Rudnicka, L., Mirowska-Guzel, D. and Cudnoch-Jedrzejewska, A. (2016) The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids Health Dis.*, **15**, 13.
  10. Elias, P.M., Williams, M.L., Holleran, W.M., Jiang, Y.J. and Schmuth, M. (2008) Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism. *J. Lipid Res.*, **49**, 697–714.
  11. Oji, V., Tadini, G., Akiyama, M., Blanchet Bardon, C., Bodemer, C., Bourrat, E., Coudiere, P., DiGiovanna, J.J., Elias, P., Fischer, J., et al. (2010) Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **63**, 607–641.
  12. Takeichi, T. and Akiyama, M. (2016) Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J. Dermatol.*, **43**, 242–251.
  13. Shigehara, Y., Okuda, S., Nemer, G., Chedraoui, A., Hayashi, R., Bitar, F., Nakai, H., Abbas, O., Daou, L., Abe, R., et al. (2016) Mutations in SDR9C7 gene encoding an enzyme for vitamin A metabolism underlie autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum. Mol. Genet.*, pii: dddw277.
  14. Wilson, P.A., Gardner, S.D., Lambie, N.M., Commans, S.A. and Crowther, D.J. (2006) Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J. Lipid Res.*, **47**, 1940–1949.
  15. Kienesberger, P.C., Oberer, M., Lass, A. and Zechner, R. (2009) Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J. Lipid Res.*, **50 Suppl**, S63–S68.
  16. Toulza, E., Mattiuzzo, N.R., Galliano, M.F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., de Daruvar, A., Wincker, P., Serre, G. and Guerrin, M. (2007) Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol.*, **8**, R107.
  17. Grall, A., Guaguere, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Le Gallo, M., Derbois, C., Kim, G.J., et al. (2012) PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat. Genet.*, **44**, 140–147.
  18. Grond, S., Eichmann, T.O., Dubrac, S., Kolb, D., Schmuth, M., Fischer, J., Crumrine, D., Elias, P.M., Haemmerle, G., Zechner, R., et al. (2016) PNPLA1 deficiency in mice and humans leads to a defect in the synthesis of omega-O-acylceramides. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 394–402.
  19. Vahidnezhad, H., Youssefian, L., Saeidian, A.H., Zeinali, S., Mansouri, P., Sotoudeh, S., Barzegar, M., Mohammadi-Asl, J., Karamzadeh, R., Abiri, M., et al. (2016) Gene targeted next generation sequencing identifies PNPLA1 mutations in patients with a phenotypic spectrum of autosomal recessive congenital ichthyosis: the impact of consanguinity. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 678–685.
  20. Ahmad, F., Ansar, M., Mehmood, S., Izoduwa, A., Lee, K., Nasir, A., Abrar, M., Mehmood, S., Ullah, A., Aziz, A., et al. (2015) A novel missense variant in the PNPLA1 gene underlies congenital ichthyosis in three consanguineous families. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **30**, e210–e213.
  21. Fachal, L., Rodriguez-Pazos, L., Ginarte, M., Carracedo, A., Toribio, J. and Vega, A. (2014) Identification of a novel PNPLA1 mutation in a Spanish family with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Br. J. Dermatol.*, **170**, 980–982.
  22. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*, **7**, 248–249.
  23. Kumar, P., Henikoff, S. and Ng, P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.*, **4**, 1073–1081.
  24. Hardman, M.J., Sisi, P., Banbury, D.N. and Byrne, C. (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development*, **125**, 1541–1552.
  25. Rabionet, M., Bayerle, A., Marsching, C., Jennemann, R., Grone, H.J., Yildiz, Y., Wachten, D., Shaw, W., Shayman, J.A. and Sandhoff, R. (2013) 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J. Lipid Res.*, **54**, 3312–3321.
  26. Turgeon, B. and Meloche, S. (2009) Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol. Rev.*, **89**, 1–26.
  27. Epp, N., Furstenberger, G., Muller, K., de Juanes, S., Leitges, M., Hausser, I., Thieme, F., Liebisch, G., Schmitz, G. and Krieg, P. (2007) 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J. Cell Biol.*, **177**, 173–182.
  28. Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der Hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., et al. (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 586–608.
  29. Krieg, P., Rosenberger, S., de Juanes, S., Latzko, S., Hou, J., Dick, A., Kloz, U., van der Hoeven, F., Hausser, I., Esposito, I., et al. (2013) Alox3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 172–180.
  30. Matsuki, M., Yamashita, F., Ishida-Yamamoto, A., Yamada, K., Kinoshita, C., Fushiki, S., Ueda, E., Morishima, Y., Tabata, K., Yasuno, H., et al. (1998) Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 1044–1049.
  31. Yanagi, T., Akiyama, M., Nishihara, H., Sakai, K., Nishie, W., Tanaka, S. and Shimizu, H. (2008) Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3075–3083.
  32. Prado, R., Ellis, L.Z., Gamble, R., Funk, T., Arbuckle, H.A. and Bruckner, A.L. (2012) Collodion baby: an update with a focus on practical management. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **67**, 1362–1374.
  33. Pak, L., Noso, Y., Chaizhunusova, N., Anambaeva, Z., Adylkhanov, T., Takeichi, N., Lzhaev, S., Aldyngurov, D., Tuleutayeva, R., Argynbekova, A., et al. (2016) Disorder of endothelia vessels' functional state with malignant tumors in patients exposed anthropogenic radiation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **17**, 575–579.
  34. Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zervas, P., Hoffmann, V., Ding, B.C., Proia, R.L. and Deng, C.X. (2007) Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin

- permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.*, **3**, 120–128.
35. Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem, N., Jr., Kim, S.Y., Mandal, M.N., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Alderson, N.L., Brown, J.C., Hama, H., et al. (2007) Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids (> or =C28) and the unique omega-O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 471–482.
  36. Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M., et al. (2015) Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **112**, 7707–7712.
  37. Radner, F.P., Streith, I.E., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kumari, M., Eichmann, T.O., Rechberger, G., Koefeler, H.C., Eder, S., Schauer, S., et al. (2010) Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). *J. Biol. Chem.*, **285**, 7300–7311.
  38. Grond, S., Radner, F.P., Eichmann, T.O., Kolb, D., Grabner, G.F., Wolinski, H., Gruber, R., Hofer, P., Heier, C., Schauer, S., et al. (2017) Skin barrier development depends on CGI-58 protein expression during late-stage keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 403–413.
  39. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Dubbelaar, F.E., Weerheim, A.M., Ijzerman, A.P. and Ponc, M. (1998) Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.*, **39**, 186–196.
  40. Mojumdar, E.H., Gooris, G.S., Groen, D., Barlow, D.J., Lawrence, M.J., Deme, B. and Bouwstra, J.A. (2016) Stratum corneum lipid matrix: Location of acyl ceramide and cholesterol in the unit cell of the long periodicity phase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 1926–1934.
  41. Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P. and Alibhai, M.F. (2003) The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*, **42**, 6696–6708.
  42. Kobayashi, K., Inoguchi, T., Maeda, Y., Nakashima, N., Kuwano, A., Eto, E., Ueno, N., Sasaki, S., Sawada, F., Fujii, M., et al. (2008) The lack of the C-terminal domain of adipose triglyceride lipase causes neutral lipid storage disease through impaired interactions with lipid droplets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 2877–2884.
  43. Schweiger, M., Schoiswohl, G., Lass, A., Radner, F.P., Haemmerle, G., Malli, R., Graier, W., Cornaciu, I., Oberer, M., Salvayre, R., et al. (2008) The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J. Biol. Chem.*, **283**, 17211–17220.
  44. Serre, G., Mils, V., Haftek, M., Vincent, C., Croute, F., Reano, A., Ouhayoun, J.P., Bettinger, S. and Soleilhavoup, J.P. (1991) Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 1061–1072.
  45. Simon, M., Sebbag, M., Haftek, M., Vincent, C., Girbal-Neuhauser, E., Rakotoarivony, J., Somme, G., Schmitt, D. and Serre, G. (1995) Monoclonal antibodies to human epidermal filaggrin, some not recognizing profilaggrin. *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 432–437.
  46. Leclerc, E.A., Hucheng, A., Kezic, S., Serre, G. and Jonca, N. (2014) Mice deficient for the epidermal dermokine beta and gamma isoforms display transient cornification defects. *J. Cell Sci.*, **127**, 2862–2872.
  47. Hirao, T., Denda, M. and Takahashi, M. (2001) Identification of immature cornified envelopes in the barrier-impaired epidermis by characterization of their hydrophobicity and antigenicities of the components. *Exp. Dermatol.*, **10**, 35–44.
  48. Opalka, L., Kovacic, A., Sochorova, M., Roh, J., Kunes, J., Lenco, J. and Vavrova, K. (2015) Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Org Lett.*, **17**, 5456–5459.
  49. Jennemann, R., Sandhoff, R., Langbein, L., Kaden, S., Rothermel, U., Gallala, H., Sandhoff, K., Wiegandt, H. and Grone, H.J. (2007) Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 3083–3094.
  50. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917.
  51. Lillington, J.M., Trafford, D.J. and Makin, H.L. (1981) A rapid and simple method for the esterification of fatty acids and steroid carboxylic acids prior to gas-liquid chromatography. *Clin Chim Acta*, **111**, 91–98.



## Résumé en anglais:

### Background:

Mutations in patatin-like phospholipase domain-containing 1 (*PNPLA1*) cause autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI). Recently, *PNPLA1* was shown to have a crucial role in epidermal  $\omega$ -O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier by a transacylase activity catalyzing the final step of acylceramide production. This provides important insights into the molecular mechanism of skin barrier formation. Consequently, a substitutive therapy with exogenous contribution of  $\omega$ -O-acylceramides might be interesting to treat ARCI patients who still do not benefit from any curative treatments. Small hairpin (sh) *PNPLA1* reconstructed human epidermis (RHE) is an attractive tool to initiate the development of this substitutive therapy.

### Objectives:

We will produce sh*PNPLA1*-RHE reproducing *PNPLA1*-mutated epidermis and use it in substitutive therapeutic assays.

### Methods:

Morphology, late epidermal differentiation gene expression and *stratum corneum* (SC) lipids composition was evaluated in sh*PNPLA1*-RHE by various histological, ultrastructural, and biochemical approaches. For therapeutic assays, RHEs were topically treated with  $\omega$ -O-acylceramides. The permeability barrier was evaluated by Lucifer yellow penetration assay.

### Results:

*PNPLA1* silencing reduced by about 40% the production of  $\omega$ -O-acylceramide, influenced lipids organization and drastically impaired the permeability barrier. Substitutive therapeutic assays on sh*PNPLA1*-RHE are ongoing.

### Conclusions:

Sh*PNPLA1*-RHE reproduces the phenotype of *PNPLA1*-mutated epidermis and seems appropriate to develop new therapeutic approaches.

**Keywords:** epidermal lipids, *PNPLA1* knockdown, three-dimensional reconstructed human epidermis, autosomal recessive congenital ichthyosis,  $\omega$ -O-acyl ceramides, substitution therapy.

**L'extinction du gène *PNPLA1* dans un modèle d'épiderme humain reconstruit pour tester une thérapie substitutive dans les ichtyoses congénitales et les autres pathologies dermatologiques liées à des perturbations des lipides du *stratum corneum***

Ville et date de soutenance : Toulouse, le 12/07/2017

---

RESUME EN FRANÇAIS :

Les mutations de *PNPLA1* dans les ichtyoses congénitales autosomiques récessives altèrent la synthèse des  $\omega$ -O-acylcéramides, un acteur crucial pour l'organisation des lipides du *stratum corneum* et dans la fonction de barrière épidermique. Comme aucun traitement spécifique n'existe pour ces patients, nous avons produit un modèle d'épiderme humain reconstruit transfecté par deux shARNs *PNPLA1* afin de mimer l'épiderme des patients mutés pour *PNPLA1*. Ce modèle a été caractérisé à l'aide d'analyses histologiques, ultrastructurales et biochimiques pour déterminer l'aspect morphologique, l'expression des gènes de la différenciation terminale et la composition des lipides du SC. Des essais thérapeutiques ont pu être réalisés dans un deuxième temps avec l'application locale d'  $\omega$ -O-acylcéramide et son impact a été évalué par des tests au Lucifer yellow.

---

TITRE EN ANGLAIS: *PNPLA1* silencing in a three-dimensional reconstructed human epidermis for testing lipid substitution therapy in congenital ichthyoses and other skin diseases related with perturbation in *stratum corneum* lipids

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée dermatologie et vénéréologie

---

MOTS-CLÉS : extinction de *PNPLA1*, épiderme humain reconstruit, ichtyose congénitale autosomique récessive,  $\omega$ -O-acylcéramides, thérapie substitutive.

---

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :  
Université Toulouse III-Paul Sabatier  
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,  
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

---

Directeur de thèse : Pr Juliette MAZEREEUW-HAUTIER