



# **Contribution à l'étude des phényl cycloalkylurées, une nouvelle classe de molécules anti-inflammatoires à potentiel anti-psoriasique**

**Thèse**

**Joël Boutin**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Joël Boutin, 2020

## Résumé

Les maladies auto-immunes, comme le psoriasis, affectent grandement la qualité de vie, et les personnes atteintes sont dépendantes de la prise régulière de médicaments. Malheureusement, l'ensemble des traitements actuels ne répond pas adéquatement aux besoins des patients à cause de leurs effets secondaires ou de leur perte d'efficacité. Il est donc nécessaire de continuer à développer de nouvelles molécules anti-inflammatoires efficaces et sécuritaires. Ce projet de recherche a commencé par la découverte de la tBEU, une molécule qui a montré un fort potentiel sur un modèle préclinique de peau psoriasique humaine reconstituée. Par la suite, dans un modèle de kératinocytes HaCaT stimulés avec une combinaison d'IL-17A et TNF $\alpha$ , la tBEU s'est révélée efficace pour réduire l'expression et la production de l'interleukine-6 (IL-6), une cytokine intrinsèquement impliquée dans le psoriasis. Dans ce même modèle, un criblage d'une famille de molécules dérivées de la tBEU, les PcAUs (phényl cycloalkylurées), a permis d'identifier la molécule PcAU-1036 comme étant la plus efficace.

Nous avons démontré qu'en plus d'inhiber l'expression de l'IL-6, la PcAU-1036 inhibait fortement l'expression des cytochromes P450 A1 et B1. Ces deux gènes sont régulés principalement par AHR, un facteur de transcription connu principalement pour son rôle dans la réponse cellulaire à la toxicité. Nous avons travaillé avec un antagoniste de AHR, le CH223191, ainsi que deux agonistes de classes différentes de AHR, soit le TCDD, qui est synthétique et le FICZ, qui est un photoproduit naturel du tryptophane. Nos résultats suggèrent que la PcAU-1036 agit comme un antagoniste de AHR. Nous avons découvert qu'à l'instar du CH223191, la PcAU-1036 inhibe l'activation de la voie AHR par le TCDD, mais pas par le FICZ, en bloquant la translocation nucléaire de AHR. Nous avons aussi montré que la capacité de la PcAU-1036 à inhiber l'IL-6 était liée à l'inhibition de la voie AHR. Enfin, nous avons tenté de démontrer l'efficacité des PcAUs dans deux modèles précliniques de psoriasis : un modèle de peau humaine reconstituée et un modèle murin de psoriasis induit. Nous avons testé la PcAU-1036 ainsi que la PcAU-1003. Ce faisant, nous avons démontré dans ces deux modèles la capacité de la PcAU-1003 à diminuer la sécrétion d'IL-6 et l'état prolifératif de l'épiderme. Les effets de la PcAU-1036 se sont cependant révélés moins intéressants. Ces travaux pourraient constituer la base pour le développement de nouveaux médicaments pour traiter les symptômes du psoriasis et possiblement d'autres maladies auto-immunes.

## **Abstract**

Autoimmune diseases such as psoriasis greatly affect the quality of life, and patients become dependent on the regular use of drugs. Sadly, the therapeutic options currently available do not answer adequately to the people's needs due to significant side effects and a loss of efficacy over time. Consequently, it is still necessary to continue to develop novel, safe and efficient anti-inflammatory drugs. This research project began with the discovery of tBEU, a molecule with interesting anti-inflammatory properties on a preclinical model of reconstituted psoriatic human skin. On HaCaT keratinocytes stimulated with a combination of IL-17A and TNF $\alpha$ , the tBEU revealed to be a potent negative regulator of the expression and release of interleukin IL6, a cytokine strongly involved in psoriasis. In this same model, screening of a family of molecules derived from tBEU, the phenylcycloalkylureas (PcAUs), allowed us to identify the PcAU-1036 as the most potent molecule.

In addition to its effects on IL-6, we discovered that PcAU-1036 also strongly inhibits the expression of cytochromes P450 A1 and B1. These two genes are known to be strongly regulated by AHR, a transcription factor mainly known for its role in mediating cellular response to toxicity. Using a well-characterized AHR antagonist (CH223191) and two AHR agonists of different classes (TCDD, which is synthetic and FICZ, which is a photoproduct of tryptophan), we showed that PcAU-1036 acts as an AHR antagonist. We demonstrated that similarly to CH223191, PcAU-1036 antagonizes the activation of the AHR pathway by TCDD, but not by FICZ, by preventing the nuclear import of the protein. We have also shown that the capacity of PcAU-1036 to inhibit IL-6 is linked to the inhibition of the AHR pathway. Lastly, we sought to demonstrate the efficacy of the PcAUs on two preclinical models of psoriasis: a model of reconstituted human skin and a murine model of induced psoriasis. We tested the PcAU-1036, but also the PcAU-1003. We were able to show in both models that PcAU-1003 reduces IL-6 production as well as the proliferative state of the epidermis. The effects of PcAU-1036 revealed to be less interesting, however. The results of this research project could lay the groundwork for the development of novel drugs to treat the symptoms of psoriasis and other IL-6-related autoimmune diseases.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des figures, tableaux, illustrations .....	vi
Liste des abréviations, sigles, acronymes .....	viii
Avant-propos .....	xi
Introduction .....	1
1    L'inflammation.....	1
1.1    Les maladies auto-immunes .....	1
1.2    La voie NF- $\kappa$ B .....	2
2    Le psoriasis.....	4
2.1    Origine du psoriasis .....	7
2.2    Étiologie du psoriasis .....	9
2.3    Histologie de l'épiderme psoriasique .....	12
2.4    Les modèles précliniques d'étude du psoriasis.....	16
2.5    Les traitements disponibles contre le psoriasis.....	23
3    La voie de l'IL-6 .....	27
3.1    L'IL-6 dans le psoriasis .....	28
4    La voie de signalisation AHR.....	30
4.1    Identification de la protéine AHR.....	30
4.2    Structure de AHR.....	31
4.3    La voie de détoxification de AHR .....	32
4.4    Autres fonctions de AHR.....	33
4.5    Les ligands de AHR .....	36
5    Identification des EUs comme de potentiels médicaments anti-psoriasiques.....	38
Problématique, hypothèse et objectifs de recherche.....	43
CHAPITRE 1. Synthesis and evaluation of substituted phenyl cycloalkylureas and bioisosteres as IL-6 inhibitors .....	45
1.1 Avant-propos .....	46
1.2 Résumé .....	47
1.3 Abstract .....	48
1.4 Introduction.....	49
1.5 Design and chemistry .....	51
1.6 Results and discussion.....	52
1.7 Figures .....	55

1.8 Conclusion.....	60
1.9 Materials and methods .....	61
1.10 Data availability .....	80
1.11 Compliance with ethical standards .....	81
1.12 References .....	82
CHAPITRE 2. PcAU-1036 is a Novel Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist.....	86
2.1 Avant-propos .....	87
2.2 Résumé .....	88
2.3 Abstract .....	89
2.4 Introduction.....	90
2.5 Materials and methods .....	92
2.6 Results .....	96
2.7 Discussion .....	100
2.8 Conclusion.....	104
2.9 Figures and legends .....	105
2.10 References .....	116
Chapitre 3. PcAU-1003 improves the psoriatic phenotype in a human reconstituted skin model of psoriasis and in an imiquimod-induced psoriasis mouse model .....	120
3.1 Avant-propos .....	121
3.2 Résumé .....	122
3.3 Abstract .....	123
3.4 Introduction.....	124
3.5 Materials and methods .....	126
3.6 Results .....	130
3.7 Figures .....	132
3.8 Discussion .....	141
3.9 Conclusion.....	145
3.10 References .....	146
4 Discussion .....	149
4.1 Utilité des PcAUs pour traiter le psoriasis .....	149
4.2 Étude des PcAUs comme antagonistes de la voie de signalisation AHR .....	154
4.3 Études du potentiel antipsoriasique des PcAUs.....	157
Conclusion .....	161
Bibliographie .....	162

# Liste des figures, tableaux, illustrations

## INTRODUCTION

Figure 1 : Activation de la voie de l'inflammation NF- $\kappa$ B .....	3
Figure 2 : Exemple de coudes recouverts de plaques de psoriasis.....	5
Figure 3 : Manifestations de l'arthrite psoriasique .....	6
Figure 4 : Les cellules responsables de l'inflammation dans la peau .....	8
Figure 5: Exemples de manifestation de l'effet Koebner .....	10
Figure 6: Structure de l'épiderme .....	12
Figure 7 : Différences histologiques entre l'épiderme sain et l'épiderme psoriasique .....	15
Figure 8 : Voie de signalisation de l'IL-6.....	27
Figure 9 : Structures de AHR, de ARNT et de AHRR.....	31
Figure 10 : Voie de signalisation classique de AHR .....	33
Figure 11 : Structure des premières molécules synthétisées .....	39
Figure 12 : Effet des cytokines IL-17A et TNF $\alpha$ sur l'expression de gènes pro-inflammatoires.....	40
Figure 13 : Effets de la tBEU et de la cHEU sur la sécrétion de l'IL-6 .....	41
Figure 14 : Structure de base des PCAUs .....	42

## CHAPITRE 1

Figure 1.1: Structure of cHCEU and other compounds .....	55
Scheme 1.1: Synthesis of PcAUs and other compounds .....	56
Table 1.1: Antiproliferative activity of PcAUs and other compounds .....	57
Figure 1.2: Inhibition of IL-6 by PcAUs and other compounds.....	58
Figure 1.3: Effect of compound 4e on IL-6 mRNA expression.....	59

## CHAPITRE 2

Figure 2.1: Molecular structures of PcAU-1036 and its bioisosteric PcATU-1052 counterpart .....	105
Figure 2.2: PcAU-1036 inhibits TCDD- but not FICZ-induced enrichment of AHR in the nuclei .....	106
Figure 2.3: PcAU-1036 decreases the expression of <i>CYP1A1</i> and <i>CYP1B1</i> .....	110
Figure 2.4: PcAU-1036 partially suppresses IL-17A and TNF $\alpha$ -induced IL-6 expression and protein release .....	111
Figure 2.5: Implication of AHR in PcAU-1036-mediated inhibition of IL-6 expression .....	112
Figure S2.1: PcATU-1052 does not inhibit TCDD- and FICZ-induced AHR nuclear translocation .....	114
Figure S2.2: PcAU-1036 suppresses IL-17A and TNF $\alpha$ -induced <i>IL-6</i> expression in a dose-dependent manner .....	115

### CHAPITRE 3

Figure 3.1: PcAU-1003 demonstrates anti-psoriatic properties on human reconstituted psoriatic skin model of psoriasis .....	132
Figure 3.2: PcAU-1003 decreases the severity of the psoriatic symptoms in the IMQ-induced mouse psoriasis model .....	134
Figure 3.3: PcAU-1003 reduces skin thickening in IMQ-treated mice .....	135
Figure 3.4: PcAU-1003 reduces the proliferative state of the epidermis in IMQ-treated mice.....	137
Figure 3.5: PcAU-1003 decreases the expression of IL-6 in the skin of IMQ-treated mice.....	139
Figure 3.6: PcAU-1003 does not cause toxicity, under the conditions tested, in mice.....	140

### 4 DISCUSSION

Figure 4.1 : Effets de la PcAU-1036 à 100 µM .....	151
Figure 4.2 : Criblage des PcAUs par ELISA contre IL-6 sur des macrophages dérivés des THP-1 et stimulés avec du LPS .....	153
Figure 4.3 : La PcAU-1036 inhibe la phosphorylation de la MAPK p38.....	156
Figure 4.4 : Effets de la PcAU-1036 à 100 µM sur le modèle de peaux psoriatiques reconstituées .....	159

## Liste des abréviations, sigles, acronymes

12-HETE	Acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque
3'-UTR	<i>Three Prime Untranslated Transcribed Region</i>
AIA	<i>Antigen Induced Arthritis</i>
ALDH3A1	<i>Aldehyde Dehydrogenase III</i>
AHH	<i>Aryl Hydrocarbon Hydroxylase</i>
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
AHRR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor</i>
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
B2M	Bêta-2 microglobuline
bHLH-PAS	<i>Basic-helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	Cellule dendritique
CIA	<i>Collagen Induced Arthritis</i>
COX	Cyclooxygénase
COXII	Cyclooxygénase-2
Cpdm	<i>Chronic proliferative disease dermatitis</i>
CsA	Cyclosporine A
CYP1	Cytochrome P450
CXCR2	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DRE	<i>Dioxin response element</i>
DSS	<i>Dextran Sulfate Sodium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoassay</i>
EROD	<i>Ethoxyresorufin O-Deethylase Assays</i>
EU	Éthyl Urée
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazole
Fsn	<i>Flaky skin</i>
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
HaCaT	<i>Human Calcium Temperature</i>
HAH	<i>Halogenated Aromatic Hydrocarbon</i>
hBD2	<i>Human beta defensin 2</i>
H&E	Hémotoxiline et éosine
HES	Hémotoxiline, éosine et safran
HFLS-RA	<i>Human Fibroblast-Like Synoviocytes: Rheumatoid Arthritis</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
I3C	Indole-3-Carbinol
IFN $\gamma$	Interféron Gamma
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle



IMQ	Imiquimod
JAK	<i>Janus Kinase</i>
K	Kératine
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
MNF	3'-méthoxy-4'-nitroflavone
MTX	Méthotrexate
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1</i>
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
PcAU	Phenyl cycloalkylurée
PcATU	Phenyl cycloalkylthiourée
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PGE2	Prostaglandine E2
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PsA	<i>Psoriatic arthritis</i>
PSORS	<i>Psoriasis susceptibility locus</i>
RA	<i>Rheumatoid Arthritis</i>
RNAse	Ribonucléase
S100A7	<i>S100 Calcium Binding Protein A7</i>
SKALP	<i>Skin-derived antileukoprotease</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TCDD	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TCZ	Tocilizumab
Th	<i>T helper cell</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMF	6,2',4'-triméthoxyflavone
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
Treg	Regulatory T cell
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	<i>Wild type</i>
XAP	<i>X-Associated Protein</i>

*Tomber a été inventé pour se relever.  
Malheur à ceux qui ne tombent jamais.*  
**Félix Leclerc**

*La raison, c'est la folie du plus fort. La  
raison du moins fort, c'est de la folie.*  
**Eugène Ionesco**

## Avant-propos

Au cours des 3 années de doctorat passées sous la supervision des Drs Stéphane Gobeil et René C.-Gaudreault, j'ai eu la chance de contribuer à la caractérisation et au criblage d'une nouvelle famille de molécules anti-inflammatoires, les PcAUs. Ces travaux ont mené à la publication d'un article dans la revue Medicinal Chemistry Research en mai 2020 (chapitre 1).

J'ai par la suite fait les travaux pour comprendre en détail le mécanisme d'action moléculaire d'une PcAU particulière, nommée PcAU-1036 (chapitre 2). J'ai réalisé la presque totalité des travaux, j'ai colligé les résultats, j'ai fait les figures et j'ai rédigé en entier le manuscrit sous la supervision des Drs Gobeil et C.-Gaudreault. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article qui sera soumis ultérieurement.

Enfin, j'ai participé à démontrer l'efficacité anti-psoriasique des PcAUs sur des modèles précliniques de la maladie (chapitre 3). J'ai réalisé une partie des expériences et des figures. J'ai également rédigé presque en entier le manuscrit sous la supervision des Drs Gobeil et C.-Gaudreault. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article qui sera soumis ultérieurement.

# Introduction

## 1 L'inflammation

L'inflammation a été décrite dans l'antiquité comme une réaction provoquant un gonflement, de la douleur, de la chaleur, de la rougeur et une perte de fonction. Aujourd'hui, on considère que c'est une réponse défensive du corps en réaction à un stress extérieur, comme une blessure physique, la présence d'une substance irritante sur la peau, d'un corps étranger dans l'organisme (Ferrero-Miliani, Nielsen, Andersen et Girardin, 2007) ou à signal endogène, comme la présence de cellules endommagées (Chaplin, 2015). Ce processus est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme, car il permet de résoudre la cause du stress et d'éliminer les cellules nécrosées afin de retourner à un état normal. Le stress est d'abord détecté localement par des cellules sentinelles comme les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. En réponse au stress, ces cellules vont sécréter des cytokines (comme IL-6, TNF $\alpha$  et IL-8), de petites protéines de moins de 40 kDa qui vont communiquer aux cellules avoisinantes la présence du stress afin de déclencher une réponse inflammatoire (Kany, Vollrath et Relja, 2019). Sous l'effet des cytokines, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins vont exprimer des sélectines qui vont recruter les leucocytes au site de la lésion (Newton et Dixit, 2012). Les leucocytes ensuite vont phagocyter les agents pathogènes extérieurs et les cellules endommagées et permettre au tissu de commencer son processus de réparation (Duque et Descoteaux, 2014).

### 1.1 Les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes surviennent lorsque l'organisme se perçoit comme une menace et qu'il induit une réponse inflammatoire contre lui-même. Ce sont des maladies chroniques qui nuisent grandement à la qualité de vie des gens parce qu'elles causent des symptômes débilitants comme de la fatigue chronique et de la douleur articulaire. On estime que près de 50 millions de personnes en souffrent aux

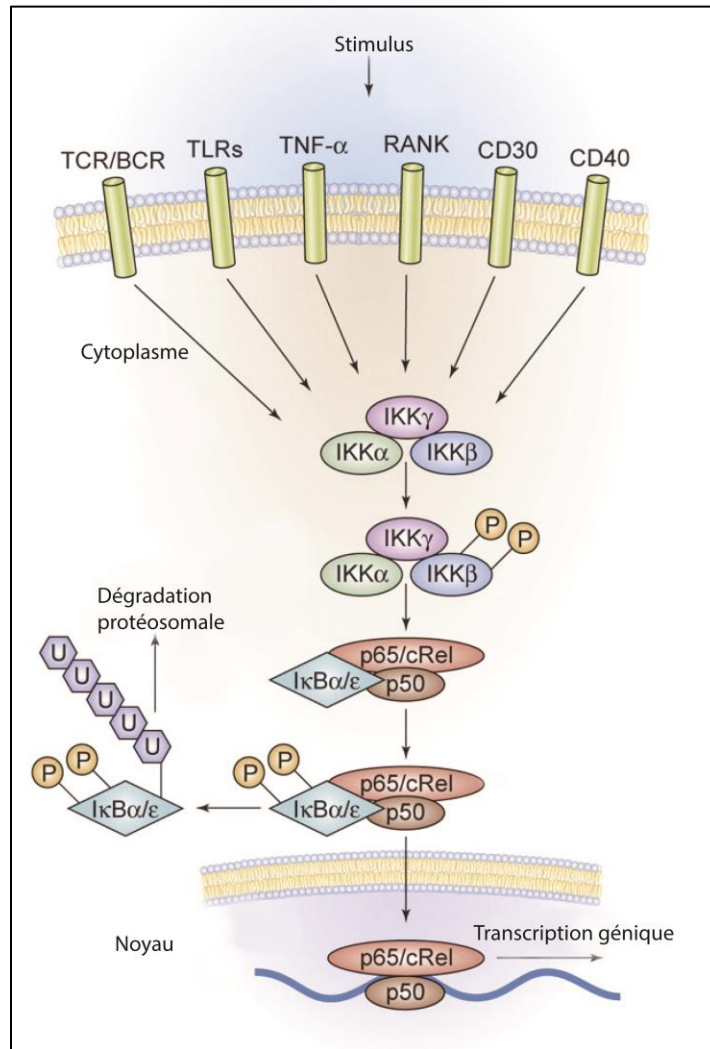
États-Unis et qu'elles engendrent des coûts d'environ 100 milliards de dollars par année à la société (American Association Autoimmune Related Diseases, 2011).

Même si leur origine n'est pas toujours bien comprise, ces maladies découlent d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Les maladies auto-immunes sont multiples et affectent différentes parties du corps. Les plus connues sont l'arthrite rhumatoïde, qui cause un gonflement et de la rougeur aux jointures, le lupus, qui déclenche l'apparition de plaques de rougeur sur la peau, des troubles respiratoires et des douleurs musculaires et la maladie de Crohn, qui affecte l'épithélium intestinal et qui provoque des crampes et des diarrhées chroniques (Cikes, 2000; Smolen, Aletaha et McInnes, 2016; Torres, Mehandru, Colombel et Peyrin-Biroulet, 2017). Enfin, le psoriasis, qui est la maladie auto-immune la plus répandue dans le monde, cause l'apparition de plaques douloureuses sur la peau (Boehncke et Schön, 2015). Le psoriasis sera d'ailleurs décrit en détails au chapitre 1.2. Malgré le fait que les maladies auto-immunes soient diverses, elles ont néanmoins en commun l'activation de voies de signalisation moléculaires résultant dans l'hyperproduction de cytokines (Moudgil et Choubey, 2011).

## **1.2 La voie NF- $\kappa$ B**

La voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) est au cœur du contrôle de l'inflammation et de la production des cytokines pro-inflammatoires. La famille NF- $\kappa$ B est constituée de cinq protéines différentes : les sous-unités NF- $\kappa$ B1 (sous-unité p50), NF- $\kappa$ B2, RelA (sous-unité p65), RelB et c-Rel. Ces sous-unités s'assemblent en homodimères ou en hétérodimères pour réguler la transcription des gènes pro-inflammatoires. Dans des conditions normales, NF- $\kappa$ B est réprimé, mais il peut être activé par des récepteurs membranaires aux cytokines comme les TLRs (récepteurs de type Toll) ou TNFR (récepteur de TNF $\alpha$ ) (Figure 1) (H. Zhang et Sun, 2015). L'activation de ces récepteurs de surface provoque la phosphorylation et l'activation du facteur IKK (I $\kappa$ B Kinase), qui entraîne à son tour la phosphorylation de I $\kappa$ B. I $\kappa$ B est un régulateur négatif qui interagit avec NF- $\kappa$ B (composé des sous-

unités p50 et p65/c-Rel) afin de le séquestrer dans le cytoplasme. La phosphorylation de I $\kappa$ B par IKK entraîne son ubiquitination et sa dégradation subséquente par le protéasome. NF- $\kappa$ B est ensuite libre de se lier à ses gènes cibles sur l'ADN pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF $\alpha$  (Jost et Ruland, 2007).



**Figure 1 : Activation de la voie de l'inflammation NF- $\kappa$ B.** Un stimulus à la surface des cellules, comme la présence de la cytokine TNF $\alpha$ , active par phosphorylation IKK. Puis, IKK phosphoryle I $\kappa$ B, le régulateur négatif de NF- $\kappa$ B, ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. NF- $\kappa$ B transloque par la suite au noyau et induit l'expression de gènes pro-inflammatoires. Schéma tiré et modifié de Jost et Ruland, 2007.

## 2 Le psoriasis

Le psoriasis est la maladie auto-immune la plus répandue dans le monde. On estime qu'entre 2 et 3 % de la population mondiale en est atteinte (Grine, Dejager, Libert et Vandembroucke, 2015). L'origine du nom vient du mot grec « Psora », qui signifie « démangeaison ». La pathologie a été confondue avec la lèpre pendant plusieurs siècles à cause de la similitude des symptômes (Glickman, 1986). C'est en 1863 que le terme « psoriasis » a été introduit pour la première fois par Erasmus Wilson, dans son ouvrage « On Diseases Of The Skin » (Wilson, 1863). Il existe 5 formes de psoriasis; chacune avec leur étiologie et leurs symptômes particuliers. Celles-ci sont le psoriasis en plaque (ou psoriasis vulgaris), inversé, en gouttes, érythrodermique et pustulaire. Lorsqu'on parle de psoriasis, on fait principalement référence au psoriasis en plaques qui compte pour 90 % des cas. C'est exclusivement de cette forme de la maladie dont il sera question dans cet ouvrage.

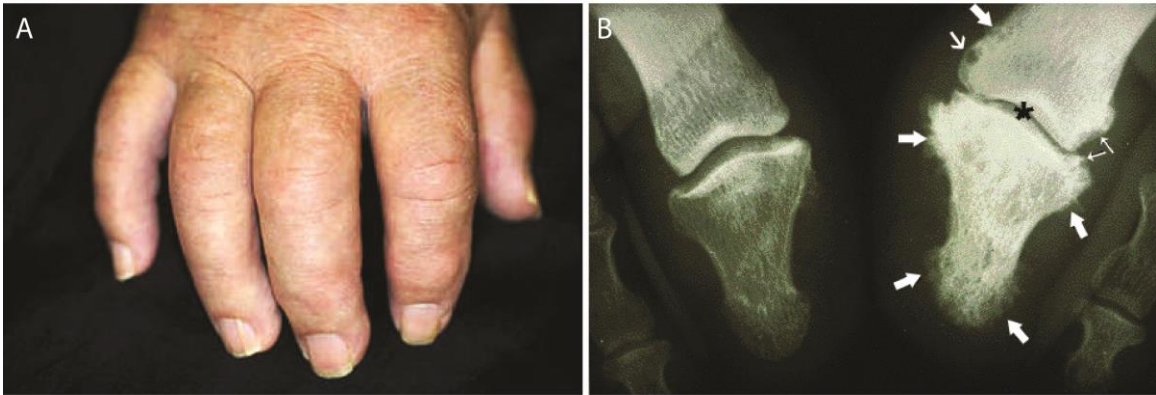
Même si elle est généralement bénigne, la maladie entraîne des symptômes qui vont grandement affecter la qualité de vie. Le psoriasis est une maladie complexe qui touche les kératinocytes de l'épiderme et qui résulte d'un *crosstalk* entre la peau et le système immunitaire (Nestle, Di Meglio, Qin et Nickoloff, 2009). Elle provoque l'apparition sur la peau de plaques rouges enflammées et recouvertes d'une croûte blanchâtre. Leur diamètre varie généralement entre 2 et 5 cm. Ces plaques entraînent de la démangeaison, de la douleur et de la desquamation chroniques (Langley, 2005). Elles sont localisées principalement sur les genoux, les coudes, le bas du dos, près des ongles, sur les talons et sur le cuir chevelu (Figure 2) (Lebwohl, 2003).



**Figure 2 : Exemple de coudes recouverts de plaques de psoriasis.** Les plaques psoriasiques sont caractérisées par de la rougeur et par la présence d'une croûte blanchâtre de cellules squameuses. Photographie tirée de McCall, 2011.

Le psoriasis est également associé à plusieurs comorbidités. Tout d'abord, elle mène à de l'arthrite psoriasique (PsA) dans 25 % à 34 % des cas, ce qui entraîne un gonflement, de la douleur ainsi qu'une sensation de rigidité et de fatigue aux articulations (Figure 3) (Gladman et Chandran, 2011; Mease et al., 2013). Le psoriasis est aussi associé à un taux significativement plus élevé d'obésité, de syndrome métabolique et à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires (Mahé et al., 2013; Prey et al., 2010). De plus, à cause de la visibilité de leurs symptômes, les patients atteints de psoriasis sont victimes de stigmatisation et d'isolement social. Ils ont de surcroît plus de chances de souffrir de dépression, d'anxiété et d'avoir des idées suicidaires (Kurd, Troxel, Crits-Christoph et Gelfand, 2011).

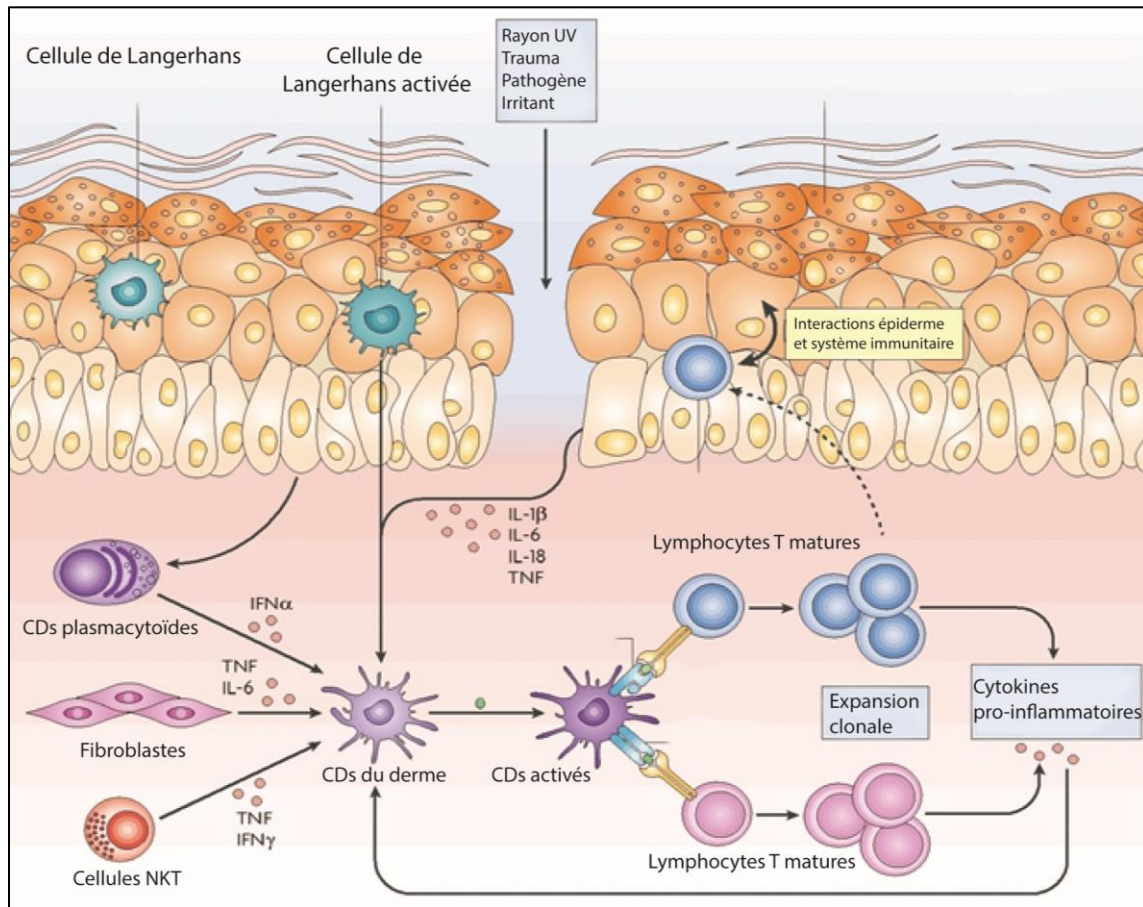




**Figure 3 : Manifestations de l'arthrite psoriasique.** A) Les aspects cliniques de l'arthrite psoriasique (PsA) (Photographie tirée de (Ratini, 2019) ©2005-2020, WebMD, LLC. Tous droits réservés) B) Radiographie des gros orteils d'un patient atteint de PsA. L'orteil de gauche est normal alors que celui de droite est enflammé. On y observe une réduction de l'espace entre les phalanges (astérisque), de l'érosion osseuse (flèches minces), un kyste (flèche de taille moyenne) et de la nouvelle formation osseuse (flèches épaisses). Radiographie tirée et modifiée de Eagle, 2017.

## 2.1 Origine du psoriasis

Le psoriasis est une maladie complexe qui affecte l'épiderme, la couche superficielle de la peau. Elle résulte d'un *crosstalk* entre les kératinocytes, les cellules immunitaires résidant dans l'épiderme et le système immunitaire (Figure 4). La boucle commence par la détection d'un stress comme une blessure physique, une infection, une substance exogène ou du rayonnement UV par les cellules de Langerhans (des cellules dendritiques) et les kératinocytes dans l'épiderme. Ces derniers libèrent dans le milieu des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ , qui vont activer les cellules dendritiques du derme. Les fibroblastes et les cellules NK contribuent également à ce processus. Ensuite, les cellules dendritiques induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T matures CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Ces derniers libèrent à leur tour des cytokines comme IL-17A et IL-22 qui stimulent l'inflammation chez les fibroblastes et les kératinocytes de la peau. Normalement, l'inflammation se perpétue jusqu'à la résolution du stress. Cependant, cette boucle se prolonge indéfiniment dans les cas de psoriasis (Albanesi, Madonna, Gisondi et Girolomoni, 2018; Boehncke et Schön, 2015; Lowes, Suárez-Farinas et Krueger, 2014; Perera, Di Meglio et Nestle, 2012).



**Figure 4 : Les cellules responsables de l'inflammation dans la peau.** La peau induit une réponse inflammatoire face à un stress, comme des rayons UV, une blessure physique, une substance irritante ou un agent pathogène. Ce stress active les cellules de Langerhans de l'épiderme, puis les cellules dendritiques du derme (CDs). Ces dernières vont promouvoir la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T matures et l'expansion clonale. Les lymphocytes T matures vont libérer plusieurs cytokines comme IL-17A, IL-22 et TNF $\alpha$  qui vont induire une réponse inflammatoire chez les kératinocytes de l'épiderme. Les kératinocytes vont à leur tour libérer des cytokines comme IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$ , ce qui a pour effet de recruter et d'activer des cellules du système immunitaire au site de la lésion. Schéma tiré et traduit de Nestle et al., 2009.

## 2.2 Étiologie du psoriasis

Le psoriasis a une concordance d'environ 70 % chez les jumeaux monozygotes (identiques) contre seulement 20 % chez les jumeaux dizygotes (non identiques) (Gladman et Chandran, 2011; Lebwohl, 2003). De plus, sa prévalence varie en fonction de l'origine ethnique. Les Caucasiens sont ceux étant le plus touchés avec une prévalence de 3,6 %. À l'inverse, la prévalence est de 1,9 % chez les Afro-Américains et de 1,6 % chez les Hispaniques (Rachakonda, Schupp et Armstrong, 2014). Ces observations suggèrent une forte implication de la génétique dans la prédisposition à la maladie. Enfin, le psoriasis affecte autant les hommes que les femmes (Raychaudhuri et Farber, 2001).

Des études d'association génétique ont permis d'identifier différents locus de susceptibilité (*PSORS1* à *PSORS10*) associés à un risque accru de développer la maladie. *PSORS1*, le locus le plus fortement impliqué dans la prédisposition au psoriasis, contient le gène HLA (Human Leucocyte Antigen) dont la mutation HLA-cw6\*0602 se retrouve chez 65 % des patients psoriasiques (Onderdijk 2015). Les autres loci (*PSORS2* à *PSORS10*) contiennent des gènes impliqués dans les voies de l'inflammation IL-23/Th17, NF-κB et de la différenciation de l'épiderme (Perera et al., 2012). Par exemple, *PSOR4* contient le gène codant pour la protéine S100A8 (calgranuline A), un membre de la famille des protéines S100 qui sont considérées comme des marqueurs de l'inflammation (Park et al., 2009). S100A8 est une protéine abondante dans les lésions psoriasiques. Cette dernière aurait un rôle à jouer dans la défense de la peau contre les micro-organismes en plus d'avoir des propriétés chimioattractantes pour le système immunitaire (Schonthaler et al., 2013). *PSOR9* contient le gène codant pour JunB, un facteur de transcription qui est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Park et al., 2009).

Par la suite, on a identifié dans le locus *PSOR2* le gène *CARD14* (Caspase Recruitment Domain Family, Member 14). Une mutation de gain de fonction dans ce gène permettrait à *CARD14* d'activer la voie NF-κB et d'induire l'expression de la chimiokine IL-8, de l'IL-36γ et de CCL20 (Jordan et al., 2012). Enfin, le locus *PSOR9*

contient l'interleukine IL-15. Une mutation dans la région non codante 3'-UTR de ce gène serait associée à une prévalence du psoriasis de 1,65 fois plus élevée (X. J. Zhang et al., 2007).

Si la génétique prédispose une partie de la population au psoriasis, la présence et la sévérité des symptômes sont grandement influencées par des facteurs extérieurs. Par exemple, des lésions peuvent apparaître *de novo* chez des patients à la suite d'un stress physique sur la peau. Ce phénomène est d'ailleurs fréquemment observé chez des patients qui se sont fait tatouer (Figure 5). En effet, des symptômes de psoriasis peuvent parfois apparaître autour du tatouage entre 1 jour et 30 jours après l'opération (Kluger et al., 2017). Ce phénomène est connu sous le nom du phénomène de Koebner (Arias-Santiago, Espiñeira-Carmona et Aneiros-Fernández, 2013; Raychaudhuri, Jiang et Raychaudhuri, 2008).



**Figure 5: Exemples de manifestation de l'effet Koebner.** Des patients ont développé des plaques de psoriasis en réponse au stress mécanique d'un tatouage. Photographies tirées de Arias-Santiago et al., 2013.

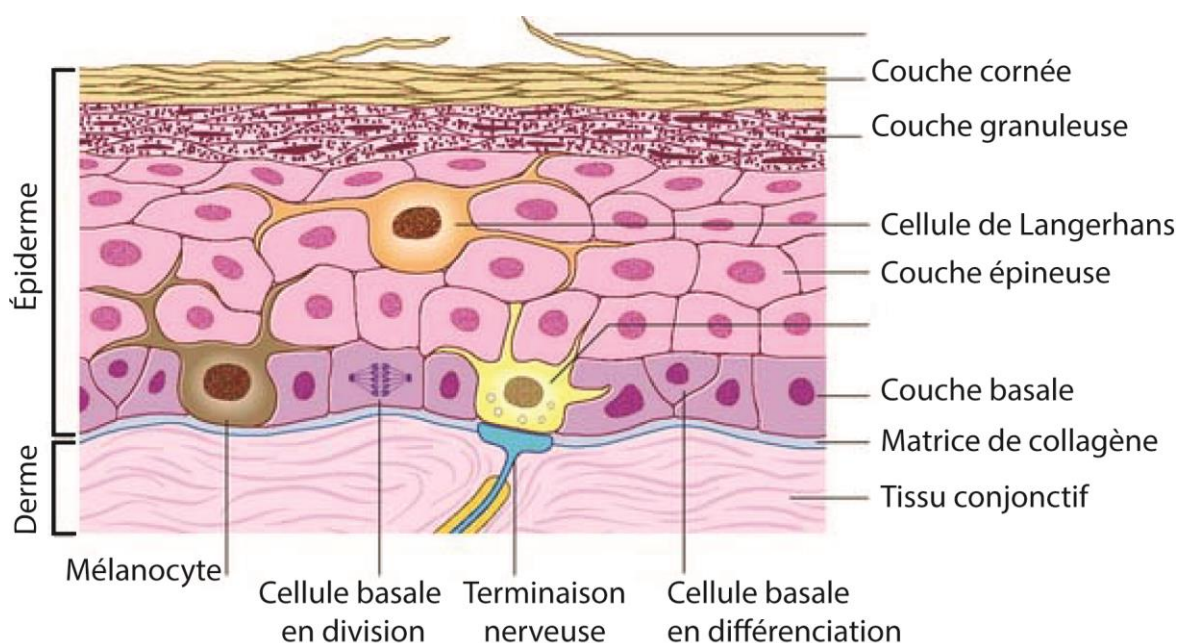
La prise de médicaments peut également causer l'apparition de nouvelles plaques ou exacerber celles déjà présentes (Abel et al., 1986). Les bêta-bloquants utilisés en cardiologie comme l'aténolol et le carbonate de lithium utilisé pour traiter les troubles psychiques sont bien connus pour induire cet effet secondaire. Les médicaments antimalariques comme l'hydroxychloroquine sont associés à une incidence élevée (30 % des patients psoriasiques) et à une aggravation importante du psoriasis (Herman, Shin, Holbrook et Rosenthal, 2006; Slagel, Corps, James et Corps, 1985; Tsankov, Kazandjieva et Drenovska, 1998). La prise de certains AINS inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX) comme le naproxène peut également empirer les symptômes du psoriasis. Cela semble contre-intuitif parce que l'inhibition de COX empêche la métabolisation de l'acide arachidonique en prostaglandines, qui sont d'importants médiateurs de l'inflammation et qui sont élevées dans la peau psoriasique. Cependant, l'accumulation d'acide arachidonique favorise plutôt sa métabolisation par la 5-lipoxygénase. Cette voie provoque la production de leucotriènes et de 12-HETE (acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque), deux autres médiateurs de l'inflammation (Tsankov et al., 1998) Ces deux composés se retrouvent d'ailleurs à des concentrations de 7 à 11 fois plus élevées dans la peau lésionnelle et de 3 à 7 fois plus élevées dans la peau non lésionnelle de patients psoriasiques que dans la peau d'une personne saine (Duell, Ellis et Voorhees, 1988).

Enfin, les habitudes de vie peuvent avoir un certain impact sur la sévérité des symptômes. Plusieurs études ont démontré une incidence plus importante du psoriasis chez les fumeurs et les ex-fumeurs. De plus, l'incidence croît avec la consommation de cigarettes et le nombre d'années de tabagisme (Li, Han, Choi et Qureshi, 2012). On a également découvert une corrélation entre le psoriasis et l'indice de masse corporelle (IMC). L'augmentation du risque de développer le psoriasis était de 1,6 chez les personnes en surplus de poids (IMC 26 – 29) et de 1,9 fois chez les personnes obèses (IMC  $\geq$  30). Il y aurait aussi une corrélation entre le niveau de stress et la maladie (Armstrong, Harskamp et Armstrong, 2012; Miller, Ellervik, Yazdanyar et Jemec, 2013; Naldi et al., 2005).



## 2.3 Histologie de l'épiderme psoriasique

L'épiderme, la couche superficielle de la peau qui est en contact avec l'extérieur, est constitué majoritairement de kératinocytes fortement connectés et superposés (Figure 6). Il mesure généralement entre 0,05 et 0,1 mm, mais il peut atteindre une épaisseur de 1 mm sur les paumes et sur la plante de pieds (Griffiths, Barker, Bleiker, Chalmers et Cream, 2016; Weller, Hunter, Savin et Dahl, 2013; Wiles, Williams et Ahmad, 2010). L'épiderme est lui-même une succession de plusieurs couches (Wickett et Visscher, 2006).



**Figure 6 : Structure de l'épiderme.** L'épiderme, la couche superficielle de la peau, est constituée d'une série de couches de kératinocytes qui se divisent dans la couche basale et dont les cellules filles se différencient progressivement pour former la couche épineuse, la couche granuleuse et, enfin, la couche cornée. L'épiderme abrite aussi d'autres types cellulaires comme les mélanocytes responsables de la pigmentation de la peau et des cellules de Langerhans qui détectent les stress. Image tirée et traduite de Young, O'Dowd et Woodford, 2013.

Tout d'abord, la couche la plus profonde de l'épiderme est la couche basale (stratum basale), qui repose sur une matrice de collagène sécrétée par les

fibroblastes du derme. Sa principale fonction est de constamment renouveler l'épiderme. Cette partie de la peau contient une unique couche de kératinocytes primaires. Ceux-ci sont les seuls kératinocytes de l'épiderme ayant la capacité de se diviser (Koster, 2009). La couche basale contient des mélanocytes qui ne kératinisent pas et dont la fonction est de synthétiser le pigment de la mélanine (Hirobe, 2014). Elle abrite aussi des cellules de Merkel dont les fonctions sont encore mal comprises mais qui auraient des propriétés mécano-sensorielles.

Au-dessus se trouve la couche épineuse (*stratum spinosum*) où les kératinocytes commencent à adopter une forme plus allongée. Ils sont caractérisés par une augmentation importante du nombre de desmosomes (jonctions serrées) et, ainsi, de la cohésion intercellulaire. C'est dans cette couche que commence l'expression des kératines 1 et 10 ainsi que la cornifine et l'involucrine (Eckert et Rorket, 1989; Griffiths et al., 2016; Weller et al., 2013; Wiles et al., 2010).

Ensuite vient la couche granuleuse (*stratum granulosum*) qui est d'une épaisseur de seulement deux à trois cellules. Elle porte ce nom car les kératinocytes y produisent des granules contenant des lipides et des protéines comme la loricine, la fillagrine et l'involucrine (Eckert, Sturniolo, Broome, Ruse et Rorke, 2005). Au cours de la migration, le contenu de ces granules est libéré et la kératinisation se continue. La fillagrine a comme effet d'agréger les fibres de kératines pour favoriser la compaction cellulaire alors que l'involucrine et la loricine sont fixées à la membrane pour la rendre imperméable (Eckes et al., 2010; Weller et al., 2013).

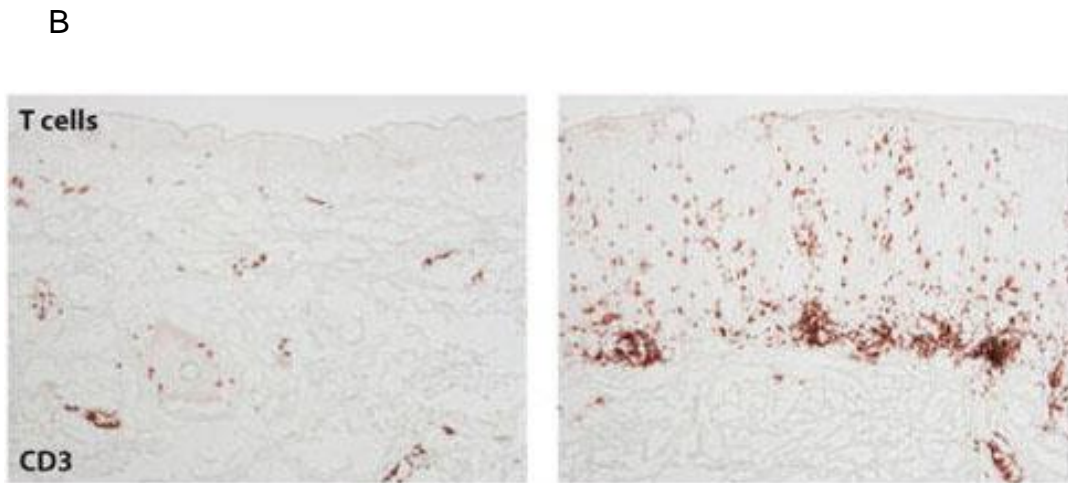
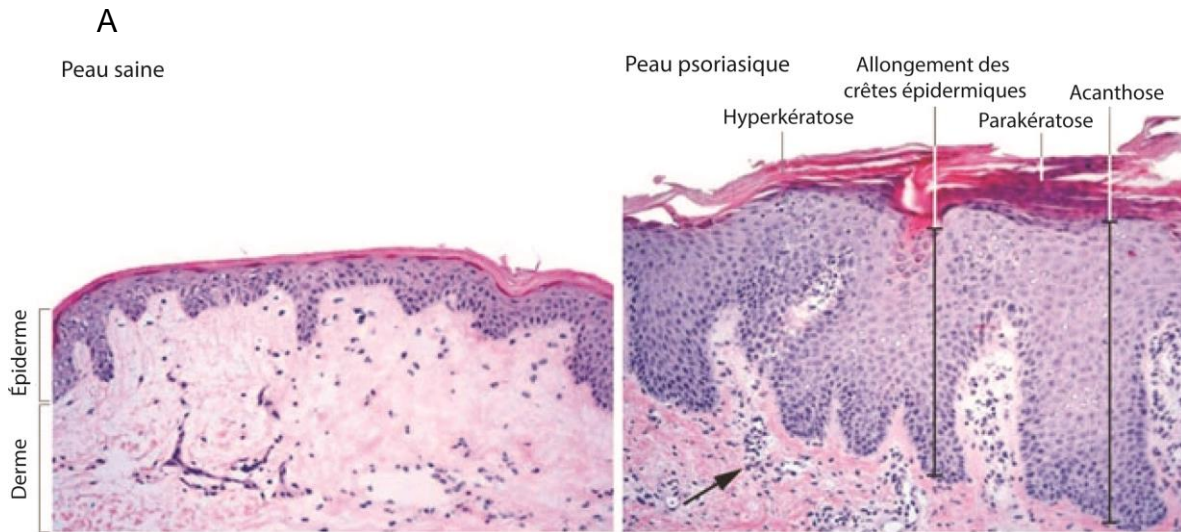
Enfin, la couche superficielle est la couche cornée. Sa formation est la raison d'être de l'épiderme (Madison, 2003). Les kératinocytes y terminent le processus de kératinisation et meurent afin de devenir des cornéocytes. Ils y perdent leur noyau et la plupart de leurs organelles et deviennent complètement aplaties et soudées. De plus, les transglutaminases catalysent la formation de liaisons covalentes entre les acides aminés des multiples protéines du cytosquelette (Eckert et al., 2005). Ils forment alors une barrière solide qui prévient l'évaporation et qui est complètement



étanche contre les agents extérieurs. Avec le temps, les cellules mortes desquament et de nouveaux cornéocytes prennent leur place (Griffiths et al., 2016; Weller et al., 2013; Wiles et al., 2010).

Les kératinocytes de la couche basale se divisent constamment afin de régénérer l'épiderme et les nouvelles cellules migrent vers l'extérieur de la peau après la mitose. On estime qu'un épiderme sain se renouvelle chaque mois. Cependant, les kératinocytes d'un épiderme psoriasique prolifèrent beaucoup plus rapidement de sorte qu'ils ont un taux de renouvellement de seulement 4 jours (J. Barker, 1991; Weinstein et Van Scott, 1965). Les plaques psoriasiques sont causées par une différenciation altérée de l'épiderme et par une hyperprolifération des kératinocytes de la couche basale. Lorsqu'on observe des coupes histologiques, cinq caractéristiques distinguent l'épiderme psoriasique de l'épiderme sain (Figure 7).

- 1) Acanthose : l'épiderme psoriasique est beaucoup plus épais que l'épiderme sain dû à l'augmentation de l'index mitotique des kératinocytes.
- 2) Parakératose : les cornéocytes possèdent toujours un noyau.
- 3) Infiltration des lymphocytes T : par immunohistochimie avec un marqueur contre CD3, on peut remarquer la présence d'un nombre important de lymphocytes T, alors qu'ils sont normalement peu nombreux (Perera et al., 2012).
- 4) Hyperkératose : la couche cornée s'épaissit considérablement.
- 5) Allongement des crêtes épidermiques : les crêtes épidermiques s'enfoncent beaucoup plus profondément dans le derme.



**Figure 7 : A) Différences histologiques entre l'épiderme sain et l'épiderme psoriasique.** L'épiderme (coloré en mauve foncé) psoriasique présente plusieurs caractéristiques qui le distinguent de l'épiderme sain. Il est d'abord beaucoup plus épais (acanthose). Ensuite, la couche cornée de cellules mortes (colorée en rose) est aussi plus imposante (parakératose). On remarque également la présence de noyaux (bleus) dans la couche cornée de l'épiderme psoriasique alors qu'ils devraient en être absents. Ensuite, les crêtes épidermiques de l'épiderme psoriasiques plongent beaucoup plus profondément dans le derme. Photographies tirées et traduites de Wagner et al., 2010. B) Différences de marquage CD3 entre de l'épiderme non-lésionnel et de l'épiderme psoriasique d'un même patient. L'épiderme lésionnel est également envahi par des cellules du système immunitaire

qui contribuent à perpétuer la boucle de l'inflammation dans la peau. Photographies tirées et traduites de Lowes, Suárez-Farinas et Krueger, 2014.

Outre les différences histologiques, l'épiderme psoriasique se distingue de l'épiderme sain par la présence de biomarqueurs spécifiques. Tout d'abord, dans l'épiderme psoriasique, le nombre de cellules qui expriment le marqueur de prolifération Ki67 est fortement augmenté, ce qui témoigne d'un indice prolifératif plus élevé (Sezer et al., 2015). Ensuite, l'épiderme psoriasique surexprime également une série de peptides antimicrobiens (Morizane et Gallo, 2012) dont les principaux sont la bêta-defensine 2 (hBD2) (Jansen et al., 2009), LL37 (Frohm et al., 1997), l'élafine (SKALP) (N. Tanaka, Fujioka, Tajima, Ishibashi et Hirose, 2000) et la psoriasine (S100A7) (De Jongh et al., 2005; Ekman, Vegfors, Bivik Eding et Enerbäck, 2017). Puis, il exprime abondamment les cytokératines 16 et 17 (CK16 et CK17), qui sont complètement absentes de l'épiderme sain (Leigh et al., 1995). Enfin, l'épiderme psoriasique exprime plus faiblement les marqueurs de différenciation des kératinocytes comme la loricrine, la fillagrine et la cytokératine 10 (CK10) (Perera et al., 2012).

## **2.4 Les modèles précliniques d'étude du psoriasis**

Il existe une variété de modèles précliniques du psoriasis. Ceux-ci permettent non seulement d'étudier le fonctionnement de la maladie, mais également de tester le potentiel de nouveaux traitements. Tout d'abord, plusieurs modèles cellulaires humains sont disponibles et même en développement. Cependant, la maladie implique l'interaction de plusieurs types cellulaires, dont les kératinocytes, les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les fibroblastes. Aucun modèle humain ne reproduit parfaitement la complexité de toutes ces interactions. Par la suite, il y a plusieurs modèles plus complets qui existent chez la souris, chacun avec ses avantages et ses limites.

### 2.4.1 Les modèles murins de psoriasis

Le psoriasis n'existe pas chez les autres animaux, d'où la nécessité de développer des modèles d'études par la recherche humaine. Même s'ils ne reproduisent pas parfaitement la complexité et les symptômes du psoriasis humain, ils demeurent quand même très utiles dans le contexte des études précliniques. Tout d'abord, plusieurs modèles de souris avec des mutations génétiques existent.

Deux modèles de souris avec des mutations spontanées sont disponibles. Le premier est le modèle *Flaky skin* (Fsn) qui possède une mutation autosomale récessive dans le chromosome 17. Les souris Fsn ont des problèmes d'anémie, une hyperplasie au niveau du pré-estomac et des plaques squameuses sur la peau (Beamer, Pelsue, Shultz, Sundberg et Barker, 2018). Elles répondent positivement à un traitement aux corticostéroïdes. Néanmoins, ce modèle n'est pas très intéressant pour l'étude du psoriasis parce que les événements menant à la formation de plaques sur la peau demeurent incompris. De plus, plusieurs caractéristiques clés de la pathologie sont absentes. Par exemple, il n'y a pas d'infiltration de lymphocytes T dans l'épiderme et les kératinocytes n'expriment pas les kératines associées à l'hyperprolifération (Danilenko, 2008).

Le second modèle de mutation spontanée est la souris *chronic proliferative dermatitis mouse* (cpdm). Ces souris possèdent la mutation autosomale récessive *cpdm* sur le chromosome 15 (Sundberg et al., 2000). Elles souffrent de dermatite chronique qui leur cause de la démangeaison et de la desquamation et leur épiderme est marqué par l'infiltration de macrophages et d'éosinophiles (Hogenesch, Janke, Boggess et Sundberg, 1999)(Hogenesch et al., 1999). Leur épiderme montre aussi des signes d'hyperplasie, d'hyperkératose et de parakératose. Enfin, le derme et l'épiderme sont envahis par des granulocytes et par des macrophages. Cependant, ce modèle est caractérisé par une augmentation des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13), qui sont sécrétées par les lymphocytes Th2, alors que les symptômes du psoriasis impliquent principalement les lymphocytes

Th1 et Th17. À cause de cette différence majeure, le modèle de souris cpdm est moins pertinent pour l'étude du psoriasis (Hogenesch et al., 2001).

Des modèles transgéniques de souris ont été générés par la suite dans le but qu'ils soient plus représentatifs de la pathologie. Ces modèles impliquent généralement l'expression d'une cytokine, d'un facteur d'adhésion, d'un facteur de transcription ou d'un médiateur de l'inflammation sous l'effet du promoteur d'un gène de la couche basale (*KRT5* ou *KRT14*) ou de la couche différenciée (*IVL* ou *KRT10*) (Gudjonsson, Johnston, Dyson, Valdimarsson et Elder, 2007; Wagner, Schonhaler, Guinea-Viniegra et Tschachler, 2010). Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés, mais leurs symptômes varient grandement et ne reflètent que partiellement ceux du psoriasis. Autrement, ils affectent parfois l'intégrité de l'épiderme, mais sans l'implication du système immunitaire. L'incapacité de reproduire fidèlement tous les symptômes du psoriasis à partir de la modification de l'expression d'un seul gène réitère le fait que la maladie est multifactorielle (Danilenko, 2008). Malgré tout, les modèles transgéniques demeurent intéressants pour étudier l'impact de chaque gène dans l'établissement de la maladie.

Ensuite, le modèle de xénogreffe reste celui qui reproduit le plus fidèlement les symptômes du psoriasis. Dans ce dernier, de la peau lésionnelle de patients psoriasiques est prélevée et transplantée sur une souris immunodéprimée (Boyman et al., 2004). Malheureusement, il est peu répandu à cause de nombreux obstacles techniques. Il exige notamment la collaboration d'un chirurgien et l'apport constant de dons de peaux psoriasiques fraîches pour éviter l'ischémie. De plus, la variabilité de la provenance et de la qualité des tissus provoque des différences de phénotype et rend le modèle peu reproductible (Hawkes, Adalsteinsson, Gudjonsson et Ward, 2018).

De nos jours, le standard de l'industrie est plutôt le modèle de psoriasis induit par l'application de la crème à l'imiquimod (IMQ) sur les souris. Cette crème est normalement utilisée chez l'humain pour traiter les verrues génitales, les kératoses

actiniques et les carcinomes superficiels. C'est par hasard qu'on a découvert que la crème à l'imiquimod (Aldara™) pouvait provoquer le psoriasis chez l'humain. En effet, un premier cas a été rapporté en 2004 où la crème a provoqué une rechute de psoriasis localisée à l'endroit de l'application chez une patiente traitée pour un carcinome et dont le psoriasis était stable depuis 14 ans (Wu, Siller et Strutton, 2004). Ensuite, un cas semblable a été rapporté en 2006 chez une patiente dont le psoriasis était en rémission depuis quatre ans (Rajan et Langtry, 2006).

L'IMQ active le récepteur TLR-7 (Toll Like Receptor-7) des cellules dendritiques afin de simuler une infection virale et d'activer l'inflammasome au site d'application (Schön et Schön, 2007). En plus de l'IMQ, l'acide isostéarique présent dans la crème contribuerait aussi à cet effet (Walter et al., 2013). Le modèle induit à l'IMQ est relativement simple à reproduire. Tout d'abord, les souris sont rasées sur la surface du dos. Puis, pendant 6 ou 7 jours consécutifs, une quantité fixe de crème à l'IMQ est appliquée quotidiennement sur la peau nue. La crème peut également être appliquée en parallèle sur la surface de l'oreille. Puis, pour suivre l'évolution des symptômes, la rougeur, la desquamation et l'épaisseur de la peau dorsale sont évaluées quotidiennement et l'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'un vernier. Lors du dernier jour de l'expérience, les souris sont euthanasiées et les peaux sont prélevées pour faire de l'analyse d'expression de gènes et être étudiées en microscopie (Rather, Bajpai, Han et Nam, 2016).

Le modèle d'induction à l'IMQ reproduit assez fidèlement les symptômes du psoriasis et implique les mêmes voies des Th1 et des Th17 (van der Fits et al., 2009). Ensuite, les symptômes psoriasiques de la souris peuvent être atténués par l'application de traitements antipsoriasiques reconnus comme la cyclosporine A et la bétaméthasone (C.-H. Kim, Kim et Lee, 2015; Mori, Arita, Yamaguchi, Hirai et Kurebayashi, 2016). Ce modèle a pour avantage notable d'être accessible, relativement peu coûteux et simple à reproduire. En revanche, son utilisation est limitée dans le temps puisque les symptômes s'amenuisent spontanément à partir de la 8<sup>e</sup> journée. Plus récemment, on a découvert que l'utilisation de la crème sur le

modèle de souris transgénique *K14-VEGF* permettait de prolonger les effets pro-inflammatoires de l'IMQ jusqu'au quatorzième jour (Wang, Sun et Hu, 2015).

#### **2.4.2 Les modèles *in vitro* de psoriasis humain**

##### *Les monocultures de cellules*

Plusieurs laboratoires travaillent à développer et à améliorer les modèles *in vitro* de psoriasis humains. Ils ont l'avantage d'être plus près de la pathologie réelle et de permettre de réduire l'utilisation d'animaux pour la recherche. Les cellules en culture demeurent toujours le modèle le plus utilisé pour évaluer les effets de nouvelles molécules grâce à leur simplicité et à leur reproductibilité. Par conséquent, elles sont largement utilisées pour des criblages à grande échelle de grandes chimiothèques. Elles ne tiennent cependant pas compte des interactions entre les différents types cellulaires et sont donc loin de la réalité. Néanmoins, elles permettent d'élucider les effets d'un traitement sur un type de cellules en particulier. Dans le cas du psoriasis, on emploie principalement des kératinocytes, mais également des fibroblastes et des cellules du système immunitaire comme des lymphocytes. Les kératinocytes utilisés proviennent soit d'une souche de cellules humaines immortalisées ou encore de biopsies de patients. Les kératinocytes immortalisés ont le défaut de contenir des aberrations génétiques qui les rendent moins fidèles à la réalité, mais ils demeurent une solution de rechange intéressante aux kératinocytes normaux, qui sont plus complexes à cultiver. Dans le cas du psoriasis, on utilise fréquemment les cellules HaCaT (Human Calcium Temperature). Les HaCaT sont des kératinocytes qui ont été immortalisés à la suite de plus de 140 passages dans du milieu pauvre en sérum et à haute température (40°C) (P Boukamp et al., 1999; Petra Boukamp et al., 1988; Fusenig et Boukamp, 1998). En effet, ils conservent leur capacité à se différencier en fonction de la concentration de calcium extracellulaire et peuvent même former spontanément un épiderme lorsqu'ils poussent sur une matrice de fibroblastes (Deyrieux et Wilson, 2007; Schoop, Mirancea et Fusenig, 1999).

Les HaCaT et les kératinocytes normaux peuvent être utilisés pour étudier les effets pharmacologiques de molécules antipsoriasiques, notamment en évaluant leur capacité à bloquer la prolifération ou à induire la différenciation cellulaire (Pol, Bergers et Schalkwijk, 2003; Takahashi et al., 2003). De plus, on peut incuber ces cellules en présence de cytokines comme TNF $\alpha$  et IL-17A pour stimuler l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. De cette façon, on peut évaluer le potentiel anti-inflammatoire de molécules en étudiant leur capacité à diminuer l'expression des gènes de l'inflammation (Cho, Lee et Kim, 2007; Weng, Patel, Vasiadi, Therianou et Theoharides, 2014). Par conséquent, malgré l'élaboration de modèles plus complexes et plus fidèles au psoriasis, les cellules en culture demeurent à ce jour un modèle incontournable pour l'étude des effets pharmacologiques de nouvelles molécules.

#### *Les modèles de peaux 3D reconstituées*

Plus un modèle est complexe et fidèle à la physiologie humaine, plus il devient pertinent pour les études pharmacologiques (Mathes, Ruffner et Graf-Hausner, 2014). Par conséquent, on s'intéresse depuis quelques années aux modèles 3D de peau humaine reconstituée. Il y a de nombreuses preuves qui montrent que le derme a également un rôle à jouer dans le psoriasis. En effet, il a été démontré que des fibroblastes de patients psoriasiques pouvaient induire l'hyperprolifération des kératinocytes (Krueger et Jorgensen, 1990). Les fibroblastes psoriasiques libèrent notamment de l'interleukine-8 qui, par communication paracrine, influence leur vitesse de croissance (Konstantinova et al., 1996). En ce sens, un modèle de monocouche formé d'un seul type de cellules ne peut représenter fidèlement le psoriasis.

Dans cette optique, une équipe de chercheurs a développé en 2004 un modèle 3D à partir de kératinocytes et de fibroblastes normaux ou provenant d'une peau lésionnelle ou non lésionnelle d'un patient psoriasique. Dans ce modèle, les kératinocytes sont déposés sur une matrice de collagène contenant des fibroblastes.



Ils poussent ainsi à l'interface air-liquide pendant 21 jours et recréent naturellement les différentes strates de l'épiderme. À l'instar de la peau psoriasique, leur modèle *in vitro* montrait une expression accrue de l'*IL-8*, de *TNF $\alpha$* , d'*IFN- $\gamma$* , du récepteur *CXCR2* ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67 (C. L. Barker et al., 2004).

Plusieurs autres versions de ce modèle ont depuis été élaborées, variant l'origine des cellules et la méthode d'échafaudage. Par exemple, l'équipe du Dr Schalkwijk a conçu en 2008 un modèle fait à partir de kératinocytes normaux et d'un derme sain auquel on a retiré l'épiderme. Les dermes sont surmontés par un anneau métallique à l'intérieur duquel on étale les kératinocytes. Le lendemain, l'anneau est retiré et les kératinocytes sont submergés dans le milieu de culture pendant 3 jours avant d'être cultivés à l'interface air-liquide pendant 10 jours. Pour induire les symptômes du psoriasis, les cellules sont incubées en présence d'*IL-1 $\alpha$* , d'*IL-6*, de *TNF $\alpha$*  et d'*IL-22* pendant les 4 derniers jours. Le tissu ainsi traité avec les cytokines exprime fortement les marqueurs SKALP et hBD-2 par rapport au tissu témoin. Le niveau d'expression normal peut être rétabli par le traitement avec de l'acide rétinoïque qui est connu pour moduler négativement l'expression de ces deux gènes (Nagpal et al., 1996). Par contre, ce modèle ne présente pas de différence histologique notable entre le tissu sain et le tissu psoriasique (Tjabringa et al., 2008). Par la suite, l'équipe de Dre Roxanne Pouliot a réussi à mettre au point un modèle où des lymphocytes T activés sont étalés sur la couche de fibroblastes avant l'ajout des kératinocytes. L'addition de ces lymphocytes T altère la différenciation de l'épiderme et accélère la prolifération des kératinocytes, tel que mis en évidence par une augmentation de l'expression du marqueur de prolifération PCNA (Lorthoïis, Simard, Morin et Pouliot, 2019).

Un modèle des plus répandus est celui développé par la firme MatTek Corporation (<https://www.mattek.com/>). Dans ce modèle, des fibroblastes psoriasiques provenant de peau lésionnelle de patients sont cultivés puis intégrés dans une matrice de gel de collagène. Enfin, des kératinocytes normaux sont étalés

sur cette matrice et on les laisse proliférer, submergés dans le milieu de culture pendant quatre jours puis à l'interface air-liquide pendant sept jours. Les tissus formés à partir d'une matrice de fibroblastes psoriasiques plutôt que normaux produisent dans le milieu beaucoup plus d'IL-6 et d'IL-8 et ils expriment fortement des marqueurs du psoriasis dont K16, élafine, Ki67, psoriasine et calgranuline C (Ayehunie et al., 2012). S'ils sont encore nouveaux, les modèles 3D de peaux psoriasiques reconstituées sont des outils précieux qui prendront de plus en plus d'importance dans l'évaluation de nouveaux composés thérapeutiques.

## **2.5 Les traitements disponibles contre le psoriasis**

Les médicaments topiques utilisés pour traiter le psoriasis sont variés. On retrouve parmi eux les analogues de la vitamine D, les rétinoïdes, l'anthraline et le goudron. Ces derniers fonctionnent en induisant la différenciation des kératinocytes et en inhibant leur prolifération (Mitra et Atillasoy, 2012). Par la suite, des agents kératolytiques comme l'acide salicylique peuvent aussi être utilisés pour déstabiliser les interactions cellule-cellule et faciliter le retrait des plaques (Lebwohl, 1999). S'ajoutent par la suite les corticostéroïdes, qui sont principalement connus comme anti-inflammatoires et qui sont aussi les traitements topiques les plus prescrits (National Psoriasis Foundation, 2019). Ils fonctionnent en activant la voie du récepteur aux glucocorticoïdes, ce qui a pour effet de réprimer la voie NF- $\kappa$ B et la transcription de gènes pro-inflammatoires comme *TNF $\alpha$* , *IL-6*, *IL-8* et *COX2*. Il existe plusieurs types de corticostéroïdes d'efficacité différente; des plus faibles qui sont offerts en vente libre, comme les crèmes d'hydrocortisone, jusqu'aux très puissants qui sont uniquement accessibles sur ordonnance, comme le propionate de clobétasol et le dipropionate de bétaméthasone (Uva et al., 2012). En revanche, puisque l'activation de la voie du récepteur aux glucocorticoïdes module d'autres processus que l'inflammation, de nombreux effets secondaires sont associés à la prise de corticostéroïdes topiques. On note tout d'abord la tachyphylaxie, soit la diminution progressive de l'efficacité du traitement, exigeant ainsi la prise de molécules plus puissantes. Elle serait causée par les effets vasoconstricteurs et antiprolifératifs sur les fibroblastes du derme (Vivier, 1976). Néanmoins, l'effet

secondaire le plus répandu est l'atrophie de l'épiderme, ce qui fragilise la peau, diminue son élasticité, la sensibilise aux rayons UV et ralentit son processus de guérison (Hengge, Ruzicka, Schwartz et Cork, 2006; Schoepe, Schäcke, May et Asadullah, 2006). Ce phénomène serait causé par la combinaison d'un effet antiprolifératif et de l'inhibition de la synthèse du collagène par les fibroblastes. De plus, l'usage à long terme des corticostéroïdes provoque parfois l'apparition de vergetures, des cicatrices permanentes au derme qui sont provoquées par un stress mécanique (Wollina et al., 2007), de la rosacée et de l'acné au visage (Hengge et al., 2006). Enfin, la photothérapie des UVBs est une méthode très efficace pour traiter les plaques de psoriasis et d'autres maladies de la peau. Ce type de rayonnement induit l'apoptose des lymphocytes T au site de la lésion. Il a donc des actions immunomodulatrices et immunosuppressives (Kemény et al., 2010). De façon moins importante, il aurait aussi un effet antiprolifératif en affectant la synthèse de l'ADN des kératinocytes (Weichenthal et Schwarz, 2005). La photothérapie peut être utilisée sur les corps en entier dans les cas de psoriasis sévères ou de façon plus localisée pour les cas de psoriasis légers à modérés (Kemény et al., 2010).

Ensuite, il existe quelques médicaments oraux qui vont traiter de façon systémique la maladie. Le méthotrexate est celui qui le plus prescrit car il est très efficace (Menter et al., 2009). Son utilisation nécessite par contre un suivi constant, car elle peut provoquer une défaillance du foie, une aplasie médullaire ou encore une fibrose pulmonaire (Kalb, Strober, Weinstein et Lebwohl, 2009). Le méthotrexate a une action antiproliférative sur les kératinocytes de l'épiderme en plus de diminuer l'expression des sélectines chez les cellules endothéliales, ce qui diminue le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation (Dahlman-Ghozlan, Ortome, Heilborn et Stephansson, 2004). De plus, il induirait l'apoptose chez les lymphocytes T et permettrait de réguler leur population (Herman, Zurgil et Deutsch, 2005). Ensuite, la cyclosporine A (CsA) est un agent immunosuppresseur qui peut être pris par voie orale ou par voie intraveineuse. Il s'agit d'un peptide qui s'accumule dans les lymphocytes T, les granulocytes et dans plusieurs autres types de cellules. La CsA agit sur les lymphocytes T en formant un complexe avec la cyclophiline afin

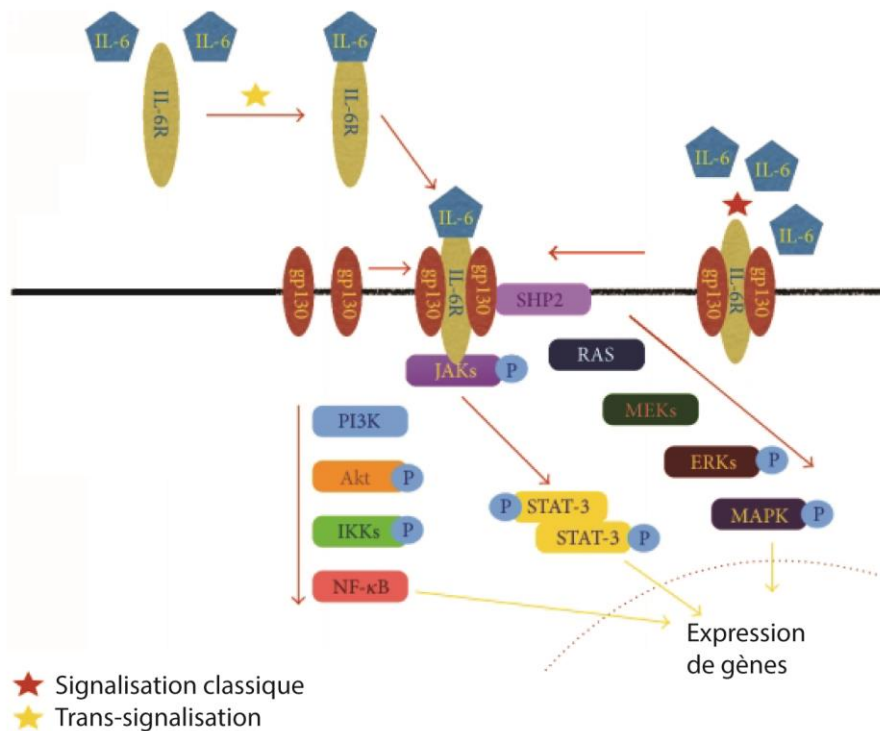
d'inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine et des facteurs de transcription NFAT (Matsuda et Koyasu, 2000). De plus, elle empêche l'activation des MAP kinases JNK et p38 (Matsuda, Moriguchi, Koyasu et Nishida, 1998), ce qui a pour conséquence d'inhiber la production de l'interleukine-2 et de l'interleukine-4 et de diminuer la réponse inflammatoire. La CsA est surtout prescrite dans les cas de psoriasis modéré à sévère. Cependant, elle peut engendrer de la neurotoxicité, de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité (Matsuda et Koyasu, 2000). Enfin, l'acitrétine est un dérivé de la vitamine A qui est pris sous forme orale. C'est un traitement systémique beaucoup moins efficace que les autres et par conséquent, il est généralement employé en combinaison avec un autre traitement (Menter et al., 2009). Son mécanisme d'action n'est pas parfaitement compris, mais il agirait comme immunomodulateur et régulerait la différenciation et la prolifération des kératinocytes de l'épiderme (Gonzalez Ortiz, Nijhawan et Weinberg, 2013).

Par la suite, on peut également traiter le psoriasis par injection d'anticorps ciblés contre des cytokines précises. Les anticorps se lient à leur cible avec une forte affinité et court-circuitent la réponse immunitaire (Burness et McKeage, 2015). Les agents biologiques sont extrêmement efficaces dans plusieurs types de maladies auto-immunes. Par contre, ils sont extrêmement dispendieux et sont donc utilisés comme des médicaments d'exception (Dubois Declercq et Pouliot, 2013). Les plus utilisés sont l'adalimumab, l'infliximab (deux anti-TNF $\alpha$ ) (Alwawi, Mehlis et Gordon, 2008; Papoutsaki et Costanzo, 2013), l'éthanercept (un récepteur dimérique soluble de TNF $\alpha$ ) (Hoy et Scott, 2007) et l'ustekinumab (anti-p40, la sous-unité commune de IL-12 et IL-23) (Reich, Yasothan et Kirkpatrick, 2009). Plusieurs autres sont encore en attente d'approbation comme les anti-IL-17 et les anti-IL-23 (Dubois Declercq et Pouliot, 2013). Les effets secondaires des médicaments biologiques sont plus rares, mais néanmoins présents. Tout d'abord, ils sont associés à un risque accru d'infection respiratoire (Abrouk et al., 2016; Scheinfeld, 2005). Les bloqueurs de TNF $\alpha$  sont parfois associés à une maladie démyélinisante et ne devraient pas être utilisés chez des patients souffrant de sclérose en plaques (Kemanetzoglou et Andreadou, 2017). Enfin, leurs utilisateurs peuvent développer

des anticorps contre les médicaments, ce qui a pour effet de les neutraliser (Jullien, Prinz et Nestle, 2015).

### 3 La voie de l'IL-6

La production aberrante de cytokines qui perpétuent la boucle inflammatoire contribue largement au psoriasis. L'interleukine-6 (IL-6) est un médiateur cellulaire soluble qui a justement un rôle important dans l'établissement de l'inflammation cutanée, notamment dans le psoriasis (Figure 8). Cette cytokine est produite par les lymphocytes T et B, les cellules endothéliales, les cellules myéloïdes, les fibroblastes ainsi que les cellules épithéliales (Keystone et Omair, 2015). Si elle est normalement présente en très faible concentration dans le plasma sanguin, elle est fortement induite lors d'un stress inflammatoire ou lors de la présence d'un agent pathogène dans l'organisme. L'IL-6 induit la défense et la réparation tissulaires, la vasodilatation et la maturation des leucocytes (Camporeale et Poli, 2012). L'IL-6 est régulée au niveau de son expression par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, mais aussi de la stabilité de son ARNm par le facteur Arid5a et par la RNase Regnase1 (Kira et Akira, 2013; Masuda et al., 2013; T. Tanaka, Narazaki et Kishimoto, 2014).



**Figure 8 : Voie de signalisation de l'IL-6.** L'IL-6 présente dans le milieu extracellulaire se lie au récepteur IL-6R présent à la surface des cellules (voie classique) ou soluble (trans-signalisation). Puis, le complexe IL-6/IL-6R induit une cascade de signalisation qui mène à l'activation de STAT3, des MAPKs et de la voie NF- $\kappa$ B. Schéma tiré, modifié et traduit de Saggini, Chimenti et Chiricozzi, 2014.

L'IL-6 médie ses effets en liant son récepteur IL-6R. IL-6R peut être présent soit à la membrane ou bien à l'extérieur des cellules sous une forme soluble (sIL-6R). Ce sont respectivement les voies de signalisation classiques et de trans-signalisation. Dans les deux cas, la liaison de l'IL-6 à son récepteur provoque la dimérisation de gp130, puis l'activation de la voie JAK/STAT3 (Rose-John, 2012). STAT3 est reconnu comme étant le médiateur principal des effets de l'IL-6. L'activation de cette voie induit la différenciation des lymphocytes B, et la différenciation des cellules T en lymphocytes Th17 et à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'interaction avec RELA (Diehl et Rincón, 2002; Yu, Pardoll et Jove, 2009).

### **3.1 L'IL-6 dans le psoriasis**

De nombreuses études confirment que l'IL-6 joue un rôle crucial dans l'inflammation cutanée. D'ailleurs, une simple exposition des patients aux rayonnements UV provoque une hausse de la concentration de l'IL-6 dans le plasma sanguin (Ubranski et al., 1990). Normalement, l'expression de l'IL-6 dans les kératinocytes est très faible, mais elle augmente fortement en présence de cytokines comme TNF $\alpha$  et IL-17A (Kupper et al., 1989). On détecte une plus forte concentration sanguine d'IL-6 chez les patients psoriasiques et chez les patients atteints de dermatite atopique (dans une moindre mesure) que chez les personnes saines. De plus, on a observé dans des coupes de peau de patients que cette cytokine est fortement présente au niveau des plaques alors qu'elle est absente dans la peau non lésionnelle (Grossman et al., 1989).

On a observé à de multiples reprises que l'ajout d'IL-6 recombinante dans du milieu de culture décuple la vitesse de prolifération des kératinocytes (Elder et al., 1992; Grossman et al., 1989; Neuner et al., 1991). D'ailleurs, si l'injection sous-cutanée d'IL-23 recombinante dans des souris provoque de l'hyperplasie épidermique similaire au psoriasis, cet effet est totalement absent lorsque l'IL-23 est injectée dans des souris IL6<sup>-/-</sup>. Ce phénomène serait expliqué par le fait que les souris déficientes en IL-6 n'expriment qu'un niveau minimal d'IL-17A et sont incapables de produire la sous-unité IL-22R1A du récepteur à l'IL-22 (Lindroos et al., 2011). L'IL-6 agirait comme facteur de croissance par voies autocrine et paracrine dans l'épiderme et serait donc responsable en partie de l'hyperplasie de l'épiderme psoriasique. L'IL-6 est également impliquée avec TGFβ dans la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). De plus, l'IL-6 est nécessaire et suffisante pour permettre aux lymphocytes T effecteurs de surmonter l'action immunosuppressive des lymphocytes Treg afin de prolonger la boucle inflammatoire (Goodman et al., 2009; Pasare et Medzhitov, 2003).

L'IL-6 serait aussi impliquée dans d'autres maladies auto-immunes. Tout d'abord, plusieurs chercheurs ont démontré que l'IL-6 est fortement surexprimée chez les patients atteints de la maladie de Crohn par rapport aux personnes saines (Gross, Andus, Caesar, Roth et Schölmerich, 1992; Mahida, Kurlac, Gallagher et Hawkey, 1991). Elle est aussi corrélée avec la sévérité de la maladie et constitue un paramètre pour évaluer le pronostic des patients après leur rémission (Reinisch, 1999). Puis, chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, les cellules extraites du liquide synovial expriment aussi de façon constitutive IL-6 et sa surproduction locale serait en partie responsable de l'inflammation aux jointures (Hirano et al., 1988). Une autre étude réalisée sur des patients atteints de la forme juvénile de la maladie a démontré une corrélation directe entre la sévérité des symptômes et la concentration sanguine d'IL-6 et a réitéré l'importance de la cytokine dans la pathogenèse (de Benedetti et al., 1991).



## 4 La voie de signalisation AHR

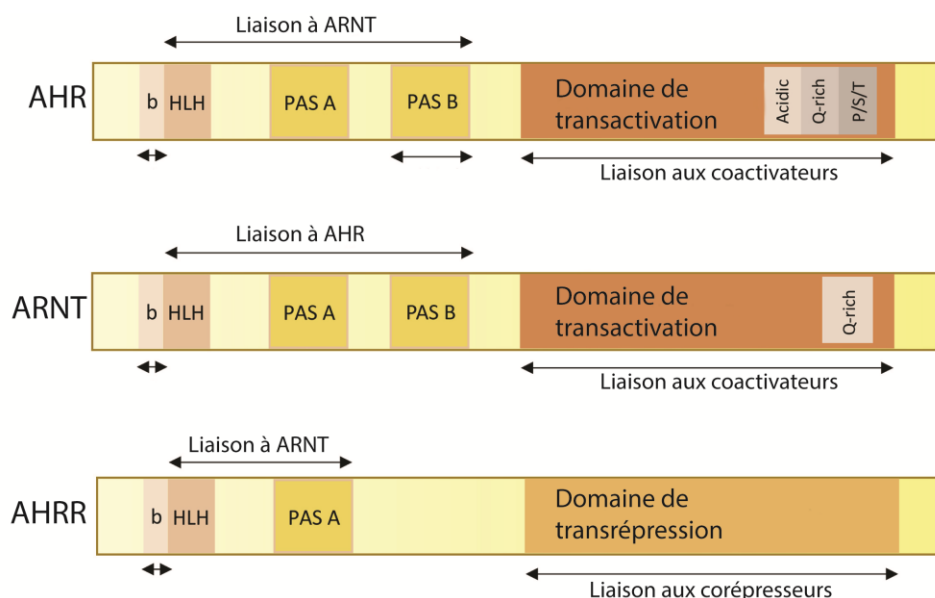
De plus en plus d'études démontrent que la voie de signalisation AHR joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation cutanée. De plus, nos recherches démontrent que cette voie de signalisation serait potentiellement ciblée par les PcAUs. Pour ces raisons, la voie de signalisation AHR sera décrite dans cette section.

### 4.1 Identification de la protéine AHR

La protéine Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), un facteur de transcription encodé chez l'humain par le gène AHR, a été premièrement identifiée chez la souris en 1974. On a découvert que l'injection d'hydrocarbures aromatiques comme le  $\beta$ -naphthoflavone et le 3-méthylcholanthrène dans la souris provoquait l'augmentation de l'activité enzymatique de l'enzyme Aryl Hydrocarbon Hydrolase (AHH), aujourd'hui connu sous le nom de cytochrome P450 1A1. Par une série de croisements, on a créé une lignée de souris déficientes pour l'induction de l'activité de AHH. On a découvert chez ces souris le locus Ah auquel on a attribué la responsabilité de l'induction de l'enzyme en réponse aux hydrocarbures aromatiques (Nebert, Consideine et Owens, 1974; Robinson et al., 1974). Ce n'est qu'en 1992 que le gène *Ahr* murin a été sous-cloné et caractérisé comme étant un facteur de transcription ligand-dépendant avec une affinité pour le 2-azido-3-[<sup>125</sup>I] iodo-7,8-dibromodibenzo-*p*-dioxin, un hydrocarbure aromatique (Burbach, Poland et Bradfield, 1992). Son partenaire d'interaction, ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), a aussi été identifié et montré comme étant essentiel pour la liaison de AHR sur l'ADN (Reyes, Reisz-porszasz et Hankinsont, 1992).

## 4.2 Structure de AHR

AHR et ARNT font partie de la famille des « basic-helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim » (bHLH-PAS) (Figure 9). Ces derniers sont constitués d'un domaine basique-hélice-boucle-hélice (bHLH), de deux domaines PAS (PAS A et PAS B) et d'un domaine de transactivation (TAD). Le domaine bHLH est impliqué dans les interactions protéine-ADN et protéine-protéine. Puis, le premier domaine PAS (PAS A) permet l'hétérodimérisation avec ARNT (Dolwick, Swanson et Bradfield, 1993; Huang, Ederly et Rosbash, 1993) alors que le deuxième (PAS B) contient la poche de liaison pour les ligands (Webb, 2014). Enfin, le domaine de transactivation permet l'activation de la transcription après la liaison sur l'ADN (Stevens, Mezrich et Bradfield, 2009).

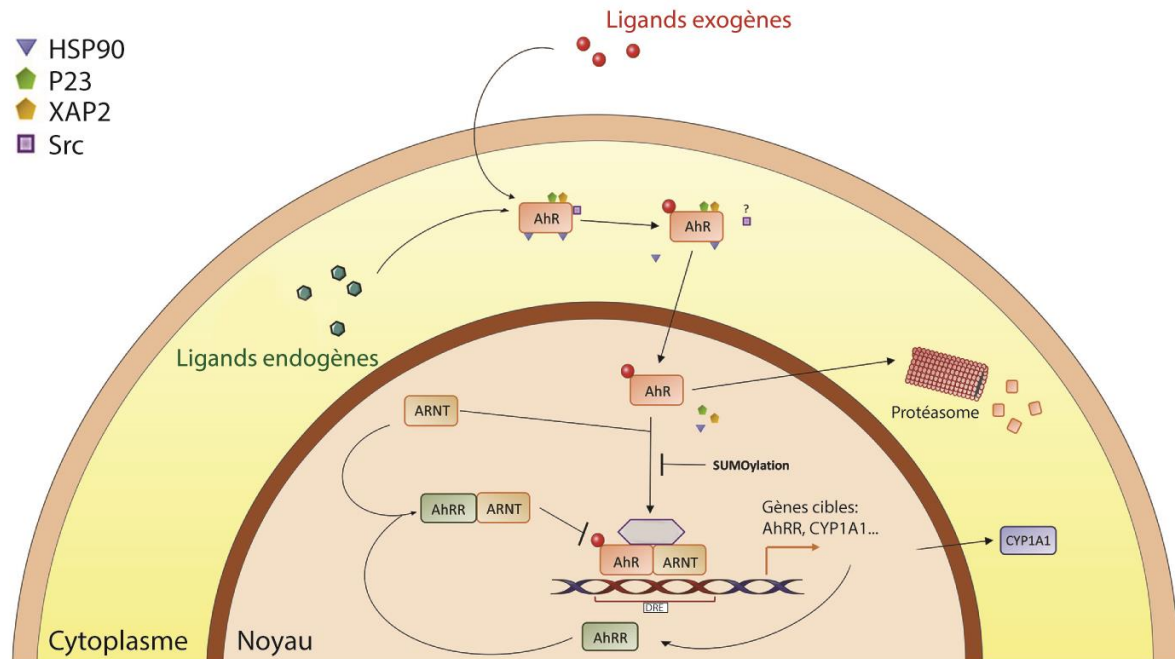


**Figure 9 : Structures de AHR, de ARNT et de AHRR.** Dans la partie N-terminale de AHR, on retrouve un domaine de liaison à l'ADN et les répétitions PAS A et PAS B qui permettent l'interaction avec ARNT. Le domaine PAS B permet également l'interaction avec un ligand. Sa partie C-terminale contient un domaine de transactivation qui permet la liaison à des coactivateurs. ARNT a une structure semblable mais ne possède pas de domaine de liaison à un ligand dans sa région PAS B. AHRR a une structure semblable à AHR, mais ne possède pas de domaine

PAS B et il a plutôt un domaine de corépression dans sa portion C-terminale. Schéma tiré, modifié et traduit de Larigot, Juricek, Dairou et Coumoul, 2018.

### 4.3 La voie de détoxification de AHR

Chez l'humain, AHR est principalement connu pour sa voie de signalisation classique qui régule le métabolisme des xénobiotiques, les substances exogènes et néfastes (Figure 10). Dans des conditions normales, AHR se retrouve dans le cytoplasme où il forme un complexe avec les protéines p23, XAP-2 (X-associated protein 2) et deux chaperonnes HSP90 (Heat Shock Protein of 90 kDa), (Kazlauskas, Poellinger et Pongratz, 1999; Meyer, Pray-Grant, Vanden Heuvel et Perdew, 1998). La liaison de AHR à un agoniste permet d'exposer sa séquence de localisation nucléaire et de transloquer au noyau où il se libère de son complexe et forme un hétérodimère avec ARNT (Denison, Pandini, Nagy, Baldwin et Bonati, 2002; Henry, 2003). Le complexe AHR-ARNT peut ensuite se fixer sur ses séquences DRE (Dioxin Response Element) et induire la transcription génique. Les principaux gènes cibles de AHR sont *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, (Cytochrome P Oxydase P450 A1, A2 et B1), *NQO1* (Quinone Oxydoréductase I) et *ALDH3A1* (Aldéhyde Déshydrogénase III). L'expression de ces enzymes permet de métaboliser dans la cellule les substances exogènes et activatrices de AHR, ce qui diminue la disponibilité des ligands de AHR et mène par le fait même à l'inactivation de cette voie de signalisation (Barouki, Coumoul et Fernandez-Salguero, 2007; N. Zhang, 2011). Une autre voie de rétro-inhibition existe par l'entremise de AHRR (AHR repressor). Le promoteur du gène *AHRR* contient une séquence DRE pour la liaison de AHR/ARNT et l'activation de la transcription. AHRR agit comme un inhibiteur compétitif pour ARNT et provoque l'expulsion de AHR du noyau vers le cytoplasme où il est dégradé par le protéasome (Davarinos et Pollenz, 1999; Mimura, Ema, Sogawa et Fujii-Kuriyama, 1999).



**Figure 10 : Voie de signalisation classique de AHR.** En réponse à un agoniste (ligand endogène ou exogène), AHR se libère de son complexe cytosolique (HSP90, P23, XAP2) et transloque au noyau. Puis, il s'associe avec son partenaire ARNT et se fixe sur les régions DRE dans l'ADN afin d'induire l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification comme CYP1A1 et CYP1B1 mais également le gène codant pour son régulateur négatif AHRR. AHRR va ensuite compétitionner avec AHR pour se lier à ARNT, libérant ainsi AHR qui sera dégradé par le protéasome. Schéma tiré et modifié de Larigot et al., 2018.

#### 4.4 Autres fonctions de AHR

De façon générale, les protéines de la famille bHLH-PAS sont impliquées dans plusieurs processus, dont le développement de l'organisme, le cycle circadien et l'homéostasie (Hahn, Karchner, Shapiro et Perera, 2002). D'ailleurs, les souris  $AHR^{-/-}$  présentent une variété de problèmes de développement selon le modèle de « knockout », comme une mort prématurée, des défauts de développement du cœur entraînant des cardiomyopathies, de l'hyperplasie épidermique et des problèmes hépatiques. Ces observations indiquent que la protéine est impliquée dans le

développement (Fernandez-Salguero, 1997; Lahvis et al., 2000; Schmidt, Su, Reddy, Simon et Bradfield, 1996). Chez la drosophile, AHR est essentiel au développement des pattes et des antennes, mais n'est pas associée à la régulation transcriptionnelle des CYPs (Céspedes, Galindo et Couso, 2010). Chez *C. elegans*, AHR-1, la protéine homologue de AHR, est plutôt associé au développement neuronal (Qin et Powell-Coffman, 2004; Qin, Zhai et Powell-Coffman, 2006). La fonction de détection et de réponse aux dioxines aurait donc visiblement été acquise au cours de l'évolution chez les mammifères.

De nombreux résultats montrent que AHR est impliqué dans la prolifération et dans la progression tumorale. Tout d'abord, il a été démontré que les cellules Hepa 1c1c7 AHR déficientes avaient une morphologie plus allongée et un temps de dédoublement deux fois plus long parce qu'elles passent plus de temps en G<sub>1</sub> (Ma et Whitlock, 2015). À l'inverse, la surexpression de AHR dans des cellules A549 induit une accélération du temps de dédoublement de façon proportionnelle à la quantité de AHR exprimée (Shimba, Komiyama, Moro et Tezuka, 2002). En ce sens, la surexpression de AHR chez les souris provoque une plus grande incidence de tumeurs au foie et à l'estomac (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004). À l'inverse, certaines recherches tendent à démontrer que l'activation de AHR est associée à un arrêt du cycle cellulaire. Il a été démontré que AHR interagit avec pRb, ce qui favorise l'expression du suppresseur de tumeur p27Kip1 et inhibe l'expression de la cycline E (Kolluri, Weiss, Koff et Göttlicher, 1999; Marlowe, Knudsen, Schwemberger et Puga, 2004). Il a aussi été démontré dans des cellules MCF-7 et Hepa-1 que AHR interagit avec p300 pour l'empêcher de se lier aux promoteurs de gènes E2F dépendants, ce qui cause une stagnation des cellules en phase G<sub>1</sub> (Marlowe et al., 2004). Considérant les données contradictoires sur le sujet, il n'est toujours pas clair si AHR est un inducteur ou un inhibiteur de la prolifération cellulaire. Les effets de la protéine pourraient varier énormément selon le contexte cellulaire.

D'autres études montrent une implication de AHR dans l'adhésion et dans la migration cellulaire. D'ailleurs, chez les kératinocytes HaCaT, la localisation de AHR varie selon la confluence cellulaire. On observe dans les cellules parsemées une plus grande présence de AHR dans le noyau (Ikuta, Kobayashi et Kawajiri, 2004). Par la suite, des cellules MCF-7 traitées avec du TCDD montrent une plus grande motilité et une diminution des contacts cellule-cellule par une baisse de E-cadhérine. Ces changements aussi sont corrélés avec une suractivation de la voie JNK et contrecarrés par l'action d'un inhibiteur de JNK comme le D-JNKI-1 (Diry et al., 2006).

Le rôle de AHR dans la régulation de l'inflammation a seulement été découvert au cours des dernières années. Par conséquent, il n'y a pas de données validées disponibles sur l'efficacité clinique d'agonistes ou d'antagonistes de AHR contre le psoriasis. On a démontré qu'il existerait une synergie entre l'activation des voies de signalisation AHR et NF- $\kappa$ B (Hollingshead, Beischlag, DiNatale, Ramadoss et Perdew, 2008). Notamment, AHR serait capable d'interagir avec la sous-unité p65 et d'augmenter sa liaison sur le promoteur du gène d'IL-6 (P. H. Chen, Chang, Chang et Lin, 2012). De plus, certaines molécules déjà établies comme médicaments anti-psoriasiques modulent l'activation de la voie de signalisation de AHR. Par exemple, la curcumine et la lutéoline, qui sont deux polyphénols avec des propriétés anti-inflammatoires démontrées, antagonisent l'activation de la voie AHR par le TCDD (Shehzad, Wahid et Lee, 2011; Srinivasan, Selvarajan et Dkhar, 2017; Weng et al., 2014; T. Zhang et al., 2014).

En contrepartie, certains d'agonistes de AHR ont aussi été montrés comme étant bénéfiques pour traiter l'inflammation cutanée. Par exemple, le carbazole qui est l'ingrédient actif du goudron, est un PAH. De plus, on a démontré que l'injection intrapéritonéale de FICZ améliorerait les symptômes dans le modèle murin de psoriasis induit à l'imiquimod (DiMeglio et al., 2014). Ces résultats suggèrent plutôt que l'utilisation d'antagonistes de AHR serait contreproductive pour traiter le psoriasis. En effet, l'activation de la voie AHR dans les lymphocytes T permet leur

différenciation en lymphocytes Treg plutôt qu'en lymphocytes Th17, qui, eux, contribuent au psoriasis (Nguyen et al., 2014; Stevens et al., 2009). Les études sur le rôle d'AHR dans la régulation de l'inflammation semblent aller dans des directions opposées. Sa nature pro- ou anti-inflammatoire pourrait dépendre du contexte.

## **4.5 Les ligands de AHR**

### **4.5.1 Les agonistes**

AHR fait partie de la famille des récepteurs nucléaires (Beischlag, Luis Morales, Hollingshead et Perdew, 2008; Kung, Murphy et White, 2009) et il est reconnu pour être activé par une foule de ligands. Ceux-ci sont répartis parmi deux catégories, soit les HAHs (Hydrocarbures Halogénés Aromatiques) et les PAHs (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) (N. Zhang, 2011). Les ligands de AHR ont tous en commun une structure tridimensionnelle planaire et sont hydrophobes. Les études de relation structure-activité ont permis de conclure que la poche de liaison des ligands de AHR acceptait des molécules d'une taille maximale de 14x12x5 Å (Denison et al., 2002).

La vaste majorité des ligands de haute affinité découverts à ce jour sont synthétiques et se retrouvent parmi les HAHs et les PAHs. Quelques ligands naturels de faible affinité ont cependant été identifiés dans les aliments, comme les flavonoïdes et les caroténoïdes (Denison et al., 2002). Ces molécules pourraient être responsables d'un faible niveau d'activation basal de la voie AHR. Sinon, plusieurs agonistes sont en réalité des dérivés très instables du tryptophane, transformés par l'action des UV ou de bactéries (Wei, Rannug et Rannug, 1999; Zelante et al., 2013). D'ailleurs, le FICZ, qui est un photoproduit du tryptophane, est le ligand le plus puissant découvert à ce jour (Wei, Helleberg, Rannug et Rannug, 1998). Parmi les agonistes, on retrouve également les indigoïdes, comme l'indigo et l'indirubine qu'on retrouve dans l'urine humaine (Adachi et al., 2001), le 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE), un composé isolé du tissu de poumon de porc (Song et al., 2002) et les métabolites de l'acide

arachidonique (Schaldach, Riby et Bjeldanes, 1999) et de l'hème (Sinal et Bend, 1997).

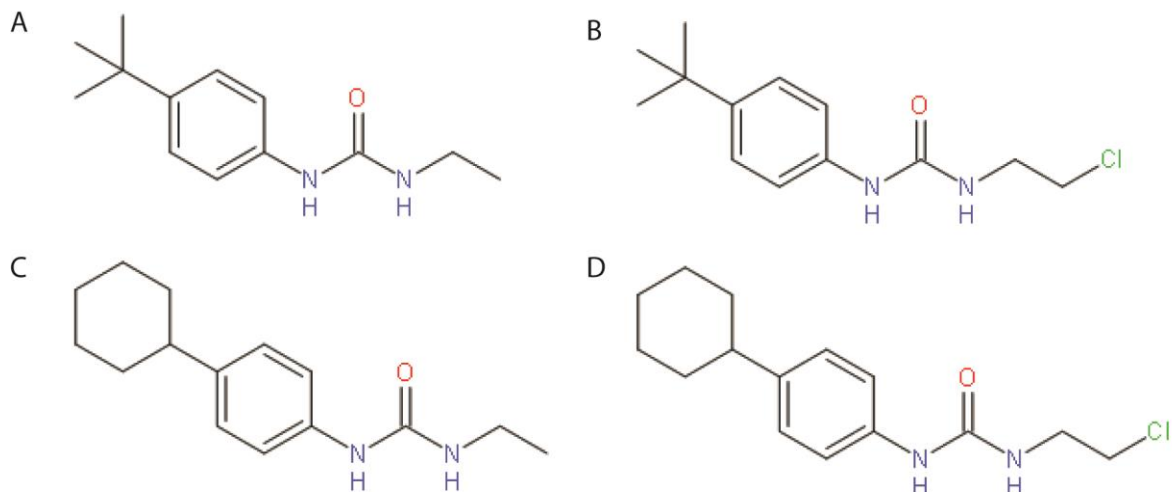
#### 4.5.2 Les antagonistes

Il existe beaucoup moins d'antagonistes d'AHR que d'agonistes. Le principal antagoniste pur (sans activité agoniste partielle) disponible commercialement et décrit comme étant sélectif est le CH223191. Cet antagoniste a été découvert en 2006 pour sa capacité à bloquer l'activation de la voie AHR et la toxicité induites par le TCDD chez les souris (S. Kim et al., 2006). Des études subséquentes ont montré que le CH223191 n'antagonisait que les HAHs et était beaucoup moins efficace pour bloquer l'activation de AHR par des PAHs (Zhao, DeGroot, Hayashi, He et Denison, 2010). Ensuite, le GNF351 est un autre antagoniste pur découvert en 2011. À l'instar du CH223191, le GNF-351 antagonise l'effet du TCDD sur l'expression des gènes *CYP1A1*, *CYP1A2* et *AHRR*. Le GNF351 antagonise également le 3-indoxyl-sulfate (Smith et al., 2011), un métabolite de l'indole qui est un PAH endogène et puissant (Schroeder et al., 2010). De plus, plusieurs molécules de la famille des flavonoïdes, comme la curcumine, le  $\alpha$ -naphthoflavone et la lutéoline sont décrites comme des antagonistes de AHR. Par contre, ils ont les défauts d'être également des agonistes partiels de AHR et d'être non sélectifs, notamment en activant le récepteur aux estrogènes (Bradshaw et Bell, 2009). Le TMF (6,2',4'-triméthoxyflavone) et le MNF (3'-méthoxy-4'-nitroflavone) sont quant à elles des flavonoïdes synthétiques décrits comme de purs antagonistes. Le TMF semble cependant être inefficace *in vivo* et le MNF est inefficace dans certains modèles cellulaires (Zhao et al., 2010).



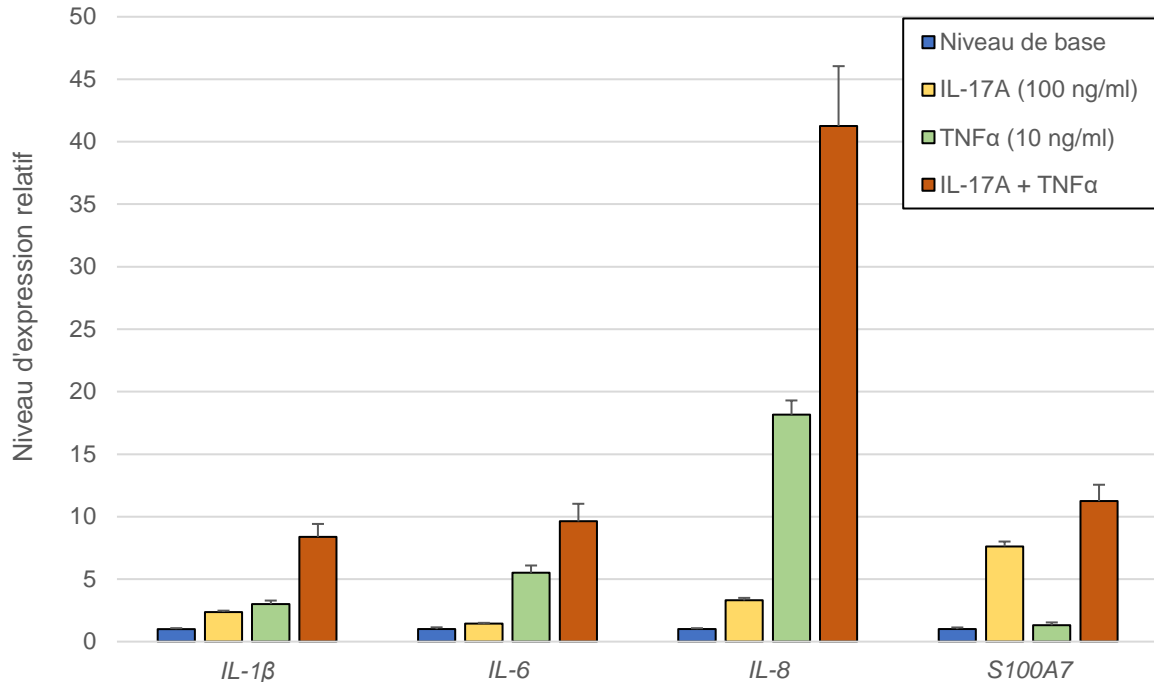
## 5 Identification des EUs comme de potentiels médicaments anti-psoriasiques

Le présent projet de recherche traite de l'étude des propriétés anti-psoriasiques d'une nouvelle famille de molécules, les PcAUs. Toutefois, la tBEU (4-*tert*-butylphényle éthyl urée) (Figure 11A), qui est la molécule de la famille des EUs à l'origine du projet de recherche, a été synthétisée dans une toute autre optique. Elle a d'abord été utilisée comme un témoin négatif de la molécule anticancéreuse tBCEU (4-*tert*-butylphényl-3-(2-chloroéthyl)urée) (Figure 11B), alors qu'on étudiait la capacité de la tBCEU à diminuer la taille de tumeurs implantées sur la membrane chorioallantoïque d'embryons de poulet en développement. De manière inattendue, la tBEU a montré un effet antiprolifératif dans ce modèle lorsqu'utilisée à plus forte concentration. Étant donné son absence de cytotoxicité, des études plus poussées ont été réalisées avec la tBEU pour voir si elle pouvait s'avérer intéressante dans d'autres modèles. Elle a été notamment testée sur un modèle de psoriasis par l'équipe de Dre Roxanne Pouliot au LOEX. Le laboratoire de Dre Pouliot a mis au point son propre modèle de peau psoriasique à partir de fibroblastes et de kératinocytes de patients. L'épiderme psoriasique reconstitué présente plusieurs caractéristiques propres à la maladie, dont une plus grande épaisseur et une perte des marqueurs de différenciation comme la loricine, la fillagrine et la kératine 10 (Jean, Garcia-Pérez et Pouliot, 2012; Jean, Lapointe, Soucy et Pouliot, 2009). La tBEU a eu un effet très intéressant dans ce modèle, en ramenant l'épaisseur de l'épiderme à celui des peaux saines. Elle démontre une efficacité comparable à celle du MTX (méthotrexate), un médicament anti-psoriasique puissant et reconnu (Voir Figures 3.2 et 3.3 du mémoire de maîtrise de Mme Isabelle Gendreau (Gendreau, 2015).



**Figure 11 : Structure des premières molécules synthétisées.** Structure de la A) tBEU, B) tBCEU, C) cHEU, D) cHCEU.

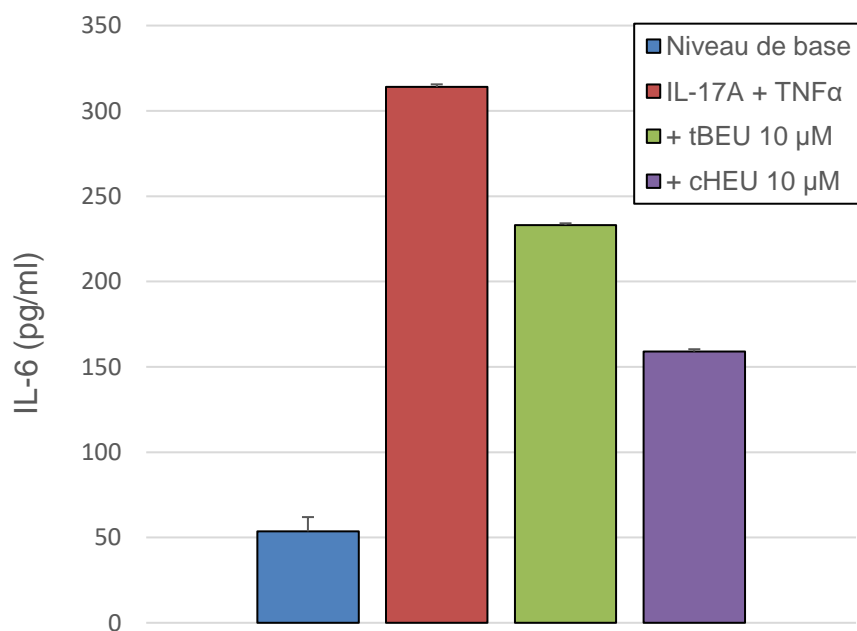
Lorsque nous avons débuté ce projet de recherche, nous avons commencé par faire la synthèse en laboratoire de la tBEU, de la cHEU (4-cyclohexylphényle éthyl urée) (Figure 11C) et de leur dérivés chlorés, la tBCEU et la cHCEU (4-cyclohexylphényl-3-(2-chloroéthyl)urée) (Figure 11D). Nous avons tenté de comprendre les effets que pouvaient avoir ces molécules en utilisant les kératinocytes HaCaT comme modèle d'étude. Nous avons mis en place un modèle de psoriasis où les HaCaT sont stimulés par une combinaison des cytokines IL-17A et TNF $\alpha$ . La combinaison de ces deux cytokines a un effet synergique sur le niveau d'expression de plusieurs gènes de l'inflammation par rapport à l'utilisation de seulement TNF $\alpha$  (Fujishima et al., 2010), ce que nous avons également observé dans le laboratoire (Figure 12). L'emploi de ces deux cytokines plutôt qu'une seule avait également comme avantage d'offrir un modèle plus près de la pathologie réelle.



**Figure 12 : Effet des cytokines IL-17A et TNF $\alpha$  sur l'expression de gènes pro-inflammatoires.** Des cellules HaCaT ont été traitées pendant 6 heures avec soit de l'IL-17A (100 ng/ml), du TNF $\alpha$  (10 ng/ml) ou une combinaison des deux cytokines. Puis, le niveau d'expression des gènes *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8* et *S100A7* a été mesuré et normalisé par rapport au niveau d'expression du gène constitutif *U6*. On observe que la combinaison de l'IL-17A et TNF $\alpha$  permet d'induire l'expression de ces différents gènes de façon plus efficace que les cytokines seules.

Nous avons observé par RT-qPCR que la tBEU et la cHEU à forte concentration (100  $\mu$ M) diminuaient systématiquement l'expression du gène pro-inflammatoire *IL-6*. L'effet de la tBEU à 10  $\mu$ M sur l'expression d'*IL-6* était moins important que celui de la cHEU, qui montrait toujours des effets très intéressants à cette dose. Cela nous a démontré que le changement d'un groupement fonctionnel influençait drastiquement l'efficacité de la molécule. Les deux molécules sont aussi capables, dans une moindre mesure, de diminuer l'expression de *TNF $\alpha$*  et *IL-8*. Malheureusement, cet effet fluctuait d'une expérience à l'autre, possiblement parce

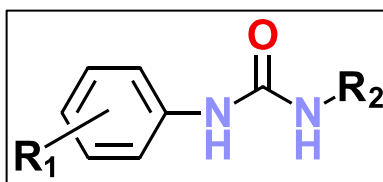
que la diminution de l'expression de ces gènes pourrait être indirectement causée par la diminution de l'expression de l'*IL-6*. Par la suite, nous avons démontré par ELISA que la tBEU et la cHEU diminuent l'expression de la protéine IL-6. Nous avons aussi confirmé que la structure avait bel et bien un effet important sur l'efficacité de la molécule puisque la cHEU était plus efficace que la tBEU à diminuer la présence de la protéine IL-6 (Figure 13).



**Figure 13 : Effet de la tBEU et de la cHEU sur la sécrétion de l'IL-6.** Des cellules HaCaT ont été prétraitées pendant 1 heure avec de la tBEU 10 μM, de la cHEU 10 μM ou avec le véhicule (DMSO). Puis, elles ont été traitées pendant 6 heures avec de l'IL-17A (100 ng/ml) et du TNFα (10 ng/ml). Le milieu de culture a été prélevé et l'IL-6 sécrété dans le milieu a été quantifié par ELISA. On observe que la cHEU diminue la sécrétion de l'IL-6 plus efficacement que la tBEU.

En parallèle, une chimiothèque d'une cinquantaine de molécules dérivées de la tBEU et de la cHEU a été synthétisée par M. Sébastien Tremblay. Dans cette

chimiothèque, les groupements fonctionnels en positions  $R_1$  et  $R_2$  ont été changés. Comme les molécules n'avaient pas exclusivement un groupement éthyle en position  $R_2$ , le nom plus général de phénylalkylurées (PcAUs), a été attribué à cette famille de composés (Figure 14). Les PcAUs ont été criblés pour leur capacité à diminuer la production de l'IL-6 afin d'identifier la molécule la plus efficace qui servirait aux études mécanistiques. Ce criblage a donné lieu à la rédaction d'un article qui sera présenté au chapitre 2.



**Figure 14 : Structure de base des PCAUs.** Les PcAUs ont toutes une structure de base similaire et diffèrent selon la nature des groupements qu'on retrouve en position  $R_1$  et  $R_2$ .

## **Problématique, hypothèse et objectifs de recherche**

- **Problématique**

Le psoriasis est une maladie auto-immune qui affecte entre 2 et 3 % de la population mondiale et dont les symptômes nuisent grandement à la qualité de vie des personnes atteintes. À ce jour, il n'existe pas encore de traitement adéquat pour contrôler les symptômes de la maladie chez tous les patients. Par conséquent, il est primordial de continuer à agrandir l'arsenal de petites molécules, abordables et non toxiques, pour contrôler les symptômes de la maladie.

Le laboratoire du Dr René C.-Gaudreault se consacre à la préparation et à l'évaluation de nouvelles molécules susceptibles de traiter diverses pathologies. L'une d'elles, la tBEU, montre un potentiel anti-psoriasique équivalent à celui du méthotrexate dans un modèle pré-clinique de peau psoriasique reconstituée. Par la suite, nous avons démontré que la tBEU et sa molécule sœur, la cHEU, inhibent l'expression et la synthèse de l'IL-6, une cytokine fortement impliquée dans le psoriasis. Nous avons également observé que la cHEU était beaucoup plus efficace que la tBEU, indiquant que la structure de la molécule influence directement son potentiel d'inhibition. Il est possible que des modifications de structure additionnelles puissent améliorer d'avantage le potentiel d'inhibition. De plus, il est primordial de comprendre comment ces molécules inhibent l'IL-6 et de démontrer leur potentiel anti-psoriasique dans différents modèles précliniques de la maladie.

- **Hypothèses**

1 – La tBEU et la cHEU sont le point de départ d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de l'IL-6 et le criblage d'une chimiothèque de dérivés, les PcAUs, nous permettrait d'identifier des molécules encore plus efficaces.

2 – Les PcAUs pourraient démontrer un potentiel anti-psoriasique intéressant pour le développement d'un nouveau traitement.

- **Objectifs**

**1 – Cribler une chimiothèque de PcAUs afin d’optimiser les propriétés anti-inflammatoires.**

Nous avons criblé la chimiothèque de PcAUs afin d’identifier celles qui inhibaient le plus efficacement la synthèse de l’IL-6. Pour ce faire, nous les avons testées sur des cellules HaCaT traitées avec la combinaison des cytokines IL-17A et TNF $\alpha$ .

*Cette étude est présentée au chapitre 1*

**2 – Élucider le mécanisme d’action moléculaire de la PcAU-1036**

Nous découvrit que la PcAU-1036 pouvait potentiellement moduler la voie de signalisation de AHR chez les cellules HaCaT. Nous avons donc étudié l’effet de la PcAU-1036 sur la localisation et l’activité transcriptionnelle de AHR. Puis, nous avons validé l’implication de ce phénomène dans l’inhibition de l’IL-6.

*Cette étude est présentée au chapitre 2*

**3 – Démontrer le potentiel anti-psoriasique des PcAUs sur deux modèles précliniques de psoriasis**

Nous avons voulu démontrer concrètement le potentiel anti-psoriasique des PcAUs. Pour ce faire, nous avons testé les effets de la PcAU-1003 et de la PcAU-1036 sur un modèle préclinique humain de peaux psoriasiques reconstituées. Enfin, nous avons testé la PcAU-1003 sur le modèle murin de psoriasis induit à l’imiquimod.

*Cette étude est présentée au chapitre 3*

# CHAPITRE 1. Synthesis and evaluation of substituted phenyl cycloalkylureas and bioisosteres as IL-6 inhibitors

Sébastien Tremblay<sup>1,4</sup>, Joël Boutin<sup>2,4</sup>, Martin Perreault<sup>2</sup>, Marie-France Côté<sup>1,2</sup>, Stéphane Gobeil<sup>2,3</sup>, René C.-Gaudreault<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *CRCHU de Québec-Université Laval, Hôpital Saint-François d'Assise, 10, rue de l'Espinay, Québec (Qc), G1L 3L5, Canada*

<sup>2</sup> *CRCHU de Québec-Université Laval, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), 2705, boulevard Laurier, Québec (Qc), G1V 4G2, Canada*

<sup>3</sup> *Département de médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université Laval, Québec (Qc), G1V 0A6, Canada*

<sup>4</sup> *These authors contributed equally*

Corresponding author: René C.-Gaudreault [rene.c-gaudreault@crsfa.ulaval.ca](mailto:rene.c-gaudreault@crsfa.ulaval.ca)



## 1.1 Avant-propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis pour publication à *Medicinal Chemistry Research* le 18 novembre 2019 et accepté le 5 mai 2020. La version insérée dans cette thèse est celle qui a été publiée.

Dans cet article, la PcAU-1036 est présentée sous le nom de **4e**, la PcATU-1052 sous le nom de **4e'** et la PcAU-1003 sous le nom de **4c**. Ces 3 molécules seront étudiées plus en détail dans les chapitres 2 et 3.

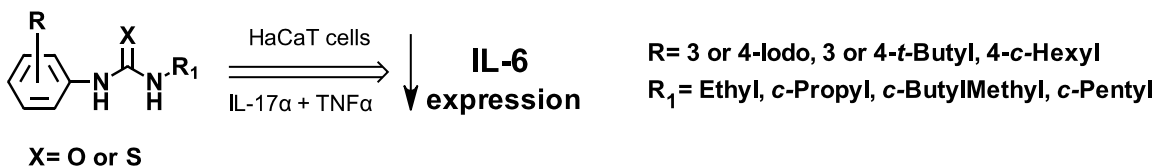
Pour commencer, j'ai synthétisé les molécules tBEU, tBCEU, cHEU et cHCEU. J'ai aussi mis au point le modèle d'inflammation sur les cellules HaCaT. J'ai ensuite réalisé les expériences préliminaires avec les quatre molécules synthétisées pour identifier qu'elle diminuaient l'expression de l'*IL-6*. Puis, j'ai mis au point le protocole d'ELISA. Sébastien Tremblay a fait la synthèse, la purification et la caractérisation de toutes les autres molécules utilisées dans l'article. J'ai fait le criblage en ELISA en collaboration avec Mme Marie-France Côté et M. Sébastien Tremblay. L'article a été rédigé par les Drs René C.-Gaudreault, Stéphane Gobeil, Martin Perreault et par M. Sébastien Tremblay, qui a plus précisément rédigé la section Matériels et méthodes. Ces travaux m'ont permis d'être co-premier auteur avec M. Sébastien Tremblay.

## 1.2 Résumé

L'inflammation est une réponse normale, importante et complexe face à une blessure, une réponse auto-immune ou un agent pathogène. Cependant, l'inflammation chronique est associée à des maladies comme l'arthrite rhumatoïde, les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète et l'obésité, et à plus de 60 % des décès dans le monde. L'interleukine-6 est une des cytokines pro-inflammatoires clé du processus inflammatoire et est par conséquent considérée comme une cible thérapeutique de choix. Nous avons préparé trois séries de nouvelles molécules désignées comme les phényl cycloalkylurées substitués (PcAUs), phényl cycloalkylthiourées (PcATUs) et phényl cycloalkylsquaramides (PcASs). Les PcAUs et les PcATUs ont été préparés par addition nucléophile de 3- ou 4-tert-butyle, de 3- ou 4-cyclohexyle et de 3- ou 4-iodoaniline à un cycloalkylisocyanate ou à un cycloalkylisothiocyanate approprié. Les PcASs ont été préparés par l'addition nucléophile des anilines mentionnées au préalable à du diéthoxysquarate. Les alkoxysquarates qui en résultent ont par la suite été mis en réaction avec les cycloalkylamines sélectionnés pour produire les PcASs voulus. L'activité antiproliférative des PcAUs, des PcATUs et des PcASs a été évaluée dans des kératinocytes et des fibroblastes humains. La plupart des composés à l'exception du 4f, du 4f', du 4f'', du 5f, du 5f', du 5f'', du 6f, du 6f' et du 6f'', qui portent un groupement 3-cyclohexyle, n'ont pas démontré d'activité antiproliférative à des concentrations <30 µM. À 10 µM, les PcAUs 4b-4e, 5b, 5e, et 6e ont inhibé l'expression d'IL-6 à plus de 70 % dans les cellules HaCaT, ce qui est équivalent ou supérieur à l'ibuprofène qui a été utilisé comme contrôle positif. Ces PcAUs ont montré une bonne stabilité métabolique en présence de microsomes de foie humains. Nos résultats suggèrent que les PcAUs sont un nouveau canevas pour le développement d'inhibiteurs d'expression de l'IL-6 potentiellement utiles pour le traitement de maladies liées à l'inflammation.

### 1.3 Abstract

Inflammation is an important, normal, and complex host defense response to injury, autoimmune responses or infectious agents. However, chronic inflammation is associated with diseases like rheumatoid arthritis, cancers, cardiovascular diseases, diabetes, and obesity, and over 60% of deaths worldwide. Interleukine-6 is one of the key proinflammatory cytokines involved in inflammation processes and therefore considered as a valuable drug target. We have prepared three series of new drugs referred to as substituted phenyl cycloalkylureas (PcAUs), phenyl cycloalkylthioureas (PcATUs) and phenyl cycloalkylsquaramides (PcASs), respectively. PcAUs and PcATUs were prepared by nucleophilic addition of 3 or 4-tert-butyl, 3- or 4-cyclohexyl and 3- or 4-iodoaniline to a suitable cycloalkylisocyanate or cycloalkylisothiocyanate. PcASs were prepared by nucleophilic addition of the aforementioned anilines to diethoxysquarate. The resulting alkoxysquarates were further reacted with selected cycloalkylamines to produce the desired PcASs. The antiproliferative activity of PcAUs, PcATUs and PcASs was evaluated in human keratinocytes and human skin fibroblasts. Most compounds at the exception of 4f, 4f', 4f'', 5f, 5f', 5f'', 6f, and 6f', 6f'' that are bearing a 3-cyclohexyl group did not exhibit significant antiproliferative activities at concentration <30  $\mu$ M. At 10  $\mu$ M, PcAUs 4b-4e, 5b, 5e, and 6e inhibited IL-6 expression by more than 70% in HaCaT cells, which is equivalent to or greater than ibuprofen used as a positive control. These PcAUs showed a good metabolic stability in presence of human liver microsomes. Our results are suggesting PcAUs as a new molecular template for the development of potentially useful IL-6 expression inhibitors for the treatment of inflammation-related diseases.



## 1.4 Introduction

Inflammation is a crucial reaction mechanism to injury, tissue ischemia, autoimmune responses or infectious agents. However, sustained inflammation in turn is associated with chronic (noncommunicable) (Unwin and Alberti, 2006) diseases such as rheumatoid arthritis, cancers, cardiovascular diseases, diabetes, and obesity (Laveti et al., 2013; Franceschi and Campisi, 2014). These diseases are a major impediment to the patients' welfare and to their life expectancy. Statistics from the World Health Organization show that these chronic diseases are the most significant cause of human death (63%) (Riley et al., 2016). About half (50.9%) of American adults have at least one chronic condition (Bauer et al., 2014) and, in itself, represents a huge economic burden worldwide (Vogeli et al., 2007).

Inflammatory processes are very complex, involving a variety of signaling networks and the expression of several proinflammatory cytokines, notably interleukine-6 (IL-6). IL-6 is a pleiotropic and multifunctional cytokine playing various biological roles in the immune, nervous, and endocrine systems (Kamimura et al., 2014; Hunter and Jones, 2015). It is an important regulator of both acute and chronic inflammations and the blockage of IL-6 signaling pathways has already been clinically proven successful in humans (Kim et al., 2015). Numerous anti-inflammatory drugs based notably on the inhibition of the COX-1 and 2 (e.g., aspirin and ibuprofen), the inhibition of leukotrienes production (e.g., meclofenamate and montelukast) or the inhibition of phospholipase A2 (e.g., dexamethasone) are widely used in clinics (Rao and Knaus, 2008). Despite the effectiveness of the modern anti-inflammatory armamentarium, the longterm use of these medicines is associated with serious undesirable side effects (Mendes et al., 2013; Sehgal et al., 2015; Sousa and Allez, 2015; Singh et al., 2017; Succaria and Bhawan 2017; Terada et al., 2017). For example, adverse effects of most NSAIDs include gastrointestinal tract (McCarthy, 1999; Jones et al., 2008) and kidney toxicity (Zhang et al., 2017) and allergies (Goodwin, 1984). Several COX-2 inhibitors and NSAIDs were withdrawn from the market due to their hepatotoxicity and cardiotoxicity (Bannwarth,

2005; Goldkind and Laine, 2006; Brophy, 2007; Singh et al., 2014) and glucocorticoids lead notably to osteoporosis, diabetes, and weight gain (Schacke et al., 2002; Huscher et al., 2009). Despite the effectiveness of the biologics for the treatment of immune conditions, these are associated with serious adverse events (Mendes et al., 2013; Sehgal et al., 2015; Sousa and Allez, 2015; Singh et al., 2017; Succaria and Bhawan, 2017; Terada et al., 2017). Consequently, there are significant unmet medical needs for novel anti-inflammatory drugs exhibiting high efficacy and low adverse effects.

While characterizing the pharmacological properties of phenyl-3-(2-chloroethyl)ureas (CEUs) (Bechard et al., 1994; Bouchon et al., 2005, 2007; Fortin et al., 2008, 2010), pilot experiments using human keratinocytes established that molecules such as 1-(2-chloroethyl)-3-(p-cyclohexylphenyl) urea (cHCEU; Fig. 1.1) significantly inhibit IL-6 expression. The inhibition of the production of proinflammatory cytokines such as IL-6 is considered as a potential therapeutic approach against diseases associated with chronic inflammatory responses (Nishimoto and Kishimoto, 2004; Zinzalla et al., 2010; Jain et al., 2014; Tanaka et al., 2014; Jones and Jenkins, 2018). Further pilot experiments using dechlorinated CEUs deriving from cHCEU and its derivatives, which lack anticancer activity, evidenced that these compounds also inhibit significantly IL-6 production (e.g., compound 3a in Fig. 1.2 and Table 1.2).

We report herein the synthesis of novel phenyl cycloalkyureas (PcAUs; 3a-6f) and their cycloalkylthiourea (PcATUs; 3a'-6f') and phenyl cycloalkylsquaramide (PcASs; 3a''-6f'') bioisosteric counterparts. The latter were readily prepared using procedures depicted in Scheme 1.1. The antiproliferative activity of PcAUs, PcATUs and PcASs was evaluated on human HaCaT keratinocytes and human HDFn skin fibroblasts (Table 1.1). The effect of selected PcAUs and PcATUs on IL-6 production was assessed in the HaCaT human keratinocyte cell line stimulated with TNF $\alpha$  and IL-17A (Fig. 1.2). Finally, the metabolic stability of PcAUs exhibiting potent IL-6 inhibition was evaluated using human hepatic microsomes (Table 1.2).

## 1.5 Design and chemistry

In these experiments, the phenyl moiety of PcAUs, PcATUs and PcASs was substituted in positions 3 or 4 by either a *tert*-butyl, a *cyclohexyl* or an iodo group, substituents extensively used and studied during the development of potent anticancer CEUs [32]. On one hand, PcAUs and PcATUs were readily prepared in low to excellent yields by nucleophilic addition of the suitable substituted aniline to the appropriate cycloalkylisocyanate to give compounds **3a-6f**, or cycloalkylisothiocyanates to give compounds **4a'-6f'** (Scheme 1.1). On the other hand, PcASs were prepared by nucleophilic addition of 1 equivalent of the suitable substituted aniline to 1.09 equivalent of diethoxysquarate (3,4-diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dione). The resulting alkoxy-squarate was further reacted with a selected cycloalkylamine to produce compounds **4a''-6f''** in good to excellent yields (Scheme 1.1).

All compounds were characterized by their nuclear magnetic resonance spectroscopy (proton and carbon NMR) and by high-resolution mass analysis. The purity of the final compounds was confirmed by HPLC and was >95%.

## 1.6 Results and discussion

### 1.6.1 Chemistry

In these experiments, the phenyl moiety of PcAUs, PcATUs and PcASs was substituted in positions 3 or 4 by either a tertbutyl, a cyclohexyl or an iodo group, substituents extensively used and studied during the development of potent anticancer CEUs (Bechard et al., 1994; Bouchon et al., 2005; Bouchon et al., 2007; Fortin et al., 2008; Fortin et al., 2010). On one hand, PcAUs and PcATUs were readily prepared in low to excellent yields by nucleophilic addition of the suitable substituted aniline to the appropriate cycloalkylisocyanate to give compounds 3a-6f, or cycloalkylisothiocyanates to give compounds 4a'-6f' (Scheme 1.1). On the other hand, PcASs were prepared by nucleophilic addition of 1 equivalent of the suitable substituted aniline to 1.09 equivalent of diethoxysquarate (3,4-diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dione). The resulting alkoxysquarate was further reacted with a selected cycloalkylamine to produce compounds 4a''-6f'' in good to excellent yields (Scheme 1.1).

All compounds were characterized by their nuclear magnetic resonance spectroscopy (proton and carbon-13 NMR) and by high-resolution mass analysis. The purity of the final compounds was confirmed by HPLC and was >95%.

### 1.6.2 Evaluation of the antiproliferative activity

The antiproliferative activity of PcAUs, PcATUs and PcASs was evaluated using the HaCaT and HDFn cell lines based on a method developed by the NCI/NIH Developmental Therapeutics Program (Shoemaker 2006). The results are summarized in Table 1.1 and expressed as the drug concentration required to inhibit cell growth by 50% (GI50). Most compounds exhibited a low antiproliferative activity (>30  $\mu$ M) on the two cell lines tested. In general, molecules substituted at position 3 instead of position 4 with the exception of the tert-butylated 4a and 4b and the iodinated 4c and 4d displayed antiproliferative activity at concentrations lower than

30  $\mu$ M. In addition, PcAUs with the exception of 4e and 4f bearing a cyclopropyl moiety appeared to exhibit significantly less antiproliferative activity compared to their cyclobutylmethyl and cyclopentyl homologues, with the exception of 5e, 6a-c and 6e. Globally, the corresponding PcATUs and PcASs showed either similar or higher antiproliferative activity with the exception of 4b', 4b'', 4e', 4e'', 5a' and 5a'' when compared to their PcAUs equivalents. Bearing in mind that we were screening our chemolibraries for prototypical nontoxic IL-6 inhibitors, compounds 4f, 5a, 5c, 5d, 5f, 6d, 6f, 4f', 5b'-f', 6a'-f', 4a'', 4d'', 4f'', 5c'', 5d'', 5f'', 6b''-d'', 6f'', all exhibiting a GI50 < 30  $\mu$ M, were not further tested.

### 1.6.3 Evaluation of the inhibition of IL-6 production

IL-6 is a major autocrine and paracrine extracellular cytokine implicated in inflammation that initiates its biological effects by binding to a receptor (Rose-John 2012). The effect of the selected PcAUs and PcATUs on the extracellular levels of IL-6 was assessed using human keratinocytes HaCaT cells stimulated by the addition of the proinflammatory cytokines IL-17A and TNF- $\alpha$  to their culture medium. IL-6 protein levels in HaCaT cells culture medium were measured by ELISA. As depicted in Fig. 1.2, the IL-17A and TNF- $\alpha$  treatment increased the level of IL-6 protein in the HaCaT culture medium in accord with the literature (Hennes 2004; Chiricozzi 2011). In our hand, ibuprofen, a known IL-6 inhibitor (Hirotsugu 1991; Jiang 1998), reduced IL-6 protein levels by 50%. Several PcAUs significantly lowered the extracellular level of IL-6 protein (Fig. 1.2). However, compounds 3a, 4b, 4c, 4e, 5b and 6e reduced the cytokine level by more than 70%, even 95% for compound 4e, which is higher than the inhibitory effect observed with ibuprofen at the same 10  $\mu$ M concentration. The corresponding PcAUTs were systematically less effective than PcAUs at reducing the level of IL-6 protein in the culture medium. All PcASs tested were inactive and consequently not further tested. These results point out the importance of the oxygen atom on the urea moiety of PcAUs for the activity of the compounds on IL-6 production. Replacement of that oxygen atom by its



bioisosteric sulfur atom or as a squaramide lead either to a significant decrease (PcAUTs) or to the abrogation (PcASs) of IL-6 inhibition.

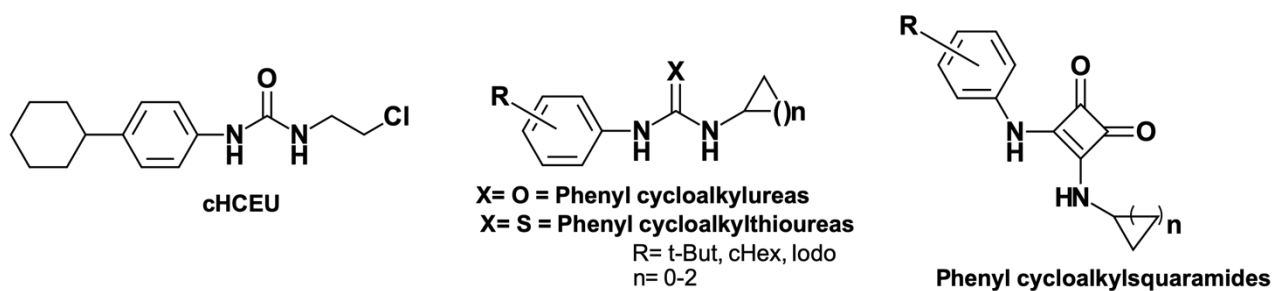
Next, we performed an experiment to determine if 4e, one of our most promising PcAUs, decreased IL-6 production by affecting its mRNA level. We thus assessed the level of IL-6 mRNA by real-time quantitative PCR in HaCaT cells stimulated with IL-17A and TNF- $\alpha$  and treated or not with compound 4e at 10  $\mu$ M for 3 h. As shown in Fig. 1.3, compound 4e efficiently decreased IL-6 mRNA suggesting that PcAUs decrease IL-6 production, by reducing the level of its transcript thus its expression. However, it remains unclear how PcAUs lower IL-6 mRNA, but these molecules could directly or indirectly affect its transcription or the stability of its mRNA.

#### **1.6.4 Metabolic stability**

Lastly, to determine the potential of PcAUs as lead compounds, the metabolic stability of PcAUs 4a-e, 5b, 5e, 6a-c and 6e was tested using human liver microsomes that contain most Phase I and II detoxification enzymes (Iyer and Sinz 1999). As depicted in Table 1.2, PcAUs 4a-4d, 4e and 5e display a microsomal stability at least equivalent to ibuprofen used as a control. These results suggest that PcAUs 4a-e, 5e, 6a, 6c and 6e are not prone to quick and extensive metabolic deactivation and that they could be useful as lead compounds to conduct experiments on animal models of inflammatory diseases.

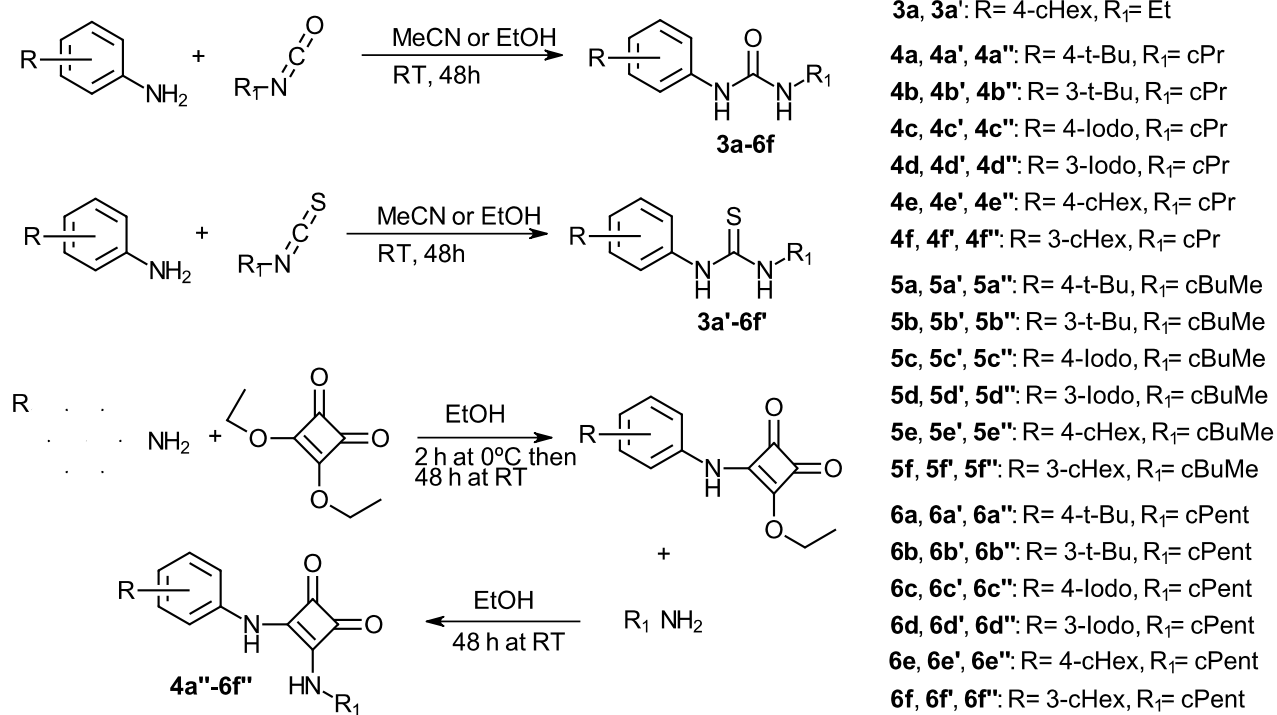
## 1.7 Figures

Figure 1.1 (drawn using ChemDoodle v. 9.1)



**Fig. 1.1** Structure of cHCEU and the general structures of phenyl cycloalkylureas, phenyl cycloalkylthioureas and phenyl cycloalkylsquaramides prepared.

**Scheme 1.1** (drawn using ChemDoodle v. 9.1)



**Scheme 1.1** Synthesis of **3a**, **3a'** and **3a''**, and substituted phenyl cycloalkylureas **4a-f**, **5a-f** and **6a-f**, and their bioisosteric phenyl cycloalkylthioureas **4a'-f'**, **5a'-f'** and **6a'-f'** and phenyl cycloalkylsquaramides **4a''-f''**, **5a''-f''** and **6a''-f''** counterparts.

**Table 1.1:** Antiproliferative activity of compound **3a** and phenyl cycloalkylureas **4a-f**, **5a-f**, **6a-f**, phenyl cycloalkylthioureas **3a'**, **4a'-f'**, **5a'-f'**, **6a'-f'**, phenylcycloalkylsquaramides **3a''**, **4a''-f''**, **5a''-f''** and **6a''-f''** on HaCaT and HDFn cells.

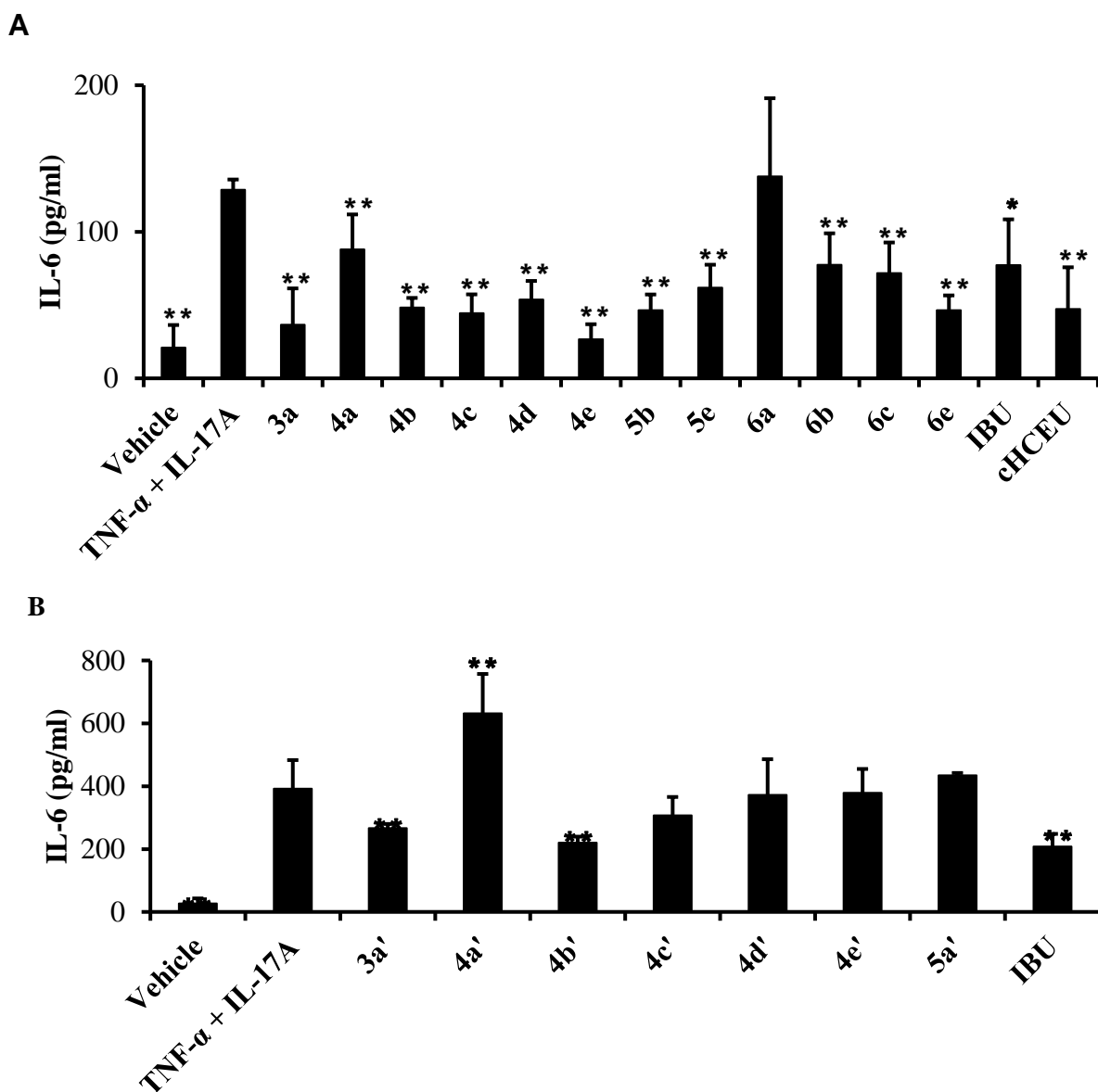
Compd	Antiproliferative activity (GI <sub>50</sub> , μM) <sup>b</sup>		Compd	Antiproliferative activity (GI <sub>50</sub> , μM) <sup>b</sup>		Compd	Antiproliferative activity (GI <sub>50</sub> , μM) <sup>b</sup>	
	HaCaT	HDFn		HaCaT	HDFn		HaCaT	HDFn
<b>3a<sup>a</sup></b>	>100	60	<b>3a'</b>	>100	94	<b>3a''</b>	ND <sup>c</sup>	ND
<b>4a</b>	>100	55	<b>4a'</b>	94.5	60	<b>4a''</b>	48	13
<b>4b</b>	>100	95	<b>4b'</b>	>100	>100	<b>4b''</b>	>100	>100
<b>4c</b>	>100	>100	<b>4c'</b>	>100	>100	<b>4c''</b>	81	57
<b>4d</b>	>100	79	<b>4d'</b>	>100	>100	<b>4d''</b>	38	20
<b>4e</b>	74	40	<b>4e'</b>	>100	84	<b>4e''</b>	>100	>100
<b>4f</b>	37	25	<b>4f'</b>	15.9	14.7	<b>4f''</b>	11	4
<b>5a</b>	35	8	<b>5a'</b>	>100	>100	<b>5a''</b>	>100	>100
<b>5b</b>	60	74	<b>5b'</b>	34	18	<b>5b''</b>	>100	>100
<b>5c</b>	39	21	<b>5c'</b>	48	24	<b>5c''</b>	56	4
<b>5d</b>	31	15	<b>5d'</b>	35	19	<b>5d''</b>	11	4
<b>5e</b>	>100	>100	<b>5e'</b>	32	16	<b>5e''</b>	>100	>100
<b>5f</b>	8	12	<b>5f'</b>	17	4.9	<b>5f''</b>	6	2
<b>6a</b>	>100	>100	<b>6a'</b>	40	23	<b>6a''</b>	>100	>100
<b>6b</b>	>100	>100	<b>6b'</b>	32	16	<b>6b''</b>	11	7
<b>6c</b>	>100	84	<b>6c'</b>	39	19	<b>6c''</b>	6	3
<b>6d</b>	49	23	<b>6d'</b>	33	16	<b>6d''</b>	12	5
<b>6e</b>	82	56	<b>6e'</b>	35	15	<b>6e''</b>	>100	>100
<b>6f</b>	12	8	<b>6f'</b>	6.2	3.8	<b>6f''</b>	6	2

<sup>a</sup>The synthesis of **3a** has already been reported (Fortin et al., 2007) and was used for additional comparison

<sup>b</sup>GI<sub>50</sub> = drug concentration required to inhibit cell growth by 50%

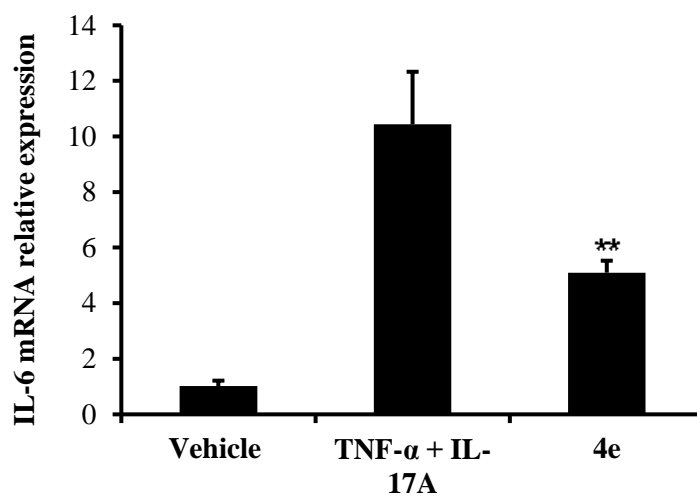
<sup>c</sup>ND not determined

Figure 1.2 (Microsoft Excel, Tiff)



**Fig. 1.2 A)** Inhibition of IL-6 production following treatments with compound **3a**, cHCEU, PcAUs **3a**, **4a-e**, **5b**, **5e**, **6a-c**, **6e** and ibuprofen. Compounds **3a** and cHCEU were used for additional comparisons. **B)** Inhibition of IL-6 production following treatments with compound **3a'**, PcAUTs **4a'-4e'**, **5a'** and ibuprofen. Both sets of experiments were conducted in HaCaT cells stimulated with TNF $\alpha$  and IL-17A. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of 3 independent experiments conducted in duplicate. Duncan-Kramer multiple range test against TNF- $\alpha$  + IL-17A; \*: P < 0.05; \*\*: P < 0.01.

**Figure 1.3**



**Fig. 1.3** Relative levels of *IL-6* mRNA in IL-17A and TNF- $\alpha$ -stimulated HaCaT cells treated or not with compound **4e** (10  $\mu$ M, 3h). Results represent the average  $\pm$  standard deviation of two independent experiments conducted in triplicate. T-test: \*: P < 0.05; \*\*: P < 0.01.

## 1.8 Conclusion

In this study, we prepared several novel phenyl cycloalkyureas and their cycloalkylthiourea and phenyl cycloalkylsquaramide bioisosteric counterparts. These molecules can be readily prepared and purified in good to excellent yields using very few chemical steps. Most PcAUs, and several PcATUs are nontoxic and can efficiently inhibit IL-6 expression. Finally, considering the low antiproliferative activity of PcAUs 4b, 4c, 4e and 6e, their potent effect on IL-6 production and their microsomal stability, they were selected for further development in our laboratory.

## 1.9 Materials and methods

### 1.9.1 Materials and instrumentation

All chemicals were supplied by Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario, Canada), VWR International (Mont-Royal, Québec, Canada), Enamine LLC (Princeton, New Jersey, USA) or Combi-Blocks (San Diego, California, USA) and used as received unless specified otherwise. Liquid flash chromatography was performed on silica gel F60, 60 A, 40–63  $\mu\text{m}$  supplied by Silicycle (Quebec City, Quebec, Canada) using a FPX flash purification system (Biotage, Charlottesville, VA, USA) and using solvent mixtures expressed as volume/volume ratios. The progress of the chemical reactions was monitored by TLC using precoated silica gel 60 F254 TLC plates (VWR International, Mont-Royal, Québec, Canada). The spots on the chromatograms were visualized under UV light at 254 and/or 265 nm.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker AM-300 spectrometer (Bruker, Germany). Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in parts per million (ppm). Melting points were determined using a model 1A6304 Electrothermal or an OptiMelt MPA100 melting point apparatus. HPLC-MS analyses for compounds 3a-3b, 4a-4e, 5a-5e and 6a-6e and MS analyses for compounds 4a' to 6f' were performed using a Prominence LCMS-2020 system with binary solvent equipped with a UV/vis photodiode array and an APCI probe (Shimadzu, Columbia, MD, USA). Compounds were eluted within 15 min on an Alltech Alltima C18 reversed-phase column (5 mm, 250 mm 4.6 mm) equipped with an Alltech Alltima C18 precolumn (5 mm, 7.5 mm 4.6 mm) with a MeOH/H<sub>2</sub>O linear gradient of 60:40 at 1.0 mL/min. HPLC analyses for compounds 4f, 5f, 6f and 4a'-6f' were performed using a Waters Acquity Arc HPLC system with quaternary solvent equipped with a 2998 photodiode array detector and a sample manager flow through needle-R (Waters, Milford, MA, USA). HPLC analyses for compound 4f and HRMS of compounds 4c and 4e were performed using an Agilent Time-of-Flight system model 6210 (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) either with an ESI (ElectroSpray Ionization) or an APPI source (Atmospheric Pressure Photo Ionization) according to the type of molecules to be analyzed. An Agilent 1200 model pump and autoinjector



were also used to automatically infuse between 5 and 50  $\mu\text{L}$  of analyte previously dissolved in the spectrometer source. The eluent used for infusion is a mixture of 25% water in methanol containing 5 mM ammonium formate to promote positive ion formation. When the APPI source was used, a few drops of dopants made of 5% anisole in toluene was added to the samples. Prior to a series of analyses, the Time-of-Flight mass spectrometer was calibrated in positive or negative mode with the manufacturer's standard for the mass range of interest. The purity of the final compounds was >95%.

### **1.9.2 General synthesis of phenyl cycloalkylureas and phenyl cycloalkylthioureas**

Method A: synthesis of compounds 3a-b, 4a, 4b, 5a-e, 6a-b and 6d-e, and 4b', 4d', 5b', 5d'-e' and 6a'

The relevant aniline (0.35 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in acetonitrile (6 mL) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.2 eq.) was added to the solution. The suitable isocyanate or isothiocyanate (1.2 eq.) was then added and the reaction mixture stirred for 48 h under reflux. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography on silica gel.

Method B: synthesis of 4c-e, 6c, 4f, 5f, 6f, and 4a', 4c', 4e', 5a', 5c', 6b'-e', 4f', 5f' and 6f'

The appropriate aniline (0.35 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in ethanol (2 mL). The suitable isocyanate or isothiocyanate (1.2 eq.) was then added to the solution and the reaction mixture stirred for 48 h at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography on silica gel.

General synthesis of squaramides 4a''-4f'', 5a''-5f'' and 6a''-6f''

To a solution of the desired aniline (0.35 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (2.5 mL) at 0  $^\circ\text{C}$  was added dropwise 3,4-diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dione known also as

diethoxysquarate (1.09 eq.). The solution was first stirred at 0 °C for 2 h, then at room temperature for 48 h and finally cooled down again to 0 °C. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography on silica gel using hexanes/ethyl acetate (80/20) yielding the desired amino alkoxyquarate. The amino alkoxyquarate (0.075 mmol, 1 eq.) was subsequently dissolved in EtOH (2 mL), followed by the addition of a suitable cycloalkylamine (1.4 eq.). The resulting mixture was stirred for 48 h at room temperature and then filtered. The solid residue was washed with a mixture of cold EtOH/MeOH (1/1) to afford the desired squaramide without further purification.

Spectral data of synthetic phenyl cycloalkylureas 3a-b, 4a-f, 5a-f and 6a-f, phenyl cycloalkylthioureas 3a'-b', 4a'-f', 5a'-f' and 6a'-f', and squaramides 3a''-b'', 4a''-f'', 5a''-f'' and 6a''-f''

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopropylurea (4a)** Yield: 28%; Light yellow solid; mp: 138–139 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.29–7.27 (m, 4 H, Ar), 7.21 (s, 1 H, NH), 5.42 (s, 1 H, NH), 2.62–2.52 (m, 1 H, CH), 1.28 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>), 0.76 (d, 2 H, J = 5.5 Hz, 2x CH), 0.57 (s, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 157.4, 146.4, 135.9, 125.9, 120.2, 34.3, 31.4, 22.6, 7.4. MS (ES<sup>+</sup>) found 233.20; C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 233.17.

**1-(3-Tert-butylphenyl)-3-cyclopropylurea (4b)** Yield: 34%; White solid; mp: 169–171 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.36–7.34 (m, 1 H, Ar), 7.19–7.16 (m, 2 H, Ar), 7.07–7.04 (m, 1 H, Ar), 2.58–2.52 (m, 1 H, CH), 1.27 (s, 9H, 3x CH<sub>3</sub>) 0.78–0.72 (m, 2 H, 2x CH), 0.58–0.54 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 157.3, 152.2, 138.1, 128.6, 120.5, 117.4, 34.7, 31.2, 22.4, 7.2. MS (ES<sup>+</sup>) found 233.10; C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 233.17.

**1-Cyclopropyl-3-(4-iodophenyl)urea (4c)** Yield: 20%; White solid; mp: 208–209 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.42 (d, 2 H, J = 8.3 Hz, Ar), 7.06 (d, 2 H, J =

8.3 Hz, Ar), 2.44 (apparent nonuplet, 1 H, CH), 0.65-0.58 (m, 2 H, 2x CH), 0.43-0.37 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 157.2, 138.9, 137.5, 120.9, 84.9, 22.1, 6.7. MS (ES<sup>+</sup>) found 303.00; C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 303.00.

**1-Cyclopropyl-3-(3-iodophenyl)urea (4d)** Yield: 27%; White solid; mp: 153–154 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.74-7.72 (m, 1 H, Ar), 7.30–7.25 (m, 2 H, Ar), 6.92 (t, 1 H, J = 8.0 Hz, Ar), 2.54–2.47 (m, 1 H, CH), 0.70 (d, 2 H, J = 6.0 Hz, 2x CH), 0.51-0.46 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 157.0, 140.1, 131.6, 130.3, 127.8, 118.4, 94.1, 22.3, 7.0. MS (ES<sup>+</sup>) found 303.00; C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 303.00.

**1-(4-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopropylurea (4e)** Yield: 66%; White solid; mp: 173–176 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.21 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.07 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 2.51 (apparent sept, 1 H, CH), 2.44–2.32 (m, 1 H, CH), 1.79–1.19 (m, 10 H, 5x CH<sub>2</sub>), 0.71 (q, 2 H, J = 6.8 Hz, 2x CH), 0.54-0.49 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 157.5, 143.4, 136.1, 127.3, 120.3, 43.9, 34.5, 26.9, 26.1, 22.4, 7.1. MS (ES<sup>+</sup>) found 259.20; C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 259.18.

**1-(3-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopropylurea (4f)** Yield: 100%; White solid; mp: 138–144 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.29 (s, 1H, NH), 7.22-7.23 (m, 3H, Ar), 6.93–6.95 (m, 1H, Ar), 5.34 (s, 1H, NH), 2.62 (sept, 1H, J=3.3Hz, CH), 2.46–2.52 (m, 1H, CH), 1.75–1.87 (m, 5H, 5x CH), 1.31–1.46 (m, 5 H, 5x CH), 0.82 (q, 2 H, J=5.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.63 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 156.9, 149.2, 138.5, 128.8, 121.9, 118.7, 117.6, 44.6, 34.3, 26.9, 26.1, 22.6, 7.4. MS (ES<sup>+</sup>) found 259.18; C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>++</sup>H) calculated 259.18.

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-(cyclobutylmethyl)urea (5a)** Yield: 19%; White solid; mp: 179-184 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.30 (d, 2 H, J = 8.7 Hz, Ar), 7.18 (d, 2 H, J = 8.7 Hz, Ar), 3.23 (d, 2 H, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.44 (sept, 1 H, J = 7.5 Hz, CH), 2.06-1.94 (m, 2 H, 2x CH), 1.91-1.78 (m, 2 H, 2x CH), 1.71–1.60 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>) 1.30–1.27 (m, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 156.8, 147.1, 135.5, 126.1, 121.4, 45.6,

35.3, 34.3, 31.3, 25.6, 18.2. MS (ES+) found 261.20; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 261.20.

**1-(3-(Tert-butyl)phenyl)-3-(cyclobutylmethyl)urea (5b)** Yield: 55%; White solid; mp: 126–127 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.32–7.30 (m, 1 H, Ar), 7.18–7.00 (m, 3 H, Ar), 3.18 (d, 2 H, J=7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.39 (sept, 1 H, J= 7.5 Hz, CH), 2.02–1.92 (m, 2 H, 2x CH), 1.88–1.76 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.68–1.59 (m, 2 H, 2x CH), 1.24 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 156.9, 152.3, 138.6, 128.6, 120.3, 117.5, 117.5, 45.2, 35.3, 34.6, 31.2, 25.5, 18.2. MS (ES+) found 261.25; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>++</sup>H) calculated 261.20.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(4-iodophenyl)urea (5c)** Yield: 10%; White solid; mp: 159–160 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.35 (d, 2 H, J = 8.9 Hz, Ar), 7.07 (d, 2 H, J = 8.9 Hz, Ar), 3.08 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.33 (sept, 1H, J = 7.5 Hz, CH), 1.85–1.93 (m, 2 H, 2x CH), 1.77–1.69 (m, 2 H, 2x CH), 1.61–1.53 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 155.9, 140.1, 137.4, 120.2, 83.6, 44.8, 35.4, 25.5, 18.2. MS (ES+) found 331.00; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 331.03.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(3-iodophenyl)urea (5d)** Yield: 45%; White solid; mp: 138–140 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.66–7.63 (m, 1 H, Ar), 7.18–7.11 (m, 2 H, Ar), 6.85–6.77 (m, 1 H, Ar), 3.09–3.04 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.38–2.26 (m, 1 H, CH), 1.96–1.85 (m, 2 H, 2x CH), 1.79–1.68 (m, 2 H, 2x CH), 1.61–1.51 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 156.2, 140.9, 130.9, 130.2, 127.2, 117.7, 94.0, 44.8, 35.2, 25.3, 18.1. MS (ES+) found 331.00; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup> + H) calculated 331.03.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(4-cyclohexylphenyl)urea (5e)** Yield: 32%; White solid; mp: 172–173 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.17(d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.08 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, Ar), 3.20–3.17 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.46–2.37 (m, 2 H, 2x CH), 2.03–1.94 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.88–1.20 (m, 14 H, 7x CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD):

$\delta$  156.9, 143.2, 136.5, 127.3, 120.6, 45.1, 43.9, 35.4, 34.5, 26.9, 26.1, 25.5, 18.2. MS (ES+) found 287.15; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 287.21.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(3-cyclohexylphenyl)urea (5 f)** Yield: 89%; White solid; mp: 115–120 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.30 (s, 1 H, NH), 7.13–7.18 (m, 2 H, Ar), 7.06–7.09 (m, 1 H, Ar), 6.87 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, Ar), 5.49 (s, 1 H, NH), 3.21 (d, 2 H, J = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.40 (sept, 2 H, J = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.93–2.01 (m, 2 H, 2x CH), 1.60–1.86 (m, 9 H, 9x CH), 1.25–1.38 (m, 5 H, 5x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  156.7, 149.3, 138.9, 128.9, 121.9, 119.2, 118.0, 45.4, 44.5, 35.4, 34.3, 26.8, 26.1, 25.5, 18.3. MS (ES+) found 287.35; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 287.21.

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopentylurea (6a)** Yield: 15%; White solid; mp: 219–221 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.13–7.01 (m, 4 H, Ar), 3.93–3.85 (m, 1 H, CH), 1.80–1.70 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.53–1.34 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.25–1.15 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>) 1.11 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  155.8, 144.2, 137.4, 125.4, 118.2, 51.3, 33.9, 33.3, 31.3, 23.4. MS (ES+) found 261.25; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 261.20.

**1-(3-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopentylurea (6b)** Yield: 57%; White solid; mp: 152–154 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.33–7.31 (m, 1 H, Ar), 7.16–7.13 (m, 1 H, Ar), 7.09–7.01 (m, 2 H, Ar), 4.05 (quint, 1 H, J = 6.8 Hz, CH), 1.96–1.85 (m, 2 H, 2x CH), 1.63–1.48 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.38–1.29 (m, 2 H, 2x CH), 1.25 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  156.3, 152.3, 138.6, 128.6, 120.2, 117.4, 117.3, 51.7, 34.6, 33.3, 31.2, 23.5. MS (ES+) found 261.25; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 261.20.

**1-Cyclopentyl-3-(4-iodophenyl)urea (6c)** Yield: 13%; White solid; mp: 188–191 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.31 (d, 2 H, J = 8.7 Hz, Ar), 7.03 (d, 2 H, J = 8.8 Hz, Ar), 3.93–3.87 (m, 1 H, CH), 1.81–1.73 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.53–1.39 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.27–1.19 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  155.4,

140.1, 137.3, 120.1, 83.4, 51.3, 33.3, 23.5. MS (ES+) found 331.00; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 331.03.

**1-Cyclopentyl-3-(3-iodophenyl)urea (6d)** Yield: 16%; White solid; mp: 142–143 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.71–7.69 (m, 1 H, Ar), 7.28–7.21 (m, 2 H, Ar), 6.90 (t, 1 H, J = 8.0 Hz, Ar), 3.99 (apparent quint, 1 H, J = 6.5 Hz, CH), 1.93–1.86 (m, 2 H, 2x CH), 1.61–1.52 (m, 4 H, 4x CH) 1.37–1.30 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 155.7, 140.8, 131.1, 130.3, 127.4, 117.9, 94.1, 51.5, 33.2, 23.5. MS (ES+) found 331.00; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 331.03.

**1-(4-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopentylurea (6e)** Yield: 30%; White solid; mp: 197–199 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 7.15 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.05 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 4.00 (quint, 1 H, J = 6.6 Hz, CH), 2.43–2.33 (m, 1 H, CH), 1.92–1.86 (m, 2 H, 2x CH), 1.76–1.54 (m, 9H, 2x CH+ 7x CH), 1.35–1.28 (m, 7 H, 7x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD): δ 156.4, 143.1, 136.6, 127.3, 120.3, 51.7, 43.9, 34.5, 33.3, 26.9, 26.1, 23.5. MS (ES +) found 287.20; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O (M+ +H) calculated 287.21.

**1-(3-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopentylurea (6 f)** Yield: 54%; White solid; mp: 132–137 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.15–7.19 (m, 2 H, Ar), 7.07–7.10 (m, 1 H, Ar), 7.03 (s, 1 H, NH), 6.89 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, Ar), 5.00 (s, 1 H, NH), 3.65 (apparent quint, 1 H, J = 5.4 Hz, CH), 2.43 (s, 1 H, CH), 1.69–1.81 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.47–1.56 (m, 2 H, 2x CH), 1.22–1.38 (m, 6 H, 6x CH), 0.89 (t, 6 H, J = 7.2 Hz, x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 156.2, 149.4, 138.8, 129.0, 122.0, 119.4, 118.2, 52.8, 44.5, 34.3, 27.7, 26.8, 26.1, 10.3. MS (ES+) found 287.35; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O (M+ + H) calculated 287.21.

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-ethylthiourea (3a')** Yield: 74%; Light brown solid; mp: 109–115 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (s, 1 H, NH), 7.42 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, Ar), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, Ar), 5.99 (s, 1 H, NH), 3.65 (quint, J = 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.31 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>), 1.17 (t, J = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  180.4, 150.6, 133.3, 127.1, 125.1, 40.4, 34.7, 31.3, 14.4. MS (ES<sup>+</sup>) found 237.35; C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 237.14.

**1-(4-Cyclohexylphenyl)-3-ethylthiourea (3b')** Yield: 71%; White solid; mp: 160–163 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.68 (s, 1 H, NH), 7.28 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 7.14 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar), 5.99 (s, 1 H, NH), 3.70 (d, 2 H, J = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.54 (s, 1 H, CH), 1.81–1.90 (m, 5 H, 5x CH), 1.39–1.46 (m, 5 H, 5x CH), 1.21 (t, 3 H, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  147.7, 133.5, 128.6, 125.5, 44.2, 40.4, 34.4, 26.8, 14.4. MS (ES<sup>+</sup>) found 263.16; C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 263.16.

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopropylthiourea (4a')** Yield: 100%; White solid; mp: 119–143 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.10 (s, 1 H, NH), 7.38 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.24 (s, 2 H, Ar), 6.46 (s, 1 H, NH), 2.84 (s, 1 H, CH), 1.30 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>), 0.86 (d, 2 H, J = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.68 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  181.9, 149.8, 134.5, 126.4, 124.9, 34.6, 31.3, 26.0, 7.5. MS (ES<sup>+</sup>) found 249.35; C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 249.14.

**1-(3-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopropylthiourea (4b')** Yield: 78%; White solid; mp: 125–140 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.05 (s, 1 H, NH), 7.29–7.34 (m, 3 H, Ar), 7.13 (s, 1 H, Ar), 6.48 (s, 1 H, NH), 2.88 (s, 1 H, CH), 1.30 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>), 0.88 (d, 2 H, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.68 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  182.0, 153.0, 136.9, 129.1, 123.8, 122.3, 122.1, 34.8, 31.2, 26.1, 7.5. MS (ES<sup>+</sup>) found 249.40; C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 249.14.

**1-Cyclopropyl-3-(4-iodophenyl)thiourea (4c')** Yield: 67%; Yellow solid; mp: 166–180 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.62 (s, 1 H, NH), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, Ar), 6.88 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, Ar), 2.70 (s, 1 H, CH), 0.41 (d, J = 5.7 Hz, 2 H, 2x CH), 0.22 (s, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  182.2, 139.4, 137.3, 126.0, 88.6, 26.2, 7.4. MS (ES<sup>+</sup>) found 319.15; C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 318.98.

**1-Cyclopropyl-3-(3-iodophenyl)thiourea (4d')** Yield: 55%; White solid; mp: 142–152 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.02 (s, 1 H, NH), 7.75 (s, 1 H, Ar), 7.57 (s, 1 H, Ar), 7.45 (s, 1 H, Ar), 7.10 (t, 1 H, J = 7.8 Hz, Ar), 6.67 (s, 1 H, NH), 2.76 (s, 1 H, CH), 0.91 (d, 2 H, J = 5.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.74 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182.2, 139.8, 134.6, 133.4, 130.2, 124.2, 93.6, 26.3, 7.5. MS (ES+) found 319.10; C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>I<sub>1</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 318.98.

**1-(4-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopropylthiourea (4e')** Yield: 53%; Light yellow solid; mp: 157–165 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.30 (s, 1 H, NH), 7.18 (s, 4 H, Ar), 6.36 (s, 1 H, NH), 2.78 (s, 1 H, CH), 2.46 (s, 1 H, CH), 1.70–1.82 (m, 5 H, 5x CH), 1.22–1.38 (m, 5 H, 5x CH), 0.81 (d, 2 H, J = 5.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.64 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 181.8, 146.6, 134.9, 127.7, 125.2, 44.1, 24.4, 26.8, 26.1, 7.5. MS (ES+) found 275.35; C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>++</sup>+H) calculated 275.16.

**1-(3-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopropylthiourea (4f')** Yield: 100%; Light yellow solid; mp: 122–128 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.08 (s, 1 H, NH), 7.30 (d, 1 H, J = 8.1 Hz, Ar), 7.09 (d, 3 H, J = 7.5 Hz, Ar), 6.58 (s, 1 H, NH), 2.49 (s, 1 H, CH), 1.71–1.83 (m, 5 H, 5x CH), 1.24–1.40 (m, 5 H, 5x CH), 0.86 (d, 2 H, J = 5.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 181.9, 150.0, 137.2, 129.4, 125.5, 123.6, 122.5, 119.7, 44.3, 34.3, 26.8, 26.0, 7.5. MS (ES+) found 275.25; C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 275.16.

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-(cyclobutylmethyl)thiourea (5a')** Yield: 62%; Light brown solid; mp: 129–146 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.59 (s, 1 H, NH), 7.43 (d, 2 H, J=8.4 Hz, Ar), 7.10 (s, 2 H, Ar), 5.97 (s, 1 H, NH), 3.66 (t,2H, J=6.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.56 (apparent quint, 1 H, J=7.8 Hz, CH), 2.01-2.04 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.86-1.89 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.62-1.71 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.32 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.8, 150.6, 133.3, 127.1, 124.9, 50.7, 34.7, 34.5, 31.2, 25.6, 18.4. MS (ES+) found 277.35; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>++</sup>+H) calculated 277.18.



**1-(3-(Tert-butyl)phenyl)-3-(cyclobutylmethyl)thiourea (5b')** Yield: 57%; White solid; mp: 105–111 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.93 (s, 1 H, NH), 7.32–7.37 (m, 2 H, Ar), 7.20 (s, 1 H, Ar), 6.99 (d, 1 H, J=6.6 Hz, Ar), 5.98 (s, 1H, NH), 3.65 (t, 2H, J=5.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.53 (quint, 1 H, J= 7.5 Hz, CH), 1.94-2.04 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.82–1.93 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.64–1.72 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.30 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.5, 153.8, 135.8, 129.8, 124.3, 122.3, 122.1, 50.7, 34.9, 34.4, 31.2, 25.6, 18.4. MS (ES+) found 277.35; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>S (M++H) calculated 277.18.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(4-iodophenyl)thiourea (5c')** Yield: 65%; White solid; mp: 98–108 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.38 (s, 1 H, NH), 7.65 (d, 2 H, J =8.4 Hz, Ar), 7.03 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 6.31 (s, 1 H, NH), 3.60 (t, 2 H, J = 5.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.54 (sept, 1 H, J = 7.5 Hz, CH), 1.98-2.07 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.82–1.93 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.64–1.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.7, 138.6, 137.1, 126.2, 90.4, 50.4, 34.4, 25.7, 18.4. MS (ES+) found 347,15; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S (M+ + H) calculated 347.01.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(3-iodophenyl)thiourea (5d')** Yield: 20%; White solid; mp: 136–147 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.86 (s, 1 H, NH), 7.57–7.62 (m, 2 H, Ar), 7.13–7.19 (m, 2H, Ar), 6.02 (s, 1H, NH), 3.65 (t, 2H, J=6.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.58 (apparent quint, 1 H, J=7.5 Hz, CH), 2.04–2.08 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.89-1.94 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>) 1.65–1.73 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.2, 137.7, 135.9, 133.6, 131.5, 124.0, 94.9, 50.8, 34.3, 25.7, 18.4. MS (ES+) found 347.10; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S (M++H) calculated 347.01.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(4-cyclohexylphenyl)thiourea (5e')** Yield: 72%; Light brown solid; mp: 144–152 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.04 (s, 1 H, NH), 7.22 (d, 2 H, J= 8.1 Hz, Ar), 7.08 (d, 2 H, J =8.4 Hz, Ar), 5.97 (s, 1 H, NH), 3.63 (d, 2 H, J =7.2, CH<sub>2</sub>), 2.49–2.57 (quint, 2 H, J =7.5, CH<sub>2</sub>), 1.91–2.02 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.63–2.00 (m, 9 H, 4x CH<sub>2</sub> + CH), 1.24–1.41 (m, 5 H, 2x CH<sub>2</sub> + CH); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.0, 147.4, 133.7, 128.5, 125.2, 50.7, 44.1, 34.5, 34.3, 26.8, 26.0, 25.6, 18.3. MS (ES+) found 303.35; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>S (M+ + H) calculated 303.19.

**1-(Cyclobutylmethyl)-3-(3-cyclohexylphenyl)thiourea (5f')** Yield: 51%; Light yellow solid; mp: 102–110 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.91 (s, 1 H, NH), 7.32 (d, 1 H, J = 7.8 Hz, Ar), 7.12 (d, 1 H, J = 7.8 Hz, Ar), 6.97–7.13 (m, 2 H, Ar), 6.00 (s, 1 H, NH), 3.65 (t, 2 H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.49–2.60 (m, 2 H, 2x CH), 1.97–2.04 (m, 2 H, 2x CH), 1.64–1.91 (m, 9 H, 9x CH), 1.24–1.40 (m, 5 H, 5x CH); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.5, 150.6, 136.1, 130.0, 125.9, 123.4, 122.3, 50.6, 44.3, 34.4, 34.3, 26.7, 26.0, 25.6, 18.4. MS (ES<sup>+</sup>) found 303.30; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 303.19.

**1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopentylthiourea (6a')** Yield: 73%; White solid; mp: 142–154 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.03 (s, 1 H, NH), 7.38 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.08 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 6.03 (s, 1 H, NH), 4.61 (s, 1 H, CH), 2.05 (apparent quint, 2 H, J = 6.3 Hz, 2x CH), 1.55–1.57 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.34–1.38 (m, 2 H, 2x CH), 1.22–1.28 (m, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.4, 150.2, 133.6, 127.0, 124.5, 56.9, 34.6, 32.7, 31.2, 23.6. MS (ES<sup>+</sup>) found 277.35; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 277.18.

**1-(3-(Tert-butyl)phenyl)-3-cyclopentylthiourea (6b')** Yield: 21%; White solid; mp: 170–180 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.73 (s, 1 H, NH), 7.29–7.38 (m, 2 H, Ar), 7.19 (s, 1 H, Ar), 6.98 (d, 1 H, J = 7.2 Hz, Ar), 6.02 (d, 1 H, J = 6.0 Hz, NH), 4.68 (q, 1 H, J = 6.6 Hz, CH), 2.06–2.12 (m, 2 H, 2x CH), 1.58–1.62 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.35–1.42 (m, 2 H, 2x CH), 1.31 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.4, 153.4, 136.2, 129.7, 123.7, 121.9, 121.6, 56.8, 34.8, 32.8, 31.2, 23.6. MS (ES<sup>+</sup>) found 277.35; C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 277.18.

**1-Cyclopentyl-3-(4-iodophenyl)thiourea (6c')** Yield: 22%; Light brown solid; mp: 154–162 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 (s, 1 H, NH), 7.66 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.02 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 6.26 (s, 1 H, NH), 4.61 (s, 1 H, CH), 2.03–2.09 (m, 2 H, 2x CH), 1.56–1.65 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.37–1.42 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.8, 138.7, 137.0, 126.2, 90.4, 56.6, 32.8, 23.7. MS (ES<sup>+</sup>) found 347.10; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> + H) calculated 347.01.

**1-Cyclopentyl-3-(3-iodophenyl)thiourea (6d')** Yield: 21%; White solid; mp: 136–147 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78 (s, 1 H, NH), 7.57–7.62 (m, 2 H, Ar), 7.11–7.21 (m, 2 H, Ar), 6.05 (s, 1 H, NH), 4.62 (s, 1 H, CH), 2.04–2.13 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.61–1.66 (m, 4 H, 2x CH<sub>2</sub>), 1.40–1.46 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.4, 137.9, 135.7, 133.5, 131.3, 123.9, 94.9, 57.0, 32.8, 23.7. MS (ES+) found 347.15; C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>S (M+ + H) calculated 347.01.

**1-(4-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopentylthiourea (6e')** Yield: 100%; White solid; mp: 146–152 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.05 (s, 1 H, NH), 7.22 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 7.08 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 5.98 (d, 1 H, J = 7.2 Hz, NH), 4.65 (d, 1 H, J = 6.6 Hz, CH), 2.49 (s, 1 H, CH), 2.07 (q, 2H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.24–1.83 (m, 16 H, 8x CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.6, 147.1, 133.8, 128.5, 127.9, 125.3, 124.9, 56.9, 44.1, 34.3, 32.7, 26.8, 26.0, 23.7, 23.6. MS (ES+) found 303.35; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>S (M+ + H) calculated 303.19.

**1-(3-Cyclohexylphenyl)-3-cyclopentylthiourea (6f')** Yield: 62%; White solid; mp: 129–142 °C; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78 (s, 1 H, NH), 7.32 (t, 1 H, J = 7.8 Hz, Ar), 7.11 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, Ar), 6.97–7.01 (m, 2 H, Ar), 6.02 (d, 1 H, J = 5.4 Hz, NH), 4.67 (d, 1 H, J = 6.3 Hz, CH), 2.50 (s, 1 H, CH), 2.08 (q, 2 H, J = 6.6 Hz, 2x CH), 1.73–1.86 (m, 5 H, 5x CH), 1.60 (apparent quint, 5 H, J = 6.9 Hz, 5x CH), 1.24–1.41 (m, 6 H, 6x CH); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.6, 150.6, 136.1, 130.0, 125.8, 123.2, 122.1, 57.0, 44.3, 34.3, 32.8, 26.7, 26.0, 23.6. MS (ES+) found 303.30; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>S (M+ + H) calculated 303.19.

**3-((4-(Tert-butyl)phenyl)amino)-4-(cyclopropylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (4a'')** Yield: 75%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 285.16; C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 285.16.

**3-((3-(Tert-butyl)phenyl)amino)-4-(cyclopropylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (4b<sup>''</sup>)** Yield: 68%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.84 (s, 1 H, NH), 7.20 (s, 2 H, Ar), 6.99 (d, 2 H, J = 5.4 Hz, Ar), 6.82 (d, 1 H, J = 6.0 Hz, NH), 2.87-2.91 (m, 1 H, CH), 1.09 (s, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>), 0.64 (d, 2 H, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 0.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). MS (ES<sup>+</sup>) found 285.16; C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 285.16.

**3-((Cyclopropylamino)-4-((4-iodophenyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (4c<sup>''</sup>)** Yield: 75%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.04 (s, 1 H, NH), 6.94 (d, 2 H, J = 8.7 Hz, Ar), 6.66 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, Ar), 2.46–2.52 (m, 1 H, CH), 0.20–0.22 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 0.07 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 185.8, 175.7, 168.8, 144.1, 142.8, 125.3, 90.4, 31.1, 12.3. MS (ES<sup>+</sup>) found 354.99; C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 355.00.

**3-((Cyclopropylamino)-4-((3-iodophenyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (4d<sup>''</sup>)** Yield: 53%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.83 (s, 1H, NH), 7.43 (s, 1H, NH), 7.16 (d, 2H, J = 7.2 Hz, Ar), 6.99 (d, 2 H, J = 7.5 Hz, Ar), 6.71 (t, 1H, Ar), 2.78–2.82 (m, 1H, CH), 0.56 (d, 2H, J = 6.0 Hz, 2x CH), 0.37 (s, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 185.8, 175.3, 168.8, 145.1, 136.4, 135.7, 131.6, 122.4, 99.1, 31.1, 12.3. MS (ES<sup>+</sup>) found 354.99; C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 355.00.

**3-((4-Cyclohexylphenyl)amino)-4-(cyclopropylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (4e<sup>''</sup>)** Yield: 99%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.06 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 6.86 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Ar), 2.85–2.89 (m, 1 H, CH), 2.14–2.19 (m, 1 H, CH), 1.44–1.56 (m, 5 H, 5x CH), 0.98–1.10 (m, 5 H, 5x CH), 0.58–0.60 (m, 2 H, 2x CH), 0.42 (s, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 15.9, 175.0, 169.3, 147.5, 141.7, 132.4, 123.2, 48.5, 39.3, 31.6, 31.0, 30.8, 12.3. MS (ES<sup>+</sup>) found 311.18; C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 311.18.

**3-((3-Cyclohexylphenyl)amino)-4-(cyclopropylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (4f'')** Yield: 53%; White solid; mp: decomposition; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 185.9, 175.1, 169.4, 154.2, 143.8, 134.0, 126.5, 121.8, 120.7, 49.2, 39.1, 31.6, 31.1, 30.8, 12.3. MS (ES<sup>+</sup>) found 311.18; C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 311.17.

**3-((4-(Tert-butyl)phenyl)amino)-4-((cyclobutylmethyl) amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (5a'')** Yield: 71%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES<sup>+</sup>) found 313.19; C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 313.19.

**3-((3-Tert-butyl)phenyl)amino)-4-((cyclobutylmethyl)amino) cyclobut-3-ene-1,2-dione (5b'')** Yield: 54%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.22 (s, 1 H, NH), 7.53 (s, 1 H, Ar), 7.28 (s, 3 H, Ar), 7.09 (s, 1 H, NH), 3.73–3.76 (m, 2 H, 2x CH), 2.86-2.89 (m, 1 H, CH), 2.55-2.64 (m, 1 H, CH), 2.07-2.14 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.90-1.98 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.79–1.84 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.33–1.37 (m, 9 H, 3x CH<sub>3</sub>). MS (ES<sup>+</sup>) found 313.19; C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 313.19.

**3-((Cyclobutylmethyl)amino)-4-((4-iodophenyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (5c'')** Yield: 90%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.01 (d, 2 H, J= 8.4 Hz, Ar), 6.71 (d, 2 H, J=8.7 Hz, Ar), 3.12 (t, 2 H, J= 6.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.92 (s, 1 H, CH), 1.50–1.55 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.33–1.39 (m, 2 H, 2x CH), 1.17–1.23 (m, 2 H, 2x CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 179.2, 168.3, 162.1, 137.9, 136.7, 119.0, 84.2, 47.8, 34.7, 30.0, 23.8, 16.8. MS (ES<sup>+</sup>) found 233.20; C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>++</sup>H) calculated 383.03.

**3-((Cyclobutylmethyl)amino)-4-((3-iodophenyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (5d'')** Yield: 56%; White solid; mp: decomposition; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>): δ 168.7, 162.5, 139.7, 130.4, 130.1, 125.8, 116.5, 93.5, 48.4, 35.1, 24.2, 17.2. MS (ES<sup>+</sup>) found 383.02; C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> + H) calculated 383.03

**3-((Cyclobutylmethyl)amino)-4-((4-cyclohexylphenyl)amino) cyclobut-3-ene-1,2-dione (5e'')** Yield: 82%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> and

DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.12 (s, 1H, NH), 7.54 (d, 1H, J=7.2Hz, NH), 7.25 (d, 2 H, J= 6.9Hz, Ar), 7.06 (t, 2 H, J=6.6Hz, Ar), 3.62-3.64 (m, 2 H, 2x CH), 2.93 (d, 4 H, J=7.2 Hz, 2x CH<sub>2</sub>), 2.35–2.40 (m, 1 H, CH), 1.97–2.04 (m, 2 H, 2x CH), 1.68–1.84 (m, 7 H, 7x CH), 1.22–1.31 (m, 4 H, 4x CH); MS (ES+) found 339.21; C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M++H) calculated 339.21.

**3-((Cyclobutylmethyl)amino)-4-((3-cyclohexylphenyl)amino) cyclobut-3-ene-1,2-dione (5f<sup>''</sup>)** Yield: 40%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 339.21; C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 339.21.

**3-((4-(Tert-butyl)phenyl)amino)-4-(cyclopentylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (6a<sup>''</sup>)** Yield: 81%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 313.19; C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 313.19.

**3-((3-(Tert-butyl)phenyl)amino)-4-(cyclopentylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (6b<sup>''</sup>)** Yield: 49%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 313.19; C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 313.19.

**3-((Cyclopentylamino)-4-((4-iodophenyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (6c<sup>''</sup>)** Yield: 90%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 383.02; C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 383.03.

**3-((Cyclopentylamino)-4-((3-iodophenyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (6d<sup>''</sup>)** Yield: 80%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 383.02; C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 383.03.

**3-((4-Cyclohexylphenyl)amino)-4-(cyclopentylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (6e'')** Yield: 85%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 339.21; C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 339.21.

**3-((3-Cyclohexylphenyl)amino)-4-(cyclopentylamino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (6f'')** Yield: 25%; White solid; mp: decomposition; <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (insoluble in deuterated solvents). MS (ES+) found 339.21; C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+ + H) calculated 339.21.

### 1.9.3 Biological methods

#### Cell culture

The HaCaT spontaneously immortalized human keratinocytes and HDFn primary human dermal fibroblasts neonatal were obtained from ThermoFisher Scientific. HaCaT cells were cultured in DMEM medium containing high glucose concentration, glutamine and sodium pyruvate (Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum and PenStrep (2%) (FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). HDFn cells were cultured in the same medium supplemented with 2% FBS to which was added Pen-Strep (2%), basic fibroblast grow factor (BFGF –3 ng/mL), basic epithelial grow factor (BEGF –10 ng/mL), hydrocortisone (1 ng/mL) and heparin (10 ng/mL). The cells were maintained at 37 °C in a moisture-saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

#### Evaluation of the antiproliferative activity

The antiproliferative activity assay of all compounds was evaluated using the procedure recommended by the National Cancer Institute for its drug-screening program with minor modifications (Shoemaker, 2006). Briefly, 96-well microtiter plates were seeded with 75 µL of a suspension of either human HaCaT keratinocytes (5 × 10<sup>3</sup>) or HDFn fibroblasts (3 × 10<sup>3</sup>) per well and incubated for 24 h at 37 °C in a

moisture-saturated atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub>. Drugs freshly solubilized in DMSO (40 mM) were diluted in fresh medium, and 75 µL aliquots containing serially diluted concentrations of the drugs were added. Final drug concentrations ranged from 100 µM to 781 nM. DMSO was maintained at a concentration of <0.5% (v/v) to avoid any related cytotoxicity. Plates were incubated for 48 h. Afterwards, cell growth was stopped by the addition of cold trichloroacetic acid to the wells (10% w/v, final concentration), followed by a 1 h incubation at 4 °C. Plates were washed 4 times with distilled water. Then, 75 µL of a sulforhodamine B solution (0.1% w/v) in 1% acetic acid was added to each well, and the plates were incubated for 15 min at room temperature. After staining, unbound dye was removed by washing 4 times with 1% acetic acid. Bound dye was solubilized in 20mM Tris base, and the absorbance was read using an optimal wavelength (530 –568 nm) with a µQuant Universal microplate spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT, USA). Readings obtained from treated cells were compared with measurements of control cell plates fixed on treatment day, and the percentage of cell growth inhibition was calculated for each drug. The experiments were performed at least twice in triplicate. The assays were considered valid when the coefficient of variation for a given set of conditions and within the same experiment was <10%.

### **Evaluation of the inhibition of IL-6 production**

HaCaT cells ( $1 \times 10^5$ ) were suspended in 500 µL of DMEM and incubated for 24 h in 24-well microtiter plates at 37 °C in a moisture-saturated atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub>. Drugs solubilized in DMSO (40 mM) were diluted in fresh DMEM and 500 µL of the mixture were added to the culture medium to obtain a final concentration of 10 µM per well. Cells were pretreated for 1 hour then the culture medium was replaced with fresh DMEM containing 200 ng/mL IL-17A+ 20 ng/mL TNF-α (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and 10 µM of the drugs or 1 µM of dexamethasone used as control. Following a 6 h incubation, the culture medium was removed and transferred to clean 1.5 mL tubes and kept at –80 °C until ELISA was performed. IL-6 concentration in cell medium was determined using an IL-6 human DuoSet ELISA kit (Fisher Scientific, Ottawa, On, Canada) following the



manufacturer's instructions. Standards and samples were prepared and assessed in duplicate. Two separate replicates were done for each sample. The absorbance was measured at 450 nm with a TECAN infinite M1000 plate reader.

### **Evaluation of IL-6 mRNA levels**

The day prior the experiments,  $6 \times 10^5$  HaCaT cells/well were suspended in six-well plates. After treatments, HaCaT were washed once in PBS and lysed in 700  $\mu$ L of TRI Reagent (Sigma). Total RNA was extracted and treated with DNase I (Sigma) following the manufacturer's instructions. Then, 500 ng RNAs was reverse-transcribed with M-Mulv (NEB) using a mix of random primers and oligo(dT) and resuspended in ultrapure water to a total volume of 200  $\mu$ L. For each qPCR reaction, 2  $\mu$ L of cDNA was added in a final reaction mixture of 10  $\mu$ L, containing 5  $\mu$ L of 2x iTAQ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 500 nM of primers (IDT, Coralville, IA, USA). Real-time quantitative PCR was performed on a CFX96 system (Bio-Rad). The PCR protocol was: an initial 30 s denaturation step at 95 °C, 40 cycles of [5 s at 95 °C, 30 s at 60 °C] and a final dissociation curve to control the specificity of the amplification. Relative mRNA levels were normalized to U6. The primers used for qPCR amplification were designed using Primer3. The primers used were IL-6 forward, 5'-GTAGCCGCCCCACACAGA-3', reverse, 5'-CATGTCTCCTTTCTCAGGGCTG-3', U6 forward, 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', reverse, 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'.

### **Human hepatic microsomal stability**

Assays were performed for 1 h at 37 °C. Human liver microsomes (40  $\mu$ g; Corning, Melrose, MA, USA) and 10  $\mu$ M of the selected PcAUs were mixed in a buffer made of 50mM Tris buffer supplemented with 10mM MgCl<sub>2</sub> and containing or not 10mM NADPH (100  $\mu$ L final reaction volume). Reactions were stopped by adding 100  $\mu$ L MeOH, followed by centrifugation step at 13,000  $\times$  g for 10 min to obtain a protein pellet [18]. Supernatants were filtered and 100  $\mu$ L of the filtrate were submitted to HPLC-MS analysis (Shimadzu LCMS-2020 APCI, Altima HP C18 column (250 mm 4.6 mm, 5  $\mu$ m)). The eluent gradient started with a mixture of

MeOH:water at ratios of 70:30, 50:50, 30:70 or 20:80 according to the PcAU tested and finished with MeOH (100%). The percentage of untransformed PcAU was calculated by dividing the area under the curve of the PcAU incubated with NADPH-containing microsomes with the PcAU incubated in absence of NADPH and multiplied by 100. Values represent the average of two independent experiments performed in duplicate.

#### **1.9.4 Statistical analysis**

Duncan–Kramer multiple range test as well as the parametric Student's t-test, used to analyze for significance between the experimental groups, were performed using the JMP V7.0.1 program (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## 1.10 Data availability

The datasets supporting this article have been uploaded as part of the electronic supplementary material. Acknowledgements We sincerely thank Dr. Gervais Bérubé for his helpful comments during the preparation of this manuscript. Author contributions R. C.-G and S.G designed the chemical and the biological experiments and wrote the manuscript. S.T. prepared all compounds. J.B., M.P., and M.-F.C. performed all the biological experiments and prepared the figures. Funding This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (R.C.-G; Grant #MOP-142186 and #MOP-156019). S.T. is a recipient of a studentship from the Fond de Recherche du Québec—Nature et Technologies (FRQNT) (Scholarship #209618).

## **1.11 Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 1.12 References

Bannwarth B (2005) Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors have a future? *Drug Saf* 28:183–189

Bauer UE, Briss PA, Goodman RA, Bowman BA (2014) Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. *Lancet* 384:45–52

Bechard P, Lacroix J, Poyet P, C-Gaudreault R (1994) Synthesis and cytotoxic activity of new alkyl-[3-(chloroethyl)ureido] benzene derivatives. *Eur J Med Chem* 29:963–966

Bouchon B, Chambon C, Mounetou E, Papon J, Miot-Noirault E, C.-Gaudreault R, Madelmont JC, Degoul F (2005) Alkylation of beta-tubulin on Glu 198 by a microtubule disrupter. *Mol Pharm* 68:1415–1422

Bouchon B, Papon J, Communal Y, Madelmont JC, Degoul F (2007) Alkylation of prohibitin by cyclohexylphenyl-chloroethyl urea on an aspartyl residue is associated with cell cycle G(1) arrest in B16 cells. *Br J Pharm* 152:449–455

Brophy JM (2007) Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr Opin Gastroenterol* 23:617–624

Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, Chimenti S, Krueger JG (2011) Integrative responses to IL-17 and TNF- $\alpha$  in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol* 131:677–687

Fortin J, Patenaude A, Deschesnes RG, Cote MF, Petitclerc E, C.-Gaudreault R (2010) ASK1-P38 pathway is important for anoikis induced by microtubule-targeting aryl chloroethylureas. *J Pharm Pharm Sci* 13:175–190

Fortin JS, Cote MF, Lacroix J, Patenaude A, Petitclerc E, C.-Gaudreault R (2008) Cycloalkyl-substituted aryl chloroethylureas inhibiting cell cycle progression in G0/G1 phase and thioredoxin- 1 nuclear translocation. *Bioorg Med Chem Lett* 18:3526–3531

Fortin JS, Lacroix J, Desjardins M, Patenaude A, Petitclerc E, C.-Gaudreault R (2007) Alkylation potency and protein specificity of aromatic urea derivatives and bioisosteres as potential irreversible antagonists of the colchicine-binding site. *Bioorg Med Chem* 15:4456–4469

Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:S4–S9

Goldkind L, Laine L (2006) A systematic review of NSAIDs withdrawn from the market due to hepatotoxicity: lessons learned from the bromfenac experience. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 15:213–220

Goodwin JS (1984) Immunologic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 77:7–15

Hennes S, Johnson CK, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ (2004) IL-17A augments TNF- $\alpha$ -induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *J Allergy Clin Immunol* 114:958–964

Hirotsugu K, Hiromichi Y, Kenji C, Takeki O (1991) Inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors of interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 13:1137–1146

Hunter CA, Jones SA (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16:448–457

Huscher D, Thiele K, Gromnica-Ihle E, Hein G, Demary W, Dreher R, Zink A, Buttgerit F (2009) Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. *Ann Rheum Dis* 68:1119–1124

Iyer KR, Sinz MW (1999) Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. *Chem Biol Interact* 118:151–169

Jain SK, Singh S, Khajuria A, Guru SK, Joshi P, Meena S, Nadkarni JR, Singh A, Bharate SS, Bhushan S, Bharate SB, Vishwakarma RA (2014) Pyranoisochromanones as IL-6 Inhibitors: Synthesis, in vitro and in vivo antiarthritic activity. *J Med Chem* 57:7085–7097

Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82–86

Jones R, Rubin G, Berenbaum F, Scheiman J (2008) Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 121:464–474

Jones SA, Jenkins BJ (2018) Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol* 18:773–789

Kamimura D, Arima YN, Hirano T, Ogura H, Murakami M (2014) IL-6 and Inflammatory Diseases. *Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease*. T. Y. a. T. Yoshimoto. Springer, Japan, p 53–79

Kim GW, Lee NR, Pi RH, Lim YS, Lee YM, Lee JM, Jeong HS, Chung SH (2015) IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future. *Arch Pharm Res* 38:575–584

Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VGM, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R (2013) Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflam Allergy-Drug Targets (Former Curr Drug Targets-Inflamm Allergy)* 12:349–361

McCarthy DM (1999) Comparative toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 107:37–46

Mendes D, Alves C, Batel Marques F (2013) Safety of biologics approved for treating rheumatoid arthritis: analysis of spontaneous reports of adverse events. *Clin Rheumatol* 32:1207–1214

Nishimoto N, Kishimoto T (2004) Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharm* 4:386–391

Rao P, Knaus EE (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* 11:81s–110s

Riley L, Guthold R, Cowan M, Savin S, Bhatti L, Armstrong T, Bonita R (2016) The World Health Organization STEPwise approach to noncommunicable disease risk-factor surveillance: methods, challenges, and opportunities. *Am J Public Health* 106:74–78

Rose-John S (2012) IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 8:1237

Schacke H, Docke WD, Asadullah K (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharm Ther* 96:23–43

Sehgal VN, Pandhi D, Khurana A (2015) Biologics in dermatology: adverse effects. *Int J Dermatol* 54:1442–1460

Shoemaker RH (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6:813–823

Singh BK, Haque SE, Pillai KK (2014) Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced cardiotoxicity. *Exp Opin Drug Met Toxicol* 10:143–156

Singh JA, Hossain A, Tanjong Ghogomu E, Mudano AS, Maxwell LJ, Buchbinder R, Lopez-Olivo MA, Suarez-Almazor ME, Tugwell P, Wells GA (2017) Biologics or tofacitinib for people with rheumatoid arthritis unsuccessfully treated with biologics: a systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD012591

Sousa P, Allez M (2015) Complications of biologics in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 31:296–302

Succaria F, Bhawan J (2017) Cutaneous side-effects of biologics in immune-mediated disorders: a histopathological perspective. *J Dermatol* 44:243–250

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a016295

Terada Y, Kamoi K, Ohno-Matsui K, Miyata K, Yamano C, Coler-Reilly A, Yamano Y (2017) Treatment of rheumatoid arthritis with biologics may exacerbate HTLV-1-associated conditions: a case report. *Med (Baltim)* 96:e6021 *Medicinal Chemistry Research*



## **CHAPITRE 2. PcAU-1036 is a Novel Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist**

**Joël Boutin<sup>1</sup>, Marie-France Côté<sup>1,2</sup>, Sébastien Tremblay<sup>2</sup>, René C.-Gaudreault<sup>2,3</sup>  
and Stéphane Gobeil<sup>1,2</sup>**

1 *CRCHU de Québec-Université Laval, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), 2705 boulevard Laurier, Québec (Qc), G1V 4G2, Canada.*

2 *CRCHU de Québec-Université Laval, Hôpital Saint-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec (Qc), G1L 3L5, Canada.*

3 *Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec (Qc), G1V 0A6, Canada.*

## **2.1 Avant-propos**

Ce chapitre fait l'objet de l'ébauche d'un article qui sera soumis après la publication de l'article présenté dans le chapitre 1.

J'ai réalisé la totalité des expériences, sauf l'immunofluorescence qui a été réalisée par Mme Marie-France Côté. M. Sébastien Tremblay a fait la synthèse des différents composés. J'ai également fait toutes les analyses et les figures et j'ai rédigé l'article sous la supervision des Drs Stéphane Gobeil et René C.-Gaudreault.

## 2.2 Résumé

Nous avons précédemment identifié les phényl cyclolalkylurées (PcAUs), comme des inhibiteurs de l'expression de l'IL-6 dans les kératinocytes humains. Nous avons étudié le mécanisme d'action de la PcAU-1036, la molécule la plus efficace de cette famille de composés. En utilisant deux agonistes du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AHR) reconnus, soit le TCDD et le FICZ, ainsi qu'un antagoniste (CH223191), nous démontrons par immunofluorescence et par fractionnement cellulaire que la PcAU-1036, comme le CH223191, empêche la translocation nucléaire de AHR induite par le TCDD, mais pas par le FICZ. Ensuite, nous montrons que la PcAU-1036, comme le CH223191, inhibe l'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1* induite par le TCDD, mais pas par le FICZ. Enfin, nous montrons par interférence à l'ARN que l'effet de la PcAU-1036 sur l'IL-6 implique AHR. Nos résultats démontrent que, similairement au CH223191, la PcAU-1036 antagonise l'activation basale et induite par le TCDD de la voie AHR.

## 2.3 Abstract

We have developed a family of small drugs named phenyl cyclolalkylureas (PcAUs), which were shown to inhibit IL-6 expression in human keratinocytes. PcAU-1036 was identified as the most potent member of this family of compounds. While studying its mechanism of action, we found this molecule to strongly inhibit the basal expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*; two major target genes of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), a transcription factor best known for inducing the expression of detoxifying enzymes. There is growing evidence linking *IL-6* gene regulation to AHR, suggesting an interaction between PcAU-1036 and the AHR pathway. Using two well-characterized AHR agonists, namely TCDD and FICZ, and an antagonist (CH223191), we showed using immunofluorescence and subcellular fractionation that PcAU-1036 and CH223191 hinder the nuclear import of AHR induced by TCDD but not by FICZ. We further demonstrated that PcAU-1036 and CH223191 inhibit basal and TCDD-, but not FICZ-induced expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*. In addition, we observed that both PcAU-1036 and CH223191 impede IL-6 expression but not when cells were treated with FICZ. Finally, we have shown by RNA interference that the effect of PcAU-1036 on IL-6 expression involves AHR. Our results demonstrate that similar to CH223191, PcAU-1036 antagonizes the basal and TCDD-induced activation of the AHR pathway. Research is underway to fully understand the role of AHR in inflammation. While numerous AHR agonists have been identified, only a limited number of antagonists are currently available. In this regard, PcAU-1036 could prove to be a valuable tool to fully elucidate this pathway.

## 2.4 Introduction

The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) is a transcription factor and a member of the basic-helix-loop-helix and Per-Arnt-Sim domain (bHLH-PAS)-containing family. At rest, AHR mostly resides in the cytoplasm and forms a stable complex with the chaperones p23, XAP-2 (X-associated protein 2) and two HSP90s (heat shock protein of 90 kDa) (1–3). According to the canonical pathway, binding of a ligand to AHR triggers its migration to the nucleus where it dissociates from its initial cytosolic complex to form a heterodimer with the AHR nuclear translocator (ARNT) protein (4,5). AHR-ARNT then binds on dioxin response elements (DRE) to mediate the expression of a wide array of genes, including the detoxifying enzymes CYP1A1 and CYP1B1 (6–8). Production of these enzymes leads to dioxins metabolization, which consequently decreases the availability of these AHR ligands and the activation of AHR in a negative feedback loop. The AHR-ARNT complex also promotes the expression of the AHR repressor (AHRR), which competes for ARNT, resulting in nuclear export and degradation of AHR by the proteasome (9–11).

A wide variety of endogenous and exogenous ligands bind to AHR. It has been proposed that this feature of AHR contributes to the adaptability of the cell to its environment (12,13). AHR ligands are grouped in two broad classes. On one hand, Halogenated Aromatic Hydrocarbons (HAHs) consist mainly of exogenous ligands present in the environment as contaminants, such as cigarette smoke and diesel. The dioxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a prototypical HAH, causes strong toxic effects like chloracne and tumor promotion (14,15). On the other hand, the endogenous Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ligands are typically photoproducts and metabolites derived from tryptophan, including 6-formylindolo [3,2-*b*] carbazole (FICZ) and tryptamine. FICZ is to date the ligand with the highest affinity for AHR (16–18). Although both HAHs and PAHs induce a common response, *e.g.* induction of *CYP1A1* and *CYP1B1* expression, only HAHs are linked to AHR-mediated toxicity. This could be explained by the fact that PAHs are metabolized rapidly and, therefore, are unable to induce a sustained response.

Indeed, HAH-induced toxicity only appears several days following exposure to HAHs (15).

While numerous AHR ligands have been identified, fewer antagonists have been discovered so far. One of them, CH223191, has been shown to strongly antagonize AHR activation by HAHs (16). To a lesser extent, it was also found to antagonize AHR activation by PAHs when used at higher concentrations (17,18).

Beyond the established pathway, AHR is involved in the regulation of other cellular functions (19,20). In that regard, numerous but conflicting evidences have shown that AHR plays a role in the regulation of inflammation. For example, phototherapy and coal tar treatments which have been used for decades to reduce the symptoms associated with cutaneous inflammation both function by activation AHR (21–23). FICZ has also been shown to exhibit a protective effect in mouse models of psoriasis and atopic dermatitis (18,24). In addition, the psoriatic-like symptoms induced by imiquimod treatment are exacerbated in AHR-deficient mice compared to wild-type mice (18). Conversely, multiple studies have shown that ligand-activated AHR interacts with NF- $\kappa$ B and localizes on the promoter of pro-inflammatory genes such as *IL-6* to upregulate their expression (25–27).

We previously reported that several members of a small-molecule drug chemolibrary named phenyl cycloalkylureas (PcAUs) act as inhibitors of IL-6 in HaCaT keratinocytes (28). Among the PcAUs tested, PcAU-1036 was identified as the most potent inhibitor. When characterizing this molecule, we found that it strongly decreases the basal expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*, suggesting a link between PcAU-1036 and AHR. In the present study, we studied the effect of PcAU-1036 on the activation of the AHR pathway and the implication of AHR in PcAU-1036 mediated inhibition of IL-6. Our study demonstrates that PcAU-1036 acts as an AHR antagonist and provides evidence of a link between the AHR pathway and the regulation of IL-6 expression. As such, PcAU-1036 could be an effective tool for studying AHR.

## 2.5 Materials and methods

### Drugs and reagents

PcAU-1036 (1-(4-cyclohexylphenyl)-3-cyclopropylurea) and PcATU-1052 (1-(4-cyclohexylphenyl)-3-cyclopropylthiourea) were synthesized, purified and their structures were confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry as described in Tremblay et al., 2020. CH223191 and FICZ were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). PEI and TCDD were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). DMSO was used as a vehicle to dissolve every drug and cells were never exposed to more than 0.1% DMSO to avoid potential cytotoxicity. Recombinant IL-17A and TNF $\alpha$  were purchased from Peprotech (Montreal, QC) and dissolved in water with 0.1% BSA. Mouse monoclonal antibodies against AHR (A-3),  $\beta$ -actin HRP (C4) and rabbit polyclonal antibody (H-51) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Mouse monoclonal antibody against vinculin (V284) was obtained from Millipore (Burlington, MA). Tri-Reagent and DNase I Amplification Grade were purchased from Sigma. M-Mulv and RNase inhibitors were obtained from NEB (Ipswich, MA).

### Cell culture and treatments

HaCaT, a human keratinocyte cell line, and 293T were cultured in Dulbecco Minimal Essential Medium, DMEM (Sigma), supplemented with 1 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Gaithersburg, MD) and 10% Fetal Bovine Serum (Wisent). HaCaT cells were passaged before reaching full confluence by trypsinization with TrypLE (Gibco). HaCaT cells were treated with either the excipient (DMSO), PcAU-1036 (10  $\mu$ M), CH223191 (5  $\mu$ M), TCDD (10  $\mu$ M) or FICZ (5  $\mu$ M), alone or in combination as indicated for 20 min prior to the study of AHR localization and for 6 h before assessing *CYP1A1* and *CYP1B1* mRNA expression levels. *IL-6* mRNA expression and IL-6 protein extracellular levels were evaluated in HaCaT cells pretreated 1 h with either the excipient (DMSO), PcAU-1036 (10  $\mu$ M), CH223191 (5  $\mu$ M), TCDD (10  $\mu$ M) or FICZ (5  $\mu$ M), alone or in combination. Cells were afterwards stimulated with IL-17A (100 ng/mL) and TNF $\alpha$  (10 ng/mL) for 1 h for the study of *IL-6* mRNA expression and for 6 h for the study of IL-6 protein release.

## Immunofluorescence

On the day before the experiment,  $1 \times 10^5$  HaCaT cells were grown on coverslips in 6-well plates. The next day, cells were treated with the compounds for 20 min, then fixed in 3.7% formalin for 10 min, permeabilized in 3% BSA + 0.1% saponin for 90 min and incubated with the first antibody diluted in 3% BSA + 0.1% saponin for 2 h. The coverslips were then washed 3 times in PBS + 0.05% Tween<sup>®</sup> 20 and incubated with the second antibody and DAPI for 2 h. After 5 washes with PBS + 0.05% Tween<sup>®</sup> 20, coverslips were mounted with Fluoromount-G (Invitrogen), visualized using an Olympus BX51 fluorescence microscope (Olympus, Center Valley, PA) and images were taken with a Qimaging RETIGA EXi camera (Qimaging, Surrey, British Columbia, Canada).

## Preparation of nuclear and cytosolic fractions

The day before the experiment,  $3 \times 10^6$  HaCaT cells were plated in 10 cm dishes. The next day, cells were treated for 20 min, then washed once with 5 ml of PBS. Cells were then harvested after a 10 min trypsinization step, transferred to a clean tube and centrifuged for 5 min (3000 rpm) at 4°C. Supernatants were discarded and cell pellets resuspended in 400  $\mu$ L of Nuclear Fractionation Buffer (NFB; 10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 1 protease inhibitor cocktail tablet (Sigma)). Cell suspensions were passed through a 28-gauge needle and stirred on a rotator 15 min at 4°C. A volume of 40  $\mu$ L was collected from each sample for the total cell extract. The lysates were centrifuged for 5 min (3000 rpm) at 4°C. Supernatants containing the cytoplasmic fraction were recovered. Nuclei pellets were washed once in 500  $\mu$ L of NFB and resuspended in 100  $\mu$ L of NFB adjusted to 420 mM NaCl. Nuclei fractions were sonicated on ice for 15 s using a Sonic Dismembrator F60 (Fischer Scientific).

## RNA interference and lentivirus production

Plasmids coding for shRNAs targeting *AHR* mRNA (Gene ID: 196) were obtained from Sigma (shAHR #54 (TRCN0000021254) and shAHR #286 (TRCN0000021258)). The day before the transfection,  $6 \times 10^5$  293T cells were



plated in each well of a 6-well plate and were grown overnight. The lentiviruses were produced by PEI transfection of the 293T cells with 1.8 µg of pMD2.G (Addgene, #12259), 0.2 µg of psPAX2 (Addgene, #12260) and 2.0 µg of the plasmid coding for the shRNA. The lentiviruses were harvested after 48 h and incubated on HaCaT cells overnight with 10 µg/mL of Polybrene® (Sigma). Transduced cells were selected for 72 h with 1 µg/mL puromycin. *AHR* knockdown was confirmed by RT-qPCR and Western blot analysis.

### RNA isolation and quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

The day before the experiment,  $6 \times 10^5$  HaCaT cells/well were plated in 6-well plates. After treatments, HaCaT cells were washed once in PBS and lysed in 700 µL of TRI Reagent (Sigma). Total RNA was extracted and treated with DNase I (Sigma) following the manufacturer's instructions. Then, 500 ng RNAs was reverse-transcribed with M-Mulv (NEB) using a mix of random primers and oligo(dT) and resuspended in ultrapure water to a total volume of 200 µL. For each qPCR reaction, 2 µL of cDNA was added in a final reaction mixture of 10 µL, containing 5 µL of 2x iTAQ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) and 500 nM of primers (IDT, Coralville, IA). Real-time quantitative PCR was performed on a CFX96 system (Bio-Rad). The PCR protocol was an initial 30 sec denaturation step at 95°C, 40 cycles of [5 sec at 95°C, 30 sec at 60°C] and a final dissociation curve to control the specificity of the amplification. Relative mRNA levels were normalized to *U6*.

The primers used for qPCR amplification were designed using Primer3. The primers used were: *IL-6* forward, 5'-GTAGCCGCCCCACACAGA-3', reverse, 5'-CATGTCTCCTTTCTCAGGGCTG-3'; *CYP1A1* forward, 5'-CTTCGTCCCCTTCACCATC-3', reverse, 5'-TCAGGTAGGAACTCAGATGGG-3'; *CYP1B1* forward, 5'-AACCGCAACTTCAGCAACTT-3', reverse, 5'-GAGGATAAAGGCGTCCATCA-3'; *AHR* forward, 5'-ATACCGAAGACCGAGCTGAA-3', reverse, 5'-CTACTGTCTGGGGGAGACCA-3'; *U6* forward, 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', reverse, 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'.

## Enzyme-linked immunosorbent assay

The day before the experiment, 300 000 HaCaT cells were plated in 12-well plates. Cells were pretreated for 1 h with either the excipient (DMSO), PcAU-1036 (10  $\mu$ M), CH223191 (5  $\mu$ M), TCDD (10  $\mu$ M) or FICZ (5  $\mu$ M), alone or in combination and then incubated with IL-17A (100 ng/mL) and TNF $\alpha$  (10 ng/mL) for 6 h. IL-6 release was measured in the cell culture medium by ELISA using the Human IL-6 DuoSet ELISA kit from R&D systems (DY206).

## Western blot analysis

To evaluate the level of AHR protein, 30  $\mu$ g of each total protein extract, boiled in Laemmli buffer for 5 min at 95°C, were resolved by electrophoresis on 7% SDS-PAGE gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked in 5% nonfat dry milk followed by an overnight incubation with the primary antibody at 4°C and a 1 h incubation with the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Proteins were visualized using the Western Lightning Plus-ECL detection kit (PerkinElmer). Image acquisition was made with a Fusion FX7 system (Vilber Lourmat) and bands were quantified with ImageJ (NIH).

## Statistical analysis

RT-qPCR experiments were performed in triplicates and ELISA performed in duplicates. Each experiment was repeated at least three times ( $n = 3$ ). Results are presented as means  $\pm$  SD. Statistical significance between two conditions was calculated by doing an unpaired, two-tailed, Student's *t*-test. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

## 2.6 Results

### PcAU-1036 prevents TCDD- but not FICZ-induced nuclear translocation of AHR

The AHR receptor is a xenobiotic-sensing receptor that translocates from the cytosol to the nucleus to induce the expression of Phase I and II detoxifying genes (4). To determine if PcAU-1036 (see structure in Figure 2.1) could affect AHR compartmentalization, we performed immunofluorescence experiments. HaCaT cells were treated for 20 minutes with TCDD, FICZ, CH223191 or PcAU-1036, alone or in combination. A 20-minute treatment was chosen because we observed by Western Blot a significant degradation of AHR in TCDD- or FICZ-treated cells at a later stage. It is known that the proteasome starts degrading AHR as soon as 30 minutes after its exposure to an agonist (29). As seen in Figure 2.2A, the AHR agonists TCDD and FICZ promoted its nuclear translocation, while we could not detect any effect of CH223191 or PcAU-1036 on AHR localization. TCDD-induced nuclear translocation of AHR was strongly inhibited by CH223191, as previously demonstrated (16,30). Co-incubation of PcAU-1036 with TCDD also affected its nuclear localization, but to a lesser extent. Importantly, PcATU-1052, a bioisosteric thiourea counterpart of PcAU-1036 (see structures in Figure 2.1), did not affect AHR translocation (Figure S2.1).

Immunofluorescence results were confirmed using a subcellular fractionation approach. After treatment, cells were harvested and total, nuclear and cytoplasmic extracts were prepared and analyzed by Western blot. The purity of the extracts was confirmed with the nuclear marker HDAC1 and the cytosolic marker vinculin. As shown in Figure 2.2B-D, CH223191 and PcAU-1036 alone did not affect the location of AHR compared to control cells, this protein being virtually absent from nuclei under non-stimulatory conditions, whereas TCDD and FICZ induce both a nuclear accumulation of AHR (5.20- and 5.33-fold respectively) and, in parallel, a decrease in its cytoplasmic level (0.37- and 0.50-fold respectively). The addition of CH223191 to TCDD treatment significantly reduces the level of AHR in nuclear extracts. PcAU-1036 also reduced, to a lesser extent, the nuclear levels of AHR in the TCDD

condition. Finally, co-incubation of FICZ with CH223101 or PcAU-1036 did not affect the nuclear content of the AHR with levels similar to those found in cells treated with FICZ alone. These experiments demonstrate that PcAU-1036 is an antagonist of TCDD- but not FICZ-induced AHR nuclear translocation.

### PcAU-1036 inhibits the basal and TCDD-induced expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*

AHR is a transcription factor that regulates the expression of several genes. To determine if PcAU-1036 affects the transcriptional activity of AHR, we measured the expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*. The expression of *CYP1A1* and *CYP1B1* allows efficient evaluation of AHR transcriptional activity, as these genes are rapidly induced by AHR agonists in a dose-dependent manner (31–33). As illustrated in Figures 2.3A and B, CH223191 reduced *CYP1A1* and *CYP1B1* mRNA levels by 17 and 32-fold, respectively, while PcAU-1036 reduced their expression by 8 and 6-fold. As expected, stimulation of HaCaT cells with TCDD or FICZ increased *CYP1A1* and *CYP1B1* expression by 13 and 6-fold, respectively. CH223191 abolished the TCDD-induced upregulation of both genes. PcAU-1036 significantly reduced but did not totally abrogate the upregulation of *CYP1A1* and *CYP1B1* after TCDD treatment. CH223191 or PcAU-1036 did not affect FICZ-induced *CYP1A1* and *CYP1B1* expression. These observations corroborate the results presented in Figure 2.2 and demonstrate that PcAU-1036 affects TCDD- but not FICZ-mediated activation of the AHR pathway. In addition, these results suggest that CH223191 and PcAU-1036 modify the basal transcriptional activity of AHR.

## PcAU-1036's inhibition of IL-6 expression is blocked by FICZ but not by TCDD

We demonstrated that PcAU-1036 is a potent inhibitor of IL-6 expression (28). We therefore studied the effects of PcAU-1036, CH223191, TCDD and FICZ on the expression of this pro-inflammatory cytokine. As shown in Figure 2.4A, expression of *IL-6* was increased by 6 in HaCaT cells stimulated by cytokines IL-17A and TNF $\alpha$ . In cells treated with TCDD or FICZ and cytokines, the expression of *IL-6* increased by nearly 8-fold compared to unstimulated cells. One-hour pretreatment with CH223191 or PcAU-1036 lowered the IL-17A and TNF $\alpha$ -induced expression of *IL-6* by 50%. Treatments with agonists TCDD or FICZ further increased the expression of *IL-6* by 1.34- and 1.40-fold respectively. CH223191 and PcAU-1036 also reduced the expression of *IL-6* by 50% in HaCaT cells co-treated with TCDD, IL-17A and TNF $\alpha$ . However, pretreatment with CH223191 or PcAU-1036 in combination with FICZ showed no inhibitory effect on *IL-6* expression. As shown in Figure 2.4B, similar results were obtained when IL-6 was measured by ELISA in the extracellular medium of HaCaT cells. These results confirm that PcAU-1036 hinders the effects of TCDD, but not those of FICZ. In addition, we have shown that AHR agonists positively regulate the expression of *IL-6*, while its antagonists show the opposite effect.

## Implication of AHR in PcAU-1036-mediated inhibition of *IL-6* expression

To evaluate the role of AHR in the inhibition of *IL-6* expression by PcAU-1036, we knocked down that protein in HaCaT cells using shRNAs. To reduce putative off-target effects, *AHR* mRNA was targeted with two different shRNAs, and a scrambled control shRNA was used. As shown in Figures 2.5A and 2.5B, shRNA # 54 (HaCaT<sup>#54</sup>) reduced *AHR* mRNA by 54%, while shRNA # 286 (HaCaT<sup>#286</sup>) produced a 75% knockdown compared to the scrambled shRNA (HaCaT<sup>scr</sup>). We then examined by Western blot whether these knockdowns were detectable at the protein level. As shown in Figure 2.5C, shRNAs # 54 and # 286 reduced AHR protein levels by 50% and 92%, respectively.

Interestingly, basal and cytokine-induced expression of IL-6 were lower in HaCaT<sup>#54</sup> and HaCaT<sup>#286</sup> compared to HaCaT<sup>scr</sup> supporting a role for AHR in regulating *IL-6* expression (Figure 2.5D). In HaCaT<sup>scr</sup> cells pretreated with CH223191 and receiving IL-17A and TNF $\alpha$ , *IL-6* mRNA was reduced by 60% compared to HaCaT<sup>scr</sup> cells pretreated with the vehicle only, as observed for wild-type HaCaT cells (Figure 2.4A). In HaCaT<sup>#54</sup> cells, pretreatment with CH223191 alone decreased *IL-6* expression by 18% while for HaCaT<sup>#286</sup> cells, the decrease was 20% showing that AHR is involved in CH223191-mediated inhibition of *IL-6* expression. Pretreating HaCaT<sup>scr</sup> cells with PcAU-1036 reduced *IL-6* mRNA expression by 60% as obtained with CH223191. As seen with CH223191, PcAU-1036 only partially inhibited *IL-6* mRNA expression in HaCaT<sup>#54</sup> (30%) and HaCaT<sup>#286</sup> (20%) cells. These results support a role for AHR in *IL-6* regulation, at least in the model tested. In addition, this data demonstrates that AHR is involved in the inhibition of IL-6 expression by CH223191 and PAU-1036.

## 2.7 Discussion

We initially identified and characterized PcAUs as a family of small-molecule drugs that inhibits IL-6 expression in human keratinocytes (28). IL-6 is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine and a promising therapeutic target since it is upregulated in multiple autoimmune diseases such as psoriasis, Crohn's disease and rheumatoid arthritis (34–37). PcAUs could serve as a molecular model for the development of new anti-inflammatory drugs. However, the mechanism of action underlying their effect on IL-6 expression was unknown. Hence, we investigated the molecular mechanism of action of PcAU-1036, the most potent IL-6 inhibitor among our PcAU chemolibrary (28). Here, we report that the AHR pathway is strongly implicated in PcAU-1036-mediated inhibition of *IL-6* expression.

HAHs and PAHs are the most studied high-affinity AHR agonists (38). While members of the HAH and PAH families all interact with the only known AHR binding pocket, their binding mechanism appears to be ligand-specific since their interaction with AHR are disrupted by the mutation of a different subset of amino acids (39). This suggests a difference in the binding mode between these two types of ligands. Although a number of AHR agonists have been identified to date, only a few antagonists are known (40). Of note, natural antagonists tend to display agonistic activities at high concentrations (41–44). The synthetic molecule CH223191 has been characterized as a pure antagonist being devoid of agonistic activity (30). This molecule can efficiently act as a competitive ligand to strongly antagonize activation of the AHR pathway by HAHs and also by PAHs albeit, at higher concentrations (16,45).

AHR is a protein normally found in the cytoplasm, but when bound to an agonist, it migrates to the nucleus to induce the transcription of genes such as *CYP1A1* and *CYP1B1* (20). Our results show that CH223191 efficiently antagonizes TCDD- but not FICZ-induced nuclear accumulation of AHR. These results corroborate previous studies indicating that CH223191 suppresses AHR nuclear accumulation in presence of TCDD, but not in the presence of beta-naphthoflavone,

a PAH (16). PcAU-1036 also reduced the level of AHR in the nucleus when cells were treated with TCDD but was not effective when these received FICZ as it was observed with CH223191. At a concentration of 10  $\mu$ M, PcAU-1036 was found to be less effective at inhibiting nuclear translocation of AHR than 5  $\mu$ M CH223191. Although PcAU-1036 had a maximal effect on IL-6 inhibition at 100  $\mu$ M (Figure S2.2), we elected to use the molecule at 10  $\mu$ M because this concentration offers a strong and constant inhibition of *IL-6* expression while exerting a minimal antiproliferative effect on HaCaT cells ( $IG_{50}$  = 48  $\mu$ M) (28). The lower potency of PcAU-1036 over CH223191 may be related, among other things, to lower affinity of the compound for AHR or lower bioavailability due to faster degradation. Nevertheless, PcAU-1036 could serve as a basis for the development of more potent molecules. Similar to CH223191, PcAU-1036 did not induce nuclear accumulation of AHR, suggesting that it lacks agonistic activity at the concentration tested.

So far, AHR has not been crystallized successfully, preventing *in silico* docking analyses with our molecules. Moreover, *in vitro* direct binding assays are not readily available and commercially available AHR assays are based on reporter genes like luciferase, which does not indicate whether a molecule physically interacts with AHR. Although we have not been able to determine the nature of the interaction between PcAU-1036 and the AHR pathway, our results demonstrate that its molecular structure is important for its effect on AHR as its bioisostere, PcATU-1052, did not affect AHR nuclear translocation following TCDD treatment. Bioisosteric PcATU-1052 thiourea differs from the urea by an oxygen to sulfur substitution on the carbonyl (-N-C(O)-N-) of the urea moiety (Figure 2.1). Interestingly, we have previously shown that PcATU-1052 does not significantly inhibit IL-6 expression (28) adding to the evidence that the AHR pathway is linked to *IL-6* regulation.

In the nucleus, AHR forms a heterodimer with ARNT to drive the expression of various genes including Phase I and II detoxification genes such as *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* and *UGTA16* (12,20,46–48). Activation of the AHR pathway



leads, among other things, to the modification of dioxins and in a feedback inhibition of AHR activity (49). In addition to its role in detoxification, basal AHR activity may be required for normal function as *Ahr* KO mice demonstrate a higher mortality rate and the occurrence of age-related lesions in several organs (50). The basal function of AHR is likely induced by weak endogenous agonists, such as arachidonic acid, heme and/or tryptophan metabolites (51). Studies that first characterized CH223191 reported no effects of the molecule on the basal transcriptional activity of AHR using luciferase reporter gene and EROD assays (45). Although we were unable to detect an effect on the localization of AHR, our results show that CH223191 and PcAU-1036 alone significantly reduce the expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*. This might be due to a lack of sensitivity of our methods to detect low levels of AHR translocation. In view of these results, it seems likely that CH223191 and PcAU-1036 inhibit AHR nuclear translocation induced by weak endogenous agonists and, consequently, downregulates the constitutive expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*. We cannot, however, exclude the possibility that the effect mediated by CH223191 and PcAU-1036 in absence of TCDD or FICZ could be independent of AHR. Interestingly, PcAU-1036 and CH223191 could not down-regulate FICZ-induced *CYP1A1* and *CYP1B1* expression, which correlates with their inability to inhibit FICZ-induced AHR nuclear translocation.

We previously reported that PcAU-1036 decreases IL-6 expression in IL-17A and TNF $\alpha$ -stimulated human keratinocytes (28). Multiple chromatin immunoprecipitation experiments found that AHR binds to the promoter region of *IL-6* on nonconsensus dioxin response elements (26,52–54). One particular study found in MCF-7 breast cancer cells multiple imperfect DRE upstream of *IL-6* promoter. They also demonstrated that coactivation of the AHR and NF-kB pathways with TCDD and IL-1 $\beta$  act synergistically to release the HDAC1 and HDAC3 co-repressor complexes from *IL-6* promoter (54). Another study performed with head and neck tumor cells found that AHR is present on *IL-6* promoters and supports the recruitment of co-activators to regulate basal and induced expression of *IL-6* mRNA (55). In agreement with these studies, we found that the addition of TCDD and FICZ

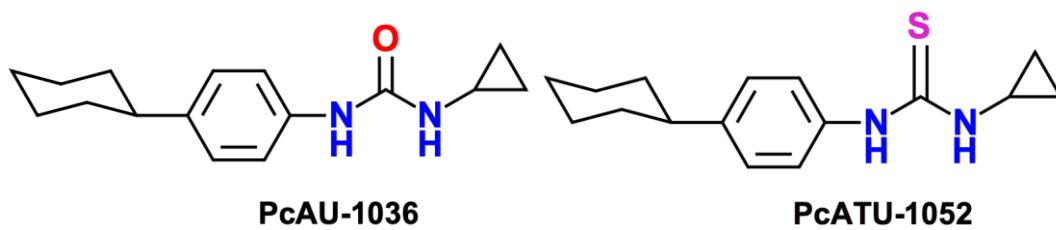
on HaCaT cells treated with IL-17A and TNF $\alpha$  further increased *IL-6* expression. In addition, antagonizing the AHR pathway with CH223191 and PcAU-1036 showed the opposite effect. PcAU-1036 and CH223191 both affected *IL-6* expression when cells were treated with TCDD, but not with FICZ. Interestingly, PcATU-1052, which does not affect AHR translocation, is a poor *IL-6* inhibitor, which further substantiates a link between AHR nuclear translocation and *IL-6* expression. Altogether, these observations suggest that the regulation of the *IL-6* expression is linked to the AHR pathway.

To further investigate the link between AHR and PcAU-1036, we knocked down *AHR* using RNA interference. In line with our other observations, we found that in HaCaT<sup>#54</sup> and HaCaT<sup>#286</sup> *AHR* knockdown cells, the basal and induced levels of *IL-6* are decreased relative to HaCaT<sup>scr</sup> control cells. Downregulation of *IL-6* by CH223191 and PcAU-1036 was strongly hampered in *AHR* knockdown cells but was still detectable. This could be explained by residual amounts of AHR proteins in these cells or by the fact that the inhibitory effect of CH223191 and PcAU-1036 on *IL-6* expression is not solely due to AHR. The effect of PcAU-1036 being further reduced in HaCaT<sup>#286</sup> than in HaCaT<sup>#54</sup> cells, potentially due to a more efficient *AHR* KD in HaCaT<sup>#286</sup> cells, favors the former hypothesis.

## 2.8 Conclusion

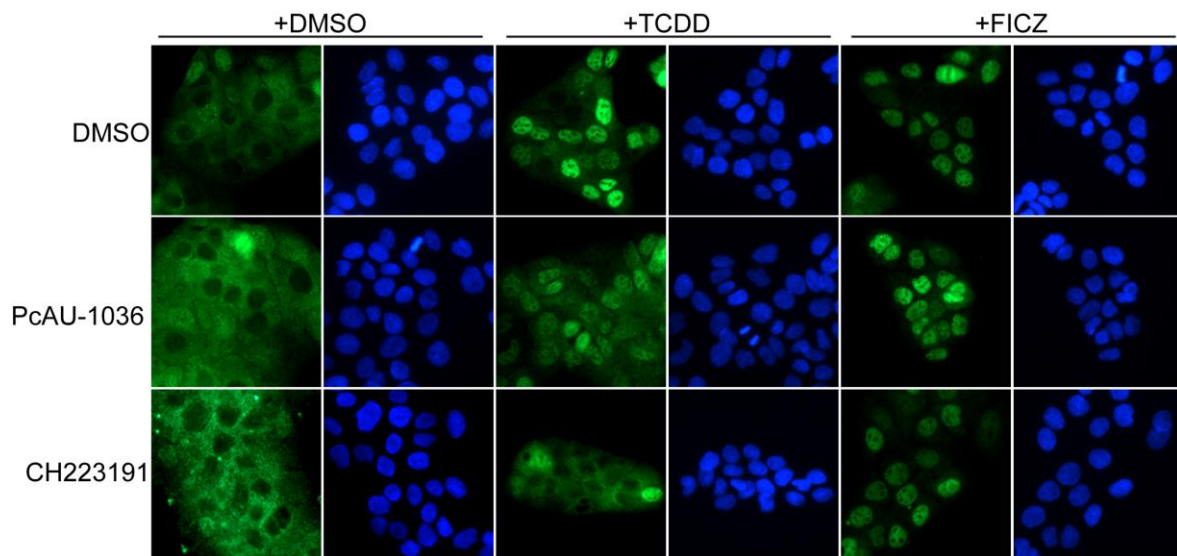
In conclusion, we have shown that the previously identified IL-6 inhibitor PcAU-1036 is a novel AHR antagonist. Similar to CH223191, PcAU-1036 antagonizes TCDD- but not FICZ-induced activation of the AHR pathway by preventing its accumulation in the nucleus and as a result, inhibits the expression of its target genes *CYP1A1* and *CYP1B1*. In addition, we found a putative link between AHR and *IL-6* regulation, since the inhibition of *IL-6* expression by PcAU-1036 strongly depends on AHR and the activation of the AHR pathway by TCDD and FICZ is correlated with increased expression of *IL-6*. However, whether PcAU-1036 directly interacts with AHR or affects the protein through an indirect pathway remains to be elucidated. AHR holds numerous cellular functions and further studies will be needed to improve our understanding of this protein. In this context, PcAU-1036 could prove to be a useful tool to achieve this goal. Furthermore, PcAU-1036 could serve as a molecular scaffold for the development of highly potent antagonists of AHR.

## 2.9 Figures and legends

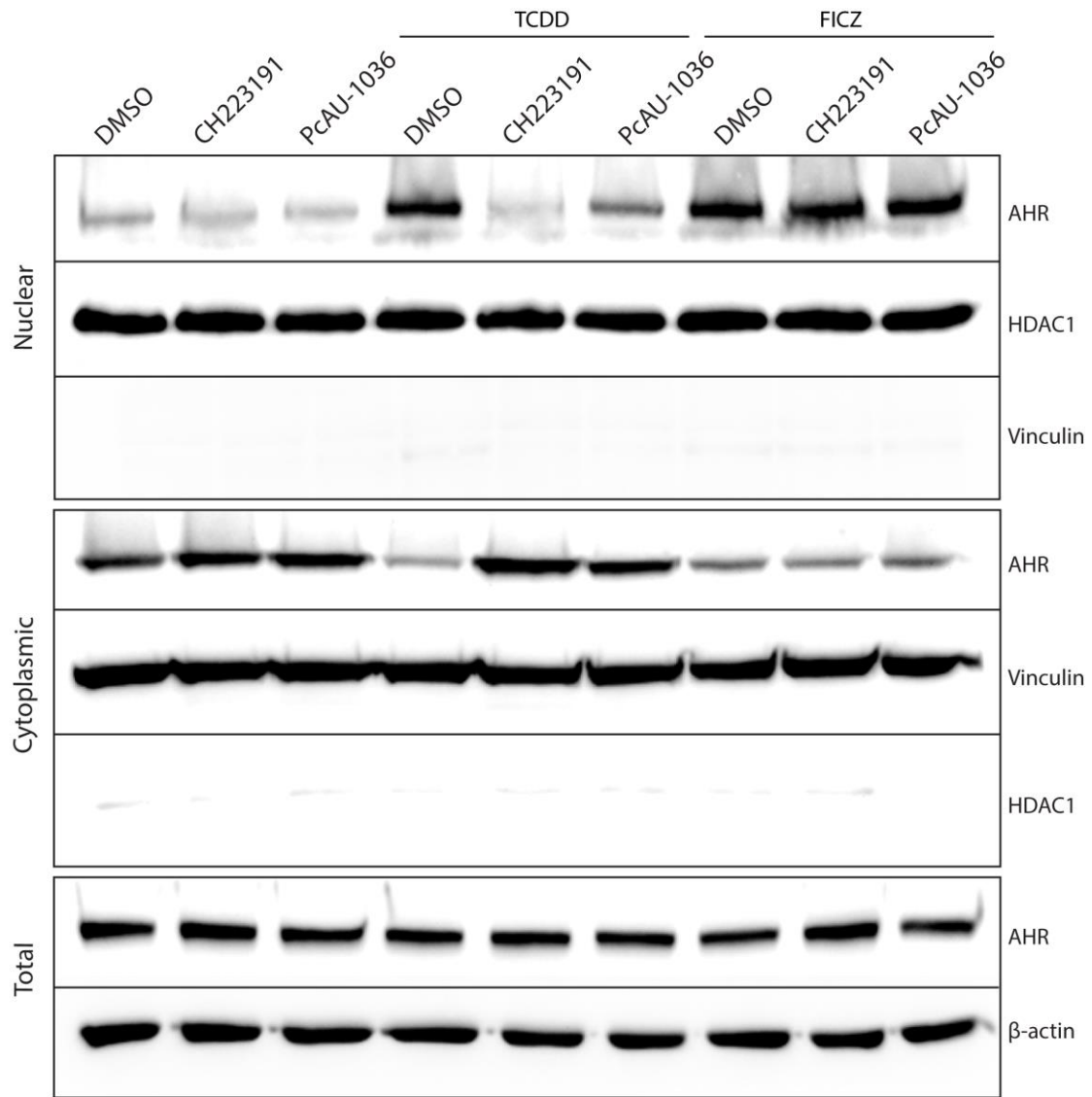


**Figure 2.1: Molecular structures of PcAU-1036 and its bioisosteric counterpart PcATU-1052.**

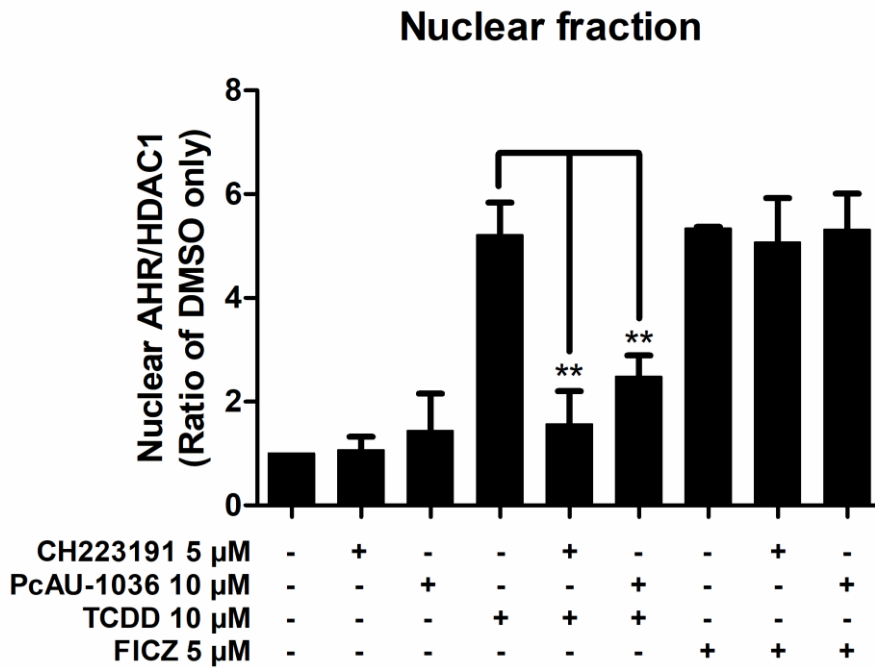
**A**



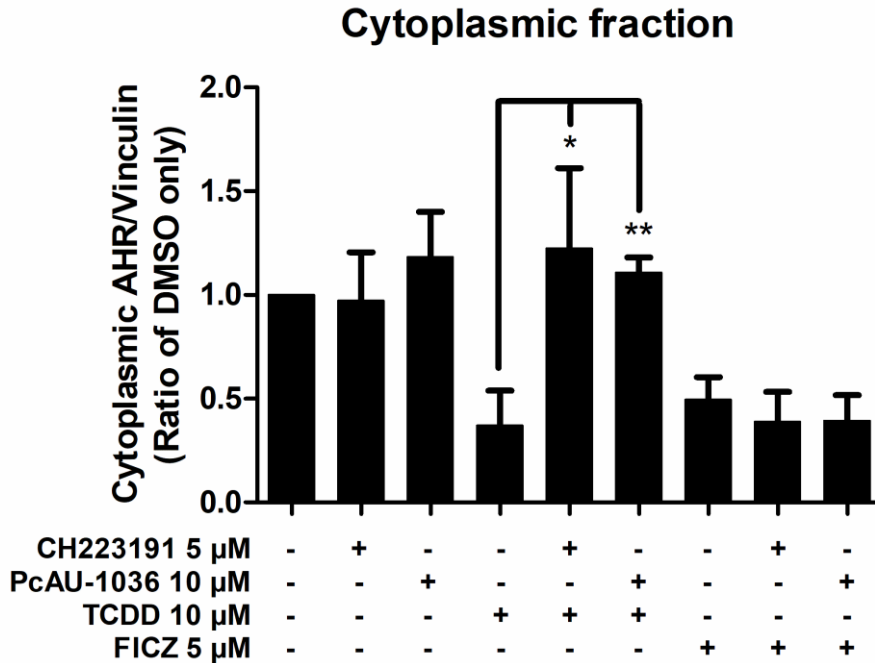
**B**



C



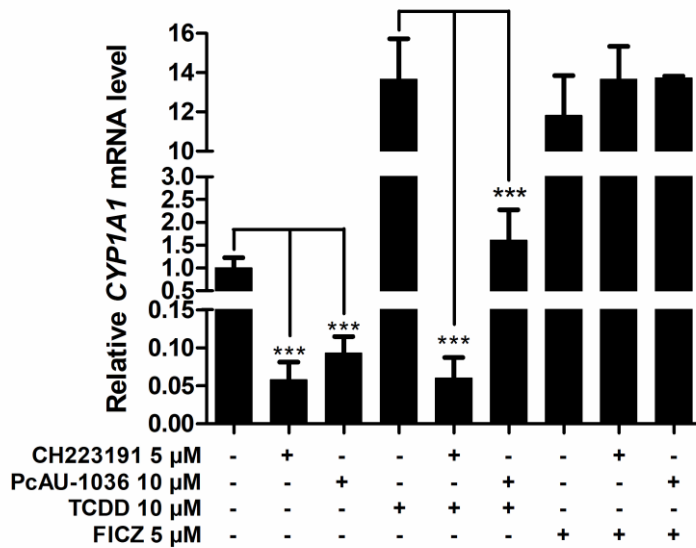
D



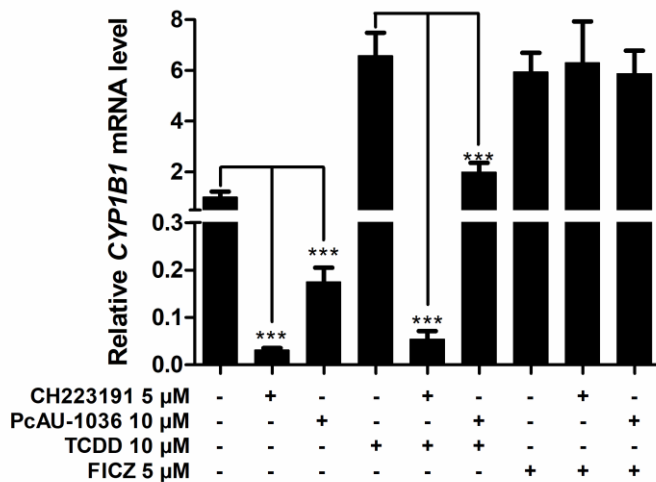
**Figure 2.2: PcAU-1036 inhibits TCDD- but not FICZ-induced enrichment of AHR in the nuclei.** HaCaT cells were treated with either PcAU-1036, CH-223191, TCDD, FICZ or in combination, for 20 min. A) Immunofluorescence staining shows AHR (in green) translocated into the nucleus after treatment with 10  $\mu$ M TCDD or 5  $\mu$ M FICZ and that co-treatments with PcAU-1036 and CH223191 inhibit TCDD- but not FICZ-mediated nuclear import AHR. DNA (in blue) was stained with DAPI. B) Cells were harvested by trypsinization. Nuclear, cytoplasmic and total extracts were prepared and analyzed by Western Blot as described in section Materials and methods. HDAC1 was used as a marker for the nuclear fractions and vinculin for the cytoplasmic fractions. C) The level of AHR in the nucleus was normalized to that of HDAC1 and was presented as a ratio of the condition with DMSO only. D) The level of AHR in the cytoplasm was normalized to that of vinculin and presented as a relative to the condition with DMSO only. The results are expressed as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .



A



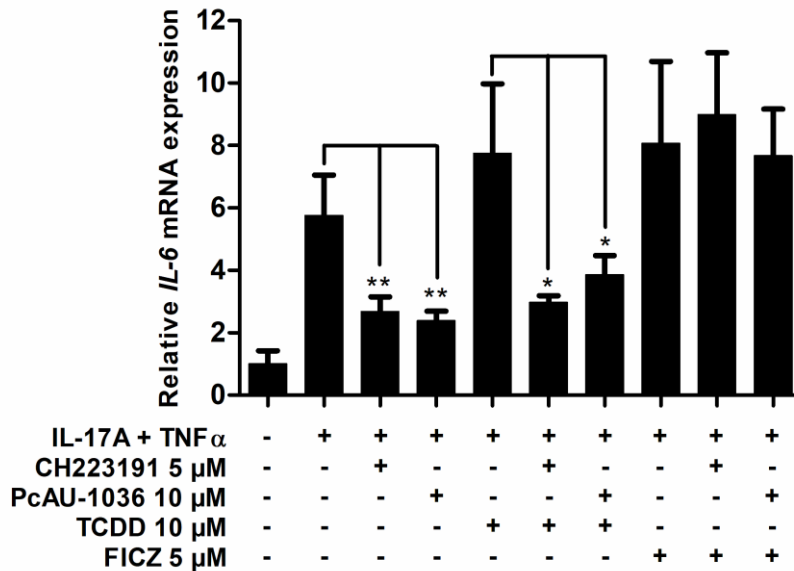
B



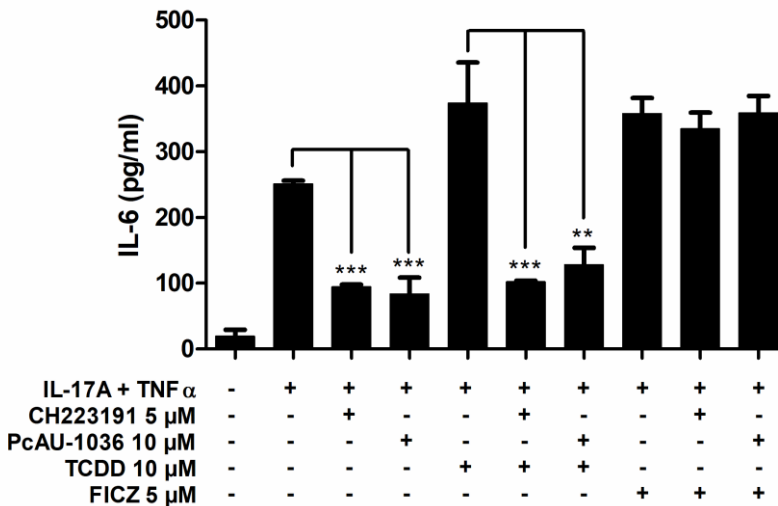
**Figure 2.3: PcAU-1036 decreases the expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*.**

HaCaT cells were treated for 6 h with either the vehicle (DMSO), 10  $\mu$ M PcAU-1036, 5  $\mu$ M CH-223191, 10  $\mu$ M TCDD, 5  $\mu$ M FICZ or in combination as indicated. The mRNA expression of A) *CYP1A1* and B) *CYP1B1* was measured by RT-qPCR and normalized to *U6*. The results are expressed as means  $\pm$  S.D. of four independent experiments. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

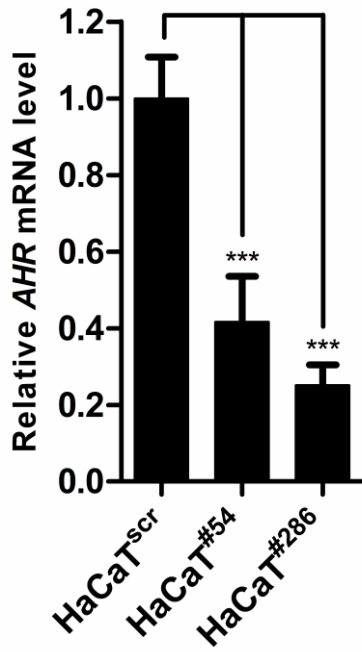
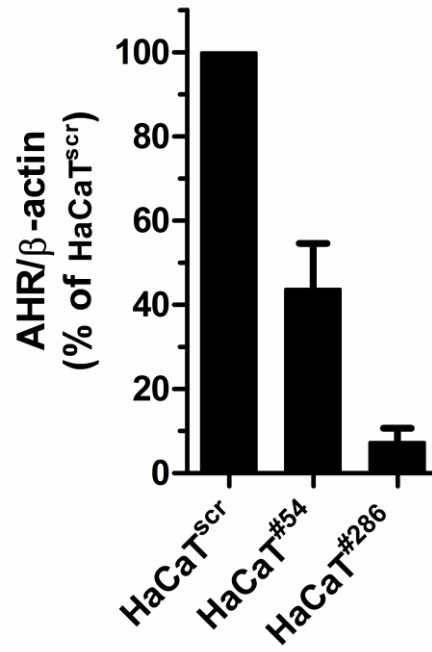
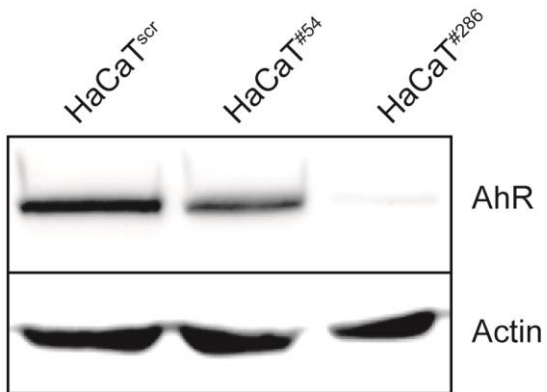
A



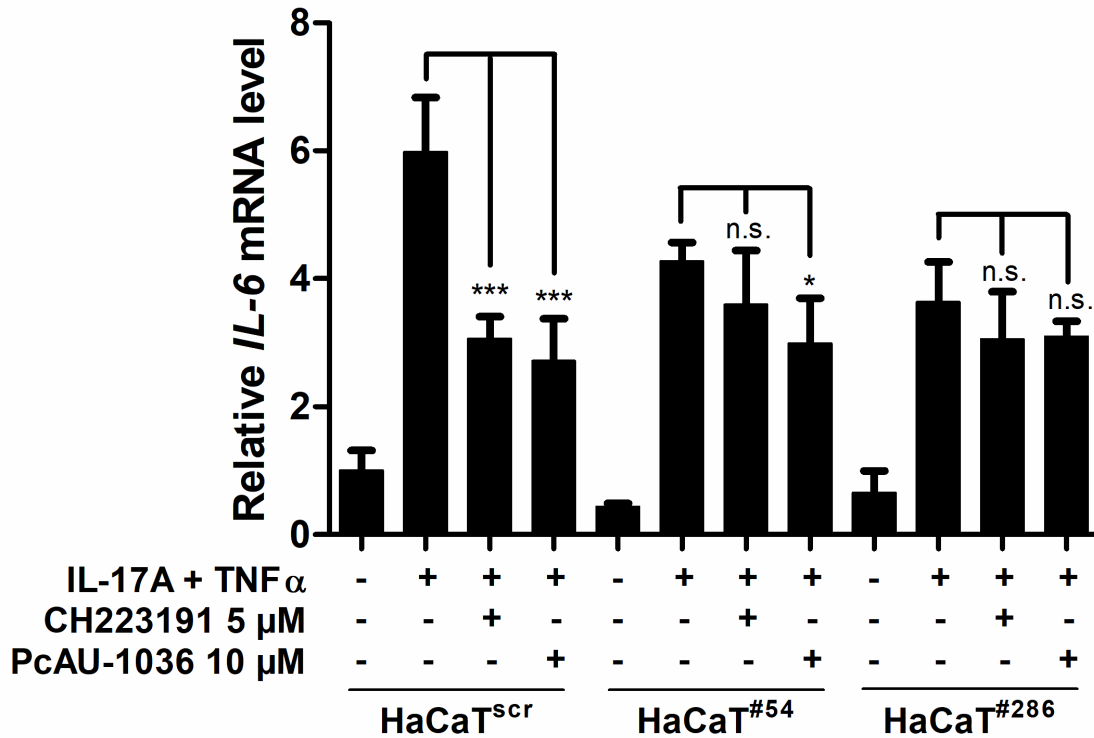
B



**Figure 2.4: PcAU-1036 partially suppresses IL-17A and TNF $\alpha$ -induced IL-6 expression and protein release.** HaCaT cells were pretreated for 1 h with either the vehicle (DMSO), 10  $\mu$ M PcAU-1036, 5  $\mu$ M CH-223191, 10  $\mu$ M TCDD, 5  $\mu$ M FICZ or in combination as indicated and stimulated with IL-17A 100 ng/mL and TNF $\alpha$  10 ng/mL for 1 h. A) Expression of *IL-6* was measured by RT-qPCR and normalized to *U6*. B) Extracellular IL-6 was measured by ELISA. The results are expressed as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

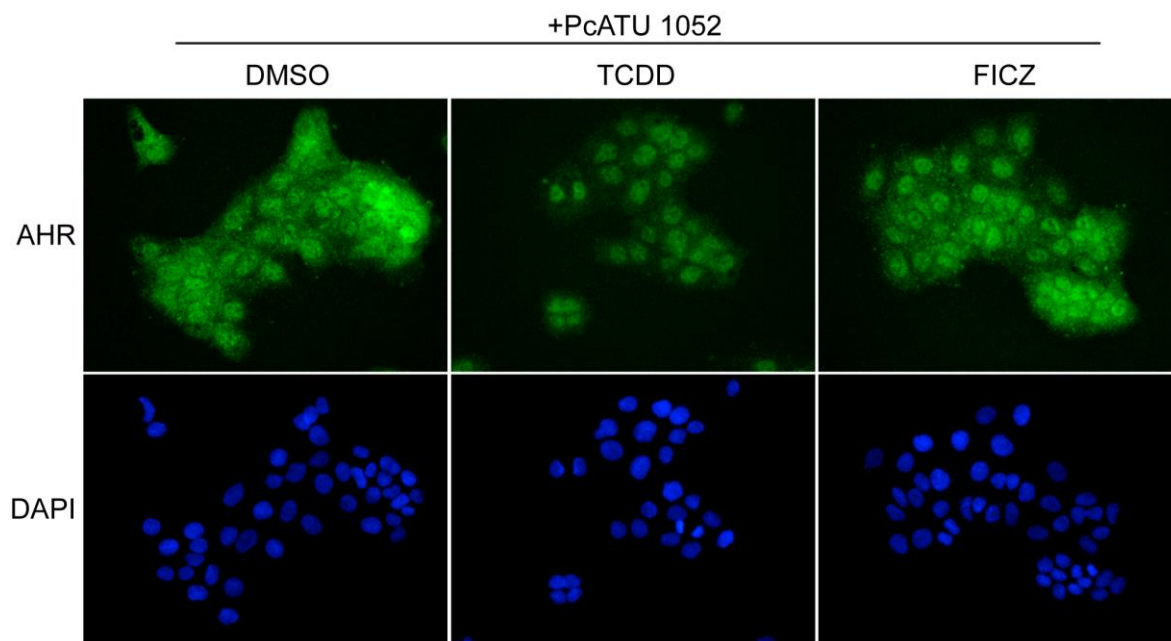
**A****B****C**

D

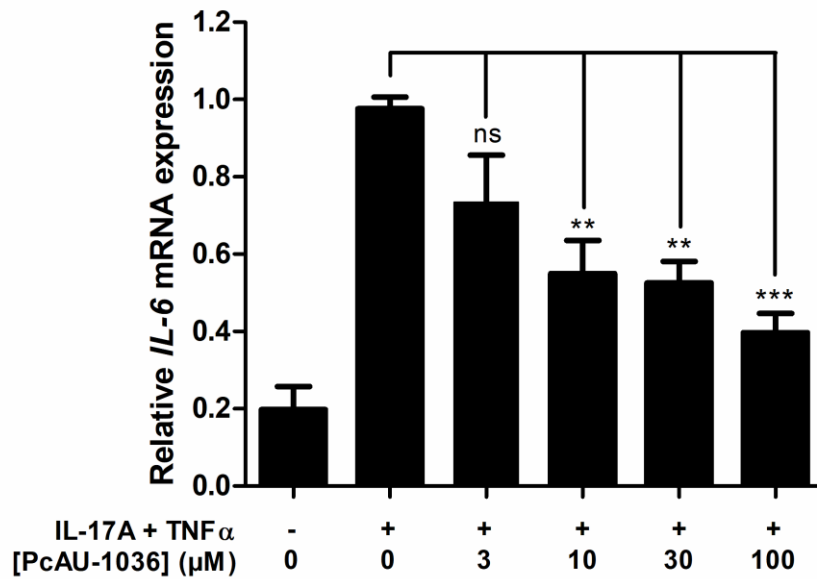


**Figure 2.5: Implication of AHR in PcAU-1036-mediated inhibition of IL-6 expression.** HaCaT cells were transduced with lentiviruses coding for shRNAs against *AHR* or a scrambled control shRNA. A) RNA interference efficiency was assessed by RT-qPCR by measuring the mRNA expression levels of *AHR* normalized to *U6*. B) RNA interference efficiency was assessed by Western Blot and densitometry by measuring the AHR protein levels normalized to  $\beta$ -actin. C) Western Blot of AHR levels in the HaCaT<sup>scr</sup>, HaCaT<sup>#54</sup> and HaCaT<sup>#286</sup> cell lines. D) Transduced cells were pretreated for 1 h with either the vehicle (DMSO), 5  $\mu$ M CH223191 or 10  $\mu$ M PcAU-1036 and stimulated for 1 h with IL-17A 100 ng/mL and TNF $\alpha$  10 ng/mL. Expression of IL-6 was measured by RT-qPCR and normalized to *U6*. The results are expressed as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

## Supplementary figures



**Figure S2.1: PcATU-1052 does not inhibit TCDD- and FICZ-induced AHR nuclear translocation.** HaCaT cells were treated with PcATU-1052 received TCDD or FICZ for 20 min. Immunofluorescence staining shows AHR (in green) translocation to the nucleus after treatment with 10  $\mu$ M TCDD or 5  $\mu$ M FICZ. DNA (in blue) was stained with DAPI.



**Figure S2.2: PcAU-1036 suppresses IL-17A and TNF $\alpha$ -induced *IL-6* expression in a dose-dependent manner.** HaCaT cells were pretreated with vehicle (DMSO) or with PcAU-1036 at the indicated concentrations for 1 h and stimulated with IL-17A 100 ng/mL and TNF $\alpha$  10 ng/mL for 1 h. Expression of *IL-6* was measured by RT-qPCR and normalized to *U6*. The results are expressed as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

## 2.10 References

1. Perdew GH. Association of the Ah Receptor with the 90-kDa Heat Shock Protein\*. *J Biol Chem*. 1988;263(27):13802-6.
2. Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity. *Mol Cell Biol*. 1998;18(2):978-88.
3. Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13519-24.
4. Jones KW, Whitlock JP. Functional analysis of the transcriptional promoter for the CYP1A1 gene. *Mol Cell Biol*. 2015;10(10):5098-105.
5. Wo YYP, Stewart J, Greenlee WF. Functional analysis of the promoter for the human CYP1B1 gene. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26702-7.
6. Denison MS; Whitlock J. Xenobiotic-inducible Transcription of Cytochrome P450 Genes. *J Biol Chem*. 1995;270(31):18175-8.
7. Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*. 1999;13(1):20-5.
8. Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, et al. Structure and Expression of the Ah Receptor Repressor Gene. *J Biol Chem*. 2001;276(35):33101-10.
9. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28708-15.
10. Denison MS, Heath-Pagliuso S. The Ah receptor: A regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998;61(5):557-68.
11. Poland A, Knutson JC. Halogenated Aromatic Hydrocarbons : Examination of the Mechanism of Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:517-54.
12. Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:307-40.
13. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43(1):309-34.
14. Safe S, Han H, Goldsby J, Mohankumar K, Chapkin RS. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligands as selective AhR modulators: Genomic studies. *Curr Opin Toxicol*. 2018;11-12:10-20.
15. Bohonowych J, Denison M. Persistent binding of ligands to the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci*. 2007;98(1):99-109.
16. Zhao B, DeGroot DE, Hayashi A, He G, Denison MS. Ch223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (dioxin) receptor. *Toxicol Sci*. 2010;117(2):393-403.
17. Mohammadi-Bardbori A, Omid M, Arabnezhad M-R. Impact of CH223191-induced mitochondrial dysfunction on its aryl hydrocarbon receptor agonistic and antagonistic activities. *Chem Res Toxicol*. 2019;32(4):691-7.

18. DiMeglio P, Duarte JH, Ahlfors H, Owens ND, Li Y, Villanova F, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity*. 2014;40(6):989-1001.
19. Esser C, Rannug A. The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. *Pharmacol Rev*. 2015;67(2):259-79.
20. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. 2018;7:1-9.
21. Wong T, Hsu L, Liao W. Phototherapy in Psoriasis: A Review of Mechanisms of Action. *J Cutan Med Surg*. 2012;17(1):6-12.
22. Van Den Bogaard EH, Bergboer JGM, Vonk-Bergers M, Van Vlijmen-Willems IMJJ, Hato S V., Van Der Valk PGM, et al. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 2013;123(2):917-27.
23. Hönigsmann H. History of phototherapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12:16-21.
24. Kiyomatsu-Oda M, Uchi H, Morino-Koga S, Furue M. Protective role of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2018;90(3):284-94.
25. Hollingshead BDBD, Beischlag TVTV, DiNatale BCBC, Ramadoss P, Perdew GHGH. Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Res*. 2008;68(10):3609.
26. Chen PH, Chang H, Chang JT, Lin P. Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer. *Oncogene*. 2012;31(20):2555-65.
27. Kim MJ, Barouki R, Clément K, Forest C, Guyot E, Benelli C, et al. Inflammatory Pathway Genes Belong to Major Targets of Persistent Organic Pollutants in Adipose Cells. *Environ Health Perspect*. 2012;120(4):508-14.
28. Tremblay S, Boutin J, Perreault M, Gobeil S, C-Gaudreault R. Synthesis and evaluation of substituted phenyl cycloalkylureas and bioisosteres as IL-6 expression inhibitors. *Med Chem Res*. 2020;
29. Pollenz RS, Buggy C. Ligand-dependent and -independent degradation of the human aryl hydrocarbon receptor (hAHR) in cell culture models. *Chem Biol Interact*. 2006;164(1-2):49-59.
30. Choi E-Y, Lee H, Dingle RWC, Kim KB, Swanson HI. Development of Novel CH223191-Based Antagonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol*. 2012;81(1):3-11.
31. Wei YD, Helleberg H, Rannug U, Rannug A. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact*. 1998;110(1-2):39-55.
32. Kim S, Dere E, Burgoon LD, Chang C, Zacharewski TR. Comparative Analysis of AhR-Mediated TCDD-Elicited Gene Expression in Human Liver Adult Stem Cells. *Toxicol Sci*. 2009;112(1):229-44.
33. Larsen MC, Angus WGR, Brake PB, Eltom SE, Sukow KA, Jefcoate CR.



- Characterization of CYP1B1 and CYP1A1 Expression in Human Mammary Receptor in Poly cyclic Epithelial Cells : Role of the Aryl Hydrocarbon Aromatic Hydrocarbon Metabolism1. *Cancer Res.* 1998;58:2366-75.
34. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(4-5):357-68.
  35. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(16):6367-71.
  36. Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Schölmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1992;102(2):514-9.
  37. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 1988;18(11):1797-802.
  38. Denison MS, Soshilov AA, He G, Degroot DE, Zhao B, Denison MS, et al. Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *Toxicol Sci.* 2011;124(1):1-22.
  39. Soshilov AA, Denison MS. Ligand Promiscuity of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists and Antagonists Revealed by Site-Directed Mutagenesis. *Mol Cell Biol.* 2014;34(9):1707-19.
  40. Parks AJ, Pollastri MP, Hahn ME, Stanford EA, Novikov O, Franks DG, et al. In Silico Identification of an Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist with Biological Activity In Vitro and In Vivo. *Mol Pharmacol.* 2014;86:593-608.
  41. Zhou J, Gasiewicz TA. 3'-Methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1a1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 2003;416(1):68-80.
  42. Zhang S, Qin C, Safe SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect.* 2003;111(16):1877-82.
  43. Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, et al. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7, 8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res.* 2002;62(19):5451-6.
  44. Chen ZH, Hurh YJ, Na HK, Kim JH, Chun YJ, Kim DH, et al. Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(10):2005-13.
  45. Kim S, Henry EC, Kim D, Kim Y, Shin KJ, Han MS, et al. Novel Compound 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic Acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) Prevents 2,3,7,8-TCDD-Induced Toxicity by Antagonizing the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol.* 2006;69(6):1871-8.
  46. Wright EJ, Castro KP De, Joshi AD, Elferink CJ. Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways *Toxicology.* *Curr*

- Opin Toxicol. 2017;2:87-92.
47. Schmohl S, Buckler F, Jaehrling J, Mu PA, Bock KW, Raschko FT, et al. Contribution of the Ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 in Caco-2 and rat hepatoma 5L cells. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:841-7.
  48. Marlowe JL, Puga A. Aryl Hydrocarbon Receptor , Cell Cycle Regulation , Toxicity , and Tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005;96(6):1174-84.
  49. Rannug A, Rannug U. The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation. *Crit Rev Toxicol.* 2018;48(7):555-74.
  50. Fernandez-Salguero P. Lesions of Aryl-Hydrocarbon Receptor-deficient Mice. *Vet Pathol.* 1997;34(6):605-14.
  51. Nguyen LP. BCA. The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(1):102-16.
  52. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med.* 2009;206(9):2027-35.
  53. Hollingshead BD, Beischlag TV, DiNatale BC, Ramadoss P, Perdew GH. Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 2008;68(10):3609.
  54. DiNatale BC, Schroeder JC, Francey LJ, Kusnadi A, Perdew GH. Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24388-97.
  55. Dinatale BC, Schroeder JC, Perdew GH. Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines Brett. 2012;50(3):173-83.

# **Chapitre 3. PcAU-1003 improves the psoriatic phenotype in a human reconstituted skin model of psoriasis and in an imiquimod-induced psoriasis mouse model**

**Joël Boutin<sup>1</sup>, Marie-France Côté<sup>1,2</sup>, Martin Perreault<sup>1</sup>, René C.-Gaudreault<sup>2,3</sup> and Stéphane Gobeil<sup>1,2</sup>**

**1** CRCHU de Québec-Université Laval, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), 2705 boulevard Laurier, Québec (Qc), G1V 4G2, Canada.

**2** CRCHU de Québec-Université Laval, Hôpital Saint-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec (Qc), G1L 3L5, Canada.

**3** Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec (Qc), G1V 0A6, Canada.

### **3.1 Avant-propos**

Ce chapitre sera éventuellement soumis pour publication. J'ai réalisé l'expérience sur les peaux psoriasiques humaines reconstituées en collaboration avec madame Marie-France Côté. J'ai fait les analyses en ELISA et en RT-qPCR tandis que Marie-France a réalisé les colorations HES, les immunomarquages et l'immunofluorescence. J'ai fait les expériences préliminaires pour mettre en place le modèle murin de psoriasis occasionné par l'imiquimod tandis que Marie-France Côté et Martin Perreault ont fait les expériences sur les souris impliquant l'application de PcAU-1003. J'ai fait une partie des figures (PASI, poids des souris, ELISA). Enfin, j'ai rédigé l'article en entier, sauf la section Matériels et méthodes qui a été écrite en collaboration avec Mme Marie-France Côté, sous la supervision de Dr Stéphane Gobeil.

## 3.2 Résumé

Le psoriasis est une maladie auto-immune chronique et récurrente qui compromet grandement la qualité de vie des patients. Nous avons précédemment rapporté que les phenyl cycloalkylurées (PcAUs) inhibent l'expression de l'IL-6, une cytokine pléiotropique ayant une forte implication dans le psoriasis. Dans la présente étude, nous avons testé le potentiel de la PcAU-1003 comme médicament anti-psoriasique sur un modèle de peaux psoriasiques reconstituées et sur un modèle murin de psoriasis provoqué par l'imiquimod. Nous démontrons tout d'abord dans le modèle de peau reconstituée que la PcAU-1003 diminue l'épaisseur de l'épiderme ainsi que l'expression du marqueur de prolifération Ki67, tout en réduisant la production de l'IL-6 après un traitement de 4 jours. Nous montrons par la suite que, dans le modèle murin de psoriasis occasionné par l'imiquimod, la PcAU-1003 améliore les symptômes psoriasiques tout en diminuant l'épaisseur de l'épiderme et l'expression de l'IL-6 et du marqueur de prolifération Ki67. De plus, la PcAU-1003 ne cause pas de toxicité chez les souris, contrairement à la dexaméthasone. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la PcAU-1003 montre du potentiel comme candidate pour le développement d'un nouveau médicament pour traiter le psoriasis.

### **3.3 Abstract**

Psoriasis is a chronic and relapsing auto-immune disease that severely compromises the quality of life. We previously reported that the phenyl cycloalkylureas (PcAUs) inhibit the expression of IL-6, a pleiotropic cytokine with strong implication in psoriasis. In this study, we tested the potential of PcAU-1003 as an antipsoriatic drug using a human reconstituted skin model of psoriasis and an imiquimod-induced psoriasis mouse model. We first demonstrate in the human skin model that PcAU-1003 decreases the thickness of the epidermis and the expression of the proliferation marker Ki67, while inhibiting the release of IL-6 after a 4-day treatment. We then show using the imiquimod-induced psoriasis mouse model that PcAU-1003 improves the psoriatic-like symptoms while decreasing the thickness of the epidermis and the expression of the proliferation marker Ki67 and IL-6. In addition, treatment with PcAU-1003 was not accompanied by toxicity in mice, unlike dexamethasone treatment. Therefore, our results suggest that PcAU-1003 holds potential as a drug candidate for the treatment of psoriasis.

### 3.4 Introduction

Psoriasis is a chronic and relapsing autoimmune disease with a prevalence of 2–3 % of the population (1). While not lethal, the pathology can severely hinder the quality of life. Psoriasis affects the epidermis, the superficial layer of the skin. Patients develop itchy and red scaly plaques primarily on their elbow, knees and scalp (2) and as much as 30% of them will also suffer from psoriatic arthritis (3). Furthermore, patients have an increased risk of depression, anxiety and suicidality (4).

The epidermis of the skin is normally made of a hierarchical succession of layers of differentiating keratinocytes. Under normal conditions, a fraction of proliferating keratinocytes in the basal layer generates the daughter cells that differentiate and migrate toward the surface to form the cornified skin. The purpose of this tight layer of cells is to protect the body from pathogens and chemical agents while preventing water and heat loss. However, epidermis in psoriatic lesions is much thicker due to the hyperproliferation of the keratinocytes (2). It is also characterized by the abnormal presence of CD4+ T cells. Intraepidermal T cells release cytokines such as IL-17A, IL-23 and TNF $\alpha$  that stimulate the inflammation, which leads to the release multiple cytokines and chemokines such as IL-6, TNF $\alpha$  and IL-8 to recruit and activate T cells (2,5,6). As a result, keratinocytes secrete cytokines such as IL-6 and TNF $\alpha$  that amplify the inflammatory loop (7).

There are many available treatments for psoriasis which are often accompanied by side effects and a loss of effectiveness overtime. For example, chronic usage of topical corticoids like dexamethasone (DXM) can cause dermal atrophy or hyperpigmentation and even systemic effects including glaucoma and hyperglycemia (8). Systemic use of cyclosporine A can lead to infections, glomerulosclerosis (hardening of the kidney), nephrotoxicity (9,10) and methotrexate treatment to myelosuppression, hepatotoxicity and pulmonary fibrosis (11). As a result, there is a need for new, safe and efficient treatments against this disease.

Human reconstituted skin models of psoriasis are becoming increasingly more prevalent as preclinical models because unlike monocultures, they allow for the interaction between the dermal fibroblasts and the epidermal keratinocytes of the epidermis. However, these models do not yet fully reproduce the complexity of the human skin because they are not vascularized and are exempt of immune cells like dendritic cells and hair follicles (12). Despite these caveats, human reconstituted skin models are useful as tools to predict drug effectiveness (13). For example, the model developed by the MatTek Corporation shows a clear dose-dependent response to the well-established antipsoriatic drug calcipotriol (14). Nonetheless, the gold standard to this day is the imiquimod-induced psoriasis-like skin. In this mouse model, inflammation is induced via the daily application of a cream containing 5% of imiquimod (IMQ) (15). This model is very interesting since it reproduces several of the symptoms present in human psoriasis and their onset is mediated via the IL-23/IL-17 axis as for human psoriasis (16).

We have synthesized and characterized a family of molecules, referred to as phenyl cycloalkylureas (PcAUs), as inhibitors of IL-6 expression in immortalized HaCaT keratinocytes (17). IL-6 is overexpressed in psoriasis and has been described to strongly induce keratinocyte hyperproliferation and to block Treg-mediated immune suppression (18–20). Considering the strong implication of IL-6 in psoriasis, we sought to determine if PcAUs could prove useful as novel anti-psoriatic drugs. In our previous study, the best PcAUs reduced IL-6 expression by more than 70% in HaCaT cells (17). Herein, we tested the antipsoriatic potential of two PcAUs, namely PcAU-1003 and PcAU-1036. We found using a human reconstituted skin model of psoriasis that PcAU-1003, but not PcAU-1036, could improve the psoriatic phenotype. Moreover, PcAU-1003 proved to be also efficient on an imiquimod-induced psoriasis mouse model. Our study strongly suggests that PcAU-1003 is a valuable candidate for the development of a safe and efficient antipsoriatic drug.



## **3.5 Materials and methods**

### **Drugs and reagents**

PcAU-1003 and PcAU-1036 were synthesized, purified and their structure were confirmed in our laboratory as described in Tremblay and al. 2020 (17). Dexamethasone and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MI). Rat monoclonal antibody against Ki67-FITC was obtained from Invitrogen-Thermo-Fisher (Burlington, On) and rabbit monoclonal antibody CK10 was obtained from Abcam (Boston, MA). DuoSet ELISA human IL-6 kit was from Cedarlane (Burlington, On). Vectastain Elite ABC HRP kit, peroxidase rabbit IgG was from Vector Laboratory (MJS Biolynx Inc, Brockville, On). Hematoxyllin-Harris and Eosine Y were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MI) and Safran du Gatinais was purchased from Chaptec (Montreal, Qc).

### **Human psoriatic skin tissues**

The human reconstituted skin model of psoriasis (SOR-300-FT) was purchased from MatTek (Ashland, MA). Reconstituted skins were handled according to the manufacturer's instructions. PcAUs freshly diluted in DMSO were directly added to the media. Every day, media was harvested and kept at -80°C until ELISA was performed and 5 mL of fresh media containing PcAUs (10 µM) or vehicle was added in each well. Final DMSO concentration did not exceed 0.5%.

### **IL-6 production inhibition**

IL-6 concentration in culture media was determined by ELISA per manufacturer's instructions. The samples were diluted 1:2 in the reagent diluent buffer provided with the ELISA kit. The experiments were conducted in duplicates. The absorbance was measured at 450 nm with a TECAN infinite M1000 plate reader.

### **Imiquimod-induced psoriasis mouse model**

Balb/C mice between 6 and 8 weeks of age were purchased from Charles-River (Senneville, Qc). The mice were kept under conventional and individually housing conditions and were fed normal stock rodent rations and tap water *ad libitum*. The backs of the mice were shaved the day before (day -1) the beginning of the treatments (day 0). Mice were randomly assigned into two groups. The treated group of mice received a topical application of 62.5 mg of 5% imiquimod cream (IMQ; Valeant, Qc) while the control group received an equal amount of cream base (Medisca, Plattsburg, NY) on their shaved skin (2 cm × 2 cm) for 6 consecutive days. In each group, 8 mice were treated, twice a day (before and after imiquimod 5% or cream base treatment) for 6 days, with 50 µL of DMSO, 2.5 mg of PcAU-1003 (dissolved in 50 µL of DMSO) or 0.25 mg of DXM (dissolved in 50 µL of DMSO) applied directly on the back of each mouse. At the end of the sixth day, mice were euthanized and their skin tissues were collected for further studies (16). The study was approved by our Institutional Animal Care and Use Committee (Comité de protection des animaux de l'Université Laval) and conducted in an animal facility approved by the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

### **Scoring severity of skin inflammation**

To evaluate the severity of the skin inflammation, an objective scoring system was developed based on the clinical Psoriasis Area and Severity Index (PASI) (16). Erythema, scaling, and thickening were scored independently on a scale from 0 to 4: 0 = none; 1 = slight; 2 = moderate; 3 = marked; 4 = very marked. The cumulative score (erythema plus scaling plus thickening) was used as a measure of inflammation severity (scale 0-12).

### **Histological analysis**

Humans and mouse tissue samples were fixed for 48 h in 2 mL of tissue fix solution (Fisher Scientific, Hampton, NH) at ambient temperature, washed with PBS 1X and store 4°C until embedded in paraffin. Tissue sections were cut at a thickness of 5 µm with a microtome (Leica, Concord, ON, Canada) and mounted on

Superfrost Microscope slides (Fisher Scientific, Hampton, NH). Afterward, paraffin was removed with toluene and graded alcohol baths. For histopathological examination, tissue slides were stained with hematoxylin, eosin and Safran (HES) (Elliot City, MD) and imaged under light microscopy (Olympus BX51, Center Valley, PA) with a Qimaging RETIGA EXi camera (Qimaging, Surrey, BC, Canada).

### **Immunofluorescence analysis**

Antigen unmasking was performed by heating the slides in 10 mM sodium citrate pH 6 in a pressure cooker followed by a 15-minute cooling phase. The slides were permeabilized with a solution of saponin (0.1% saponin and 3% (w/v) BSA in PBS) 45 min at 37°C. Slides were incubated with anti-Ki67-FITC (1:200) and anti-CK10 (1:200) in saponin solution for 2 h at room temperature and then washed 3 times with PBS supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20. Saponin solution containing goat anti-rabbit IgG conjugated to AlexaFluor 594 (1/1000) and DAPI (1:5000) (Thermo-Fisher, Burlington, On) was then added for 1 h at room temperature, then washed 5 times with PBS supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20. The slides were mounted with Fluoromount-G (Thermo-Fisher, Burlington, On). Slides were visualized using an epifluorescence microscope (Olympus BX51, Center Valley, PA) with a Qimaging RETIGA EXi camera (Qimaging, Surrey, British Columbia, Canada).

### **Immunohistochemistry analysis**

Antigen unmasking was performed by heating the slides in 10 mM sodium citrate pH 6 in a pressure cooker followed by a 15-minute cooling phase. Quenching of endogenous peroxidase activity was performed by blocking with 3% peroxide hydrogen in methanol 10 min at ambient temperature. Slides were washed 3 times in PBS 1X and the Vectastain Elite ABC HRP kit, peroxidase rabbit IgG was used as described by the supplier. DAB was used to stain the slides which were counterstain with Hematoxylin-Harris diluted 1/10.  $\alpha$ IL-6 rabbit antibody (Novus Biologicals, Oakville, ON) was used at 1:500 in PBS + 0.1% BSA buffer 2 h at ambient temperature. Sections were imaged under light microscopy

(Olympus BX51, Center Valley, PA) with a Qimaging RETIGA EXi camera (Qimaging, Surrey, British Columbia, Canada).

### **Statistical analysis**

All graphical values were expressed as means  $\pm$  SEM. Student's t-test was used to determine the statistical significance in each experiment, except for the cumulative PASI score where a two-way ANOVA was used. A  $P \leq 0.05$  value was considered significant and a  $P \leq 0.01$  value was most significant.

## **3.6 Results**

### **3.6.1 PcAU-1003 reduces epidermis proliferation and IL-6 expression in a human reconstituted skin models of psoriasis**

Treatment of the skin substitutes for 4 days with PcAU-1003 decreased the level of IL-6 in the extracellular media by 53% when compared to the controls treated with DMSO. However, treatment with PcAU-1036 only decreased IL-6 by 15% (Figure 3.1A). Histological analysis of the reconstituted skins showed that a 4-day treatment with PcAU-1003 efficiently decreased the thickness of the epidermis. Treatment with PcAU-1036 did not affect epidermis thickness when compared to DMSO (Figure 3.1B). We found cells positive for the proliferation marker Ki67 present all along the basal layer of the reconstituted skins treated with DMSO. However, in PcAU-1003 and PcAU-1036-treated skins the number of Ki67-positive cells were greatly reduced (Figure 3.1C). These results show that PcAU-1003 is more effective than PcAU-1036 at reducing the symptoms associated with psoriasis, even if both small molecules effectively decreased the number of Ki67-positive cells.

### **3.6.2 PcAU-1003 improves the PASI score and reduce skin thickening in a mouse model of psoriasis**

Based on the results obtained from the reconstituted skins, we moved forward to test PcAU-1003 in an imiquimod-induced psoriasis mouse model. This psoriasis model is widely used for preclinical studies because of its ease of use, convenience and low cost (21). DMSO was used as a negative control to evaluate the effects of the vehicle and DXM, a very potent corticosteroid, was used as a positive control. Progression of the psoriasis symptoms, as evaluated by the cumulative PASI score (increase of erythema, scaling and thickness), is presented in Figure 3.2. As expected, the PASI score increased gradually over time in mice treated with imiquimod when compared to those that received the cream base. The PASI score of the mice treated with IMQ+PcAU1003 and IMQ+DXM was systematically lower from days 3 to 6 compared to IMQ mice treated with DMSO only. PcAU-1003 can thus reduce key symptoms associated with psoriasis in a mouse model.

As seen in Figure 3.3, epidermal thickness remained unchanged between the mice that received Base+DMSO, Base+PcAU1003 and Base+DXM. However, in IMQ-treated mice, PcAU-1003 and DXM decreased the epidermal thickness by 73  $\mu\text{m}$  and 200  $\mu\text{m}$  respectively. These results show that in addition to lowering the PASI score, PcAU-1003 can reduce skin thickening, a major symptom of psoriasis.

### **3.6.3 PcAU-1003 decreases the proliferative state of the epidermis and the expression of IL-6 in a mouse model of psoriasis**

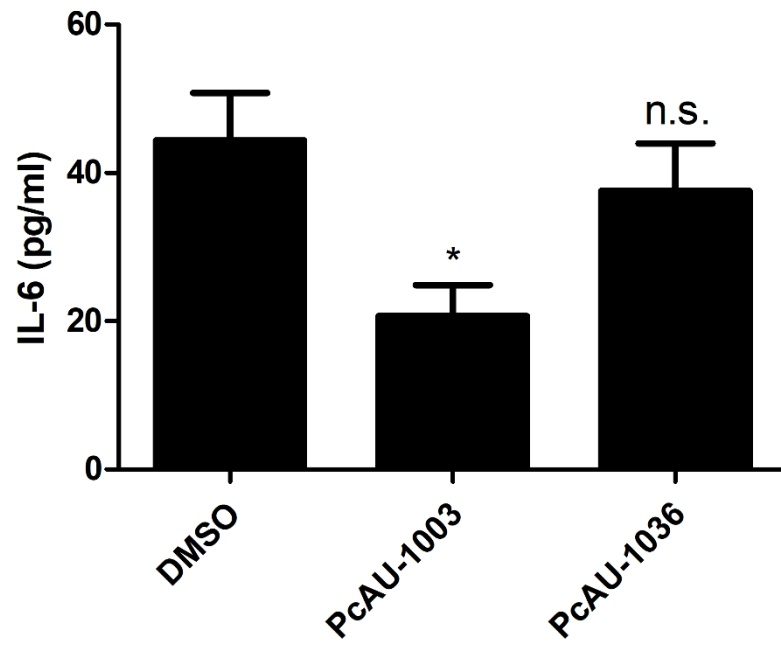
The effect of PcAU-1003 on the state of skin proliferation was evaluated by measuring the Ki67-positive cell fraction in the epidermis of mice. As seen in Figure 3.4A and 3.4B, we observed a small increase (10 to 20%) in Ki67-positive cells in the epidermis of Base+PcAU1003 and Base+DXM mice when compared to the epidermis of Base+DMSO mice. However, in the epidermis of IMQ+DMSO mice, Ki67-positive cells increased by 2.5-fold. PcAU-1003 and DXM decreased the number Ki67-positive cells in IMQ-treated mice by 1.47- and 1.34-fold, respectively. As shown in Figure 3.5, PcAU-1003 and DXM also reduced the expression of the cytokine IL-6 in the skin when compared to IMQ+DMSO mice.

### **3.6.4 Effect of PcAU-1003 total weight in a murine model of psoriasis**

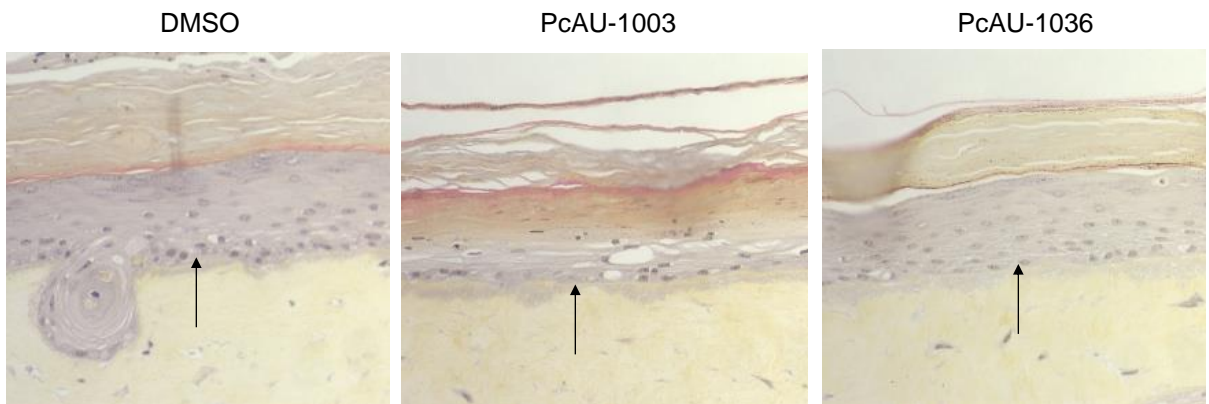
To verify the innocuity of PcAU-1003, we weighed the mice at the end of the treatment. As shown in Figure 3.6A, the weight of Base+DMSO and Base+PcAU1003 mice remained stable, but Base+DXM mice lost on average 13% of their weight over the duration of the treatment. The IMQ+DMSO and IMQ+PcAU1003 mice also lost 13% of the weight, while the IMQ+DXM mice showed a weight loss of 17%. However, this last result would normally be higher since 3 IMQ+DXM mice had to be euthanized due to excessive weight loss. These results suggest that PcAU-1003 shows no toxicity under the conditions tested, unlike dexamethasone which is known to severely affect organ growth (22).

### 3.7 Figures

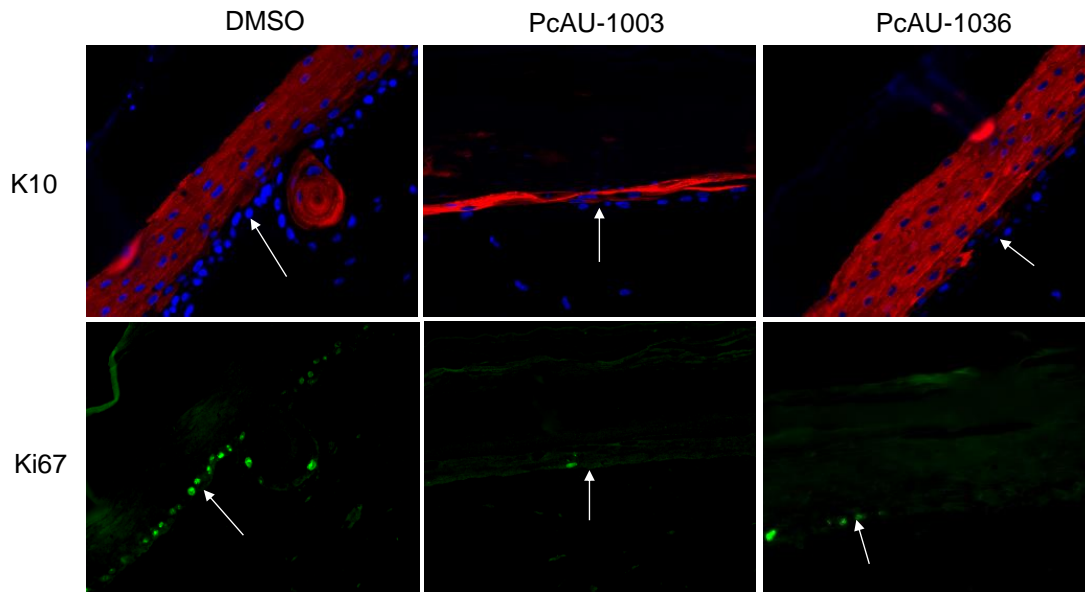
A)



B)

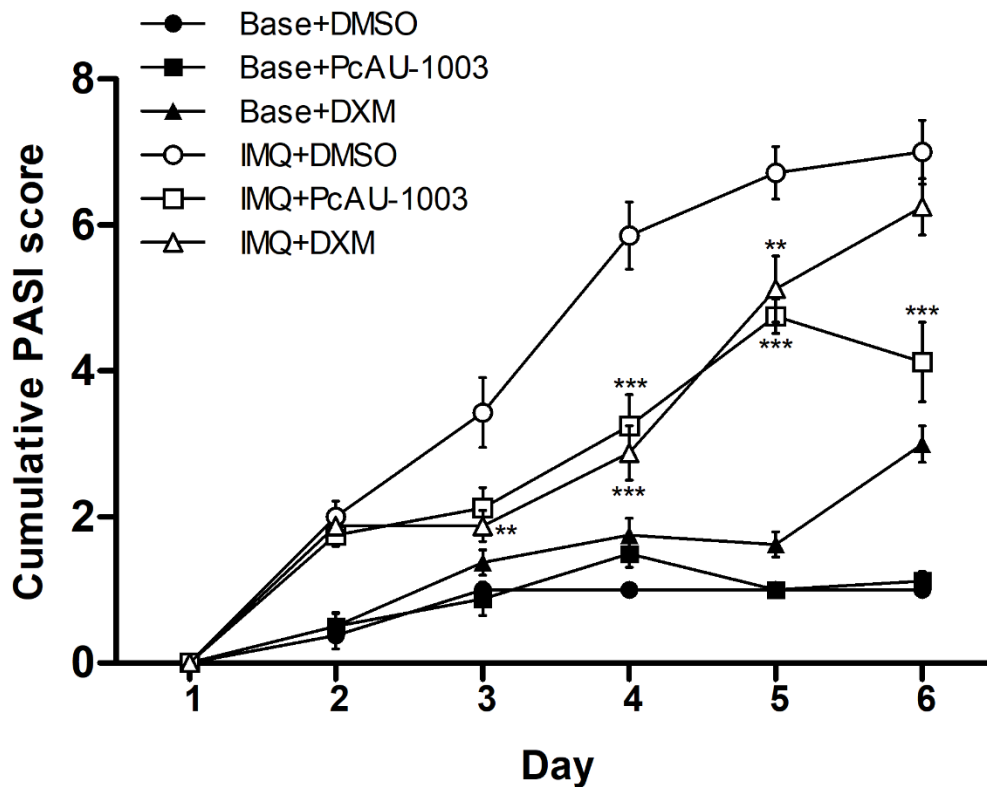


C)



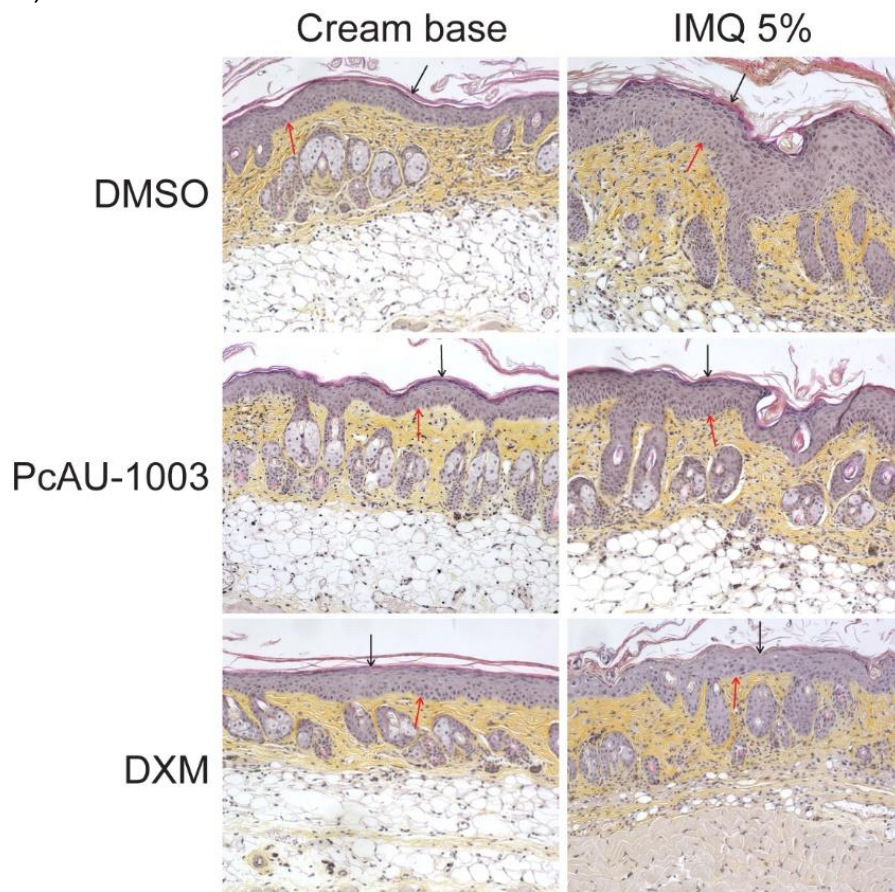
**Figure 3.1: PcAU-1003 demonstrates antipsoriatic properties in a human reconstituted skin model of psoriasis.** Reconstituted psoriatic skins were treated with PcAU-1003 (10  $\mu$ M), PcAU-1036 (10  $\mu$ M) or the vehicle control for 4 days. A) Measurement of IL-6 in the extracellular medium of the human reconstituted psoriatic skins by ELISA. B) HES staining of reconstituted psoriatic skin sections. Black arrows indicate the epidermis, stained in purple. Images at 200X. C) Immunolabeling of the differentiation marker keratin 10 (red) and the proliferation marker Ki67 (green) observed by fluorescence microscopy. The cell nuclei are blue (DAPI). White arrows indicate the basal layer of the epidermis. Images (200X). Data are mean values ( $n = 4$ )  $\pm$  S.E.M. \*,  $P \leq 0.05$  vs DMSO treated skins.



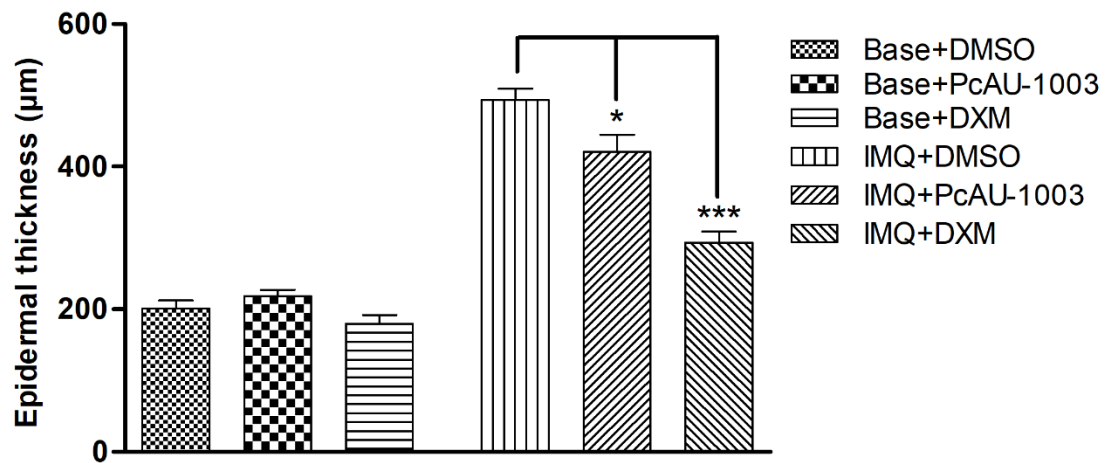


**Figure 3.2: PcAU-1003 decreases the severity of the psoriatic symptoms in the IMQ-induced psoriasis mouse model.** The thickness, redness and scaling of the mice from each group were evaluated daily and attributed a score (0 to 4). The cumulative score of the three symptoms is shown for each day and each group of mice. The data are shown as mean values of cumulative scores (redness + scaling + thickness) ( $n = 8$ )  $\pm$  S.E.M. \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$  vs IMQ+DMSO group.

A)

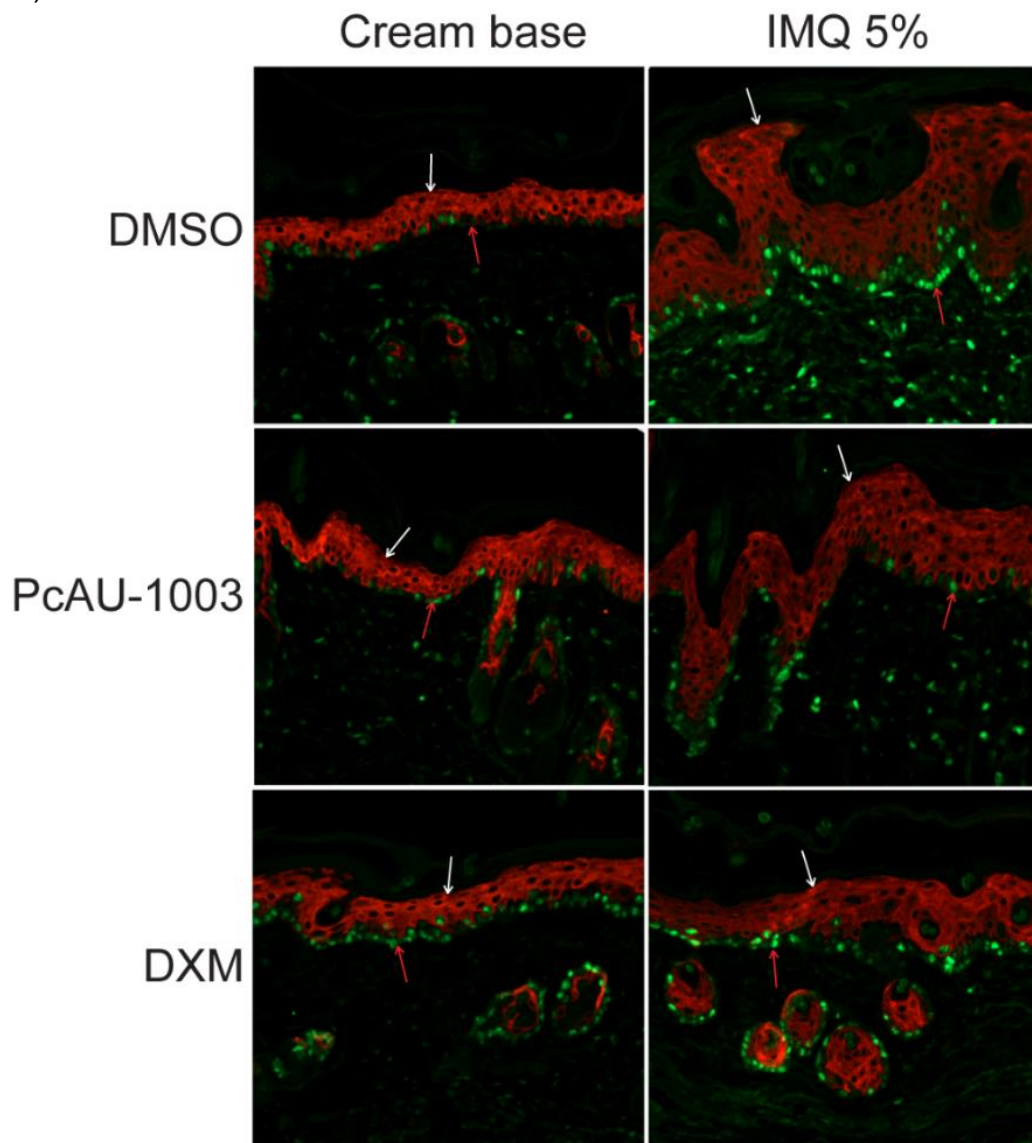


B)

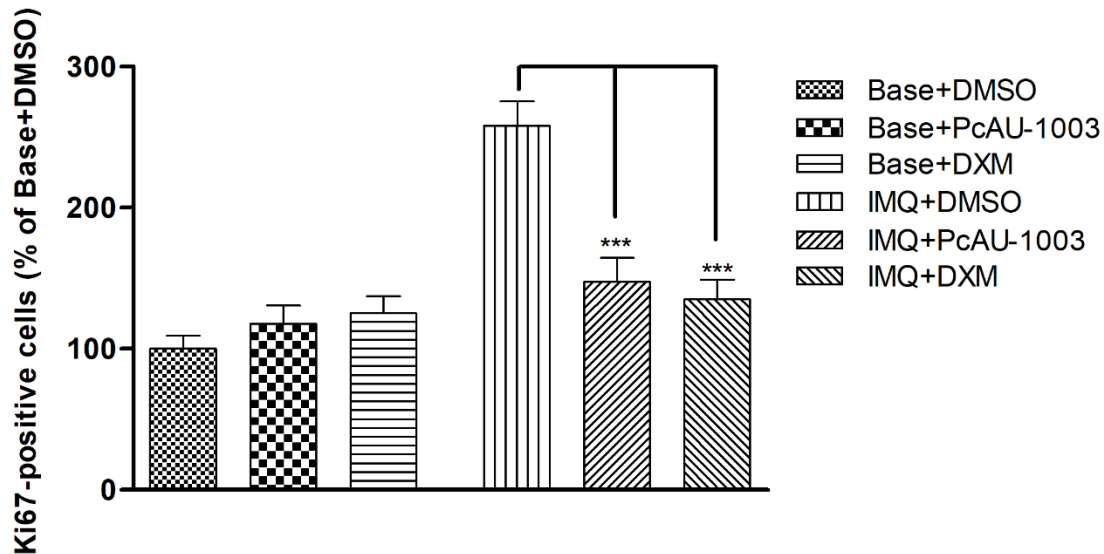


**Figure 3.3: PcAU-1003 reduces skin thickening in IMQ-treated mice.** A) Representative histopathological analyses (40 X) of skin sections from each mouse group. Epidermis is stained in purple. Black arrows show the cornified layer and red arrows, the basal layer. The dermis underneath the basal layer is stained in yellow. Control (cream base) and IMQ-treated mice received the vehicle (DMSO), PcAU-1003 or DXM. B) The epidermal thickness was measured after HES staining and histological analysis of the skins. Data are shown as mean values (n = 8)  $\pm$  S.E.M. \*, P  $\leq$  0.05; \*\*\*, P  $\leq$  0.001.

A)

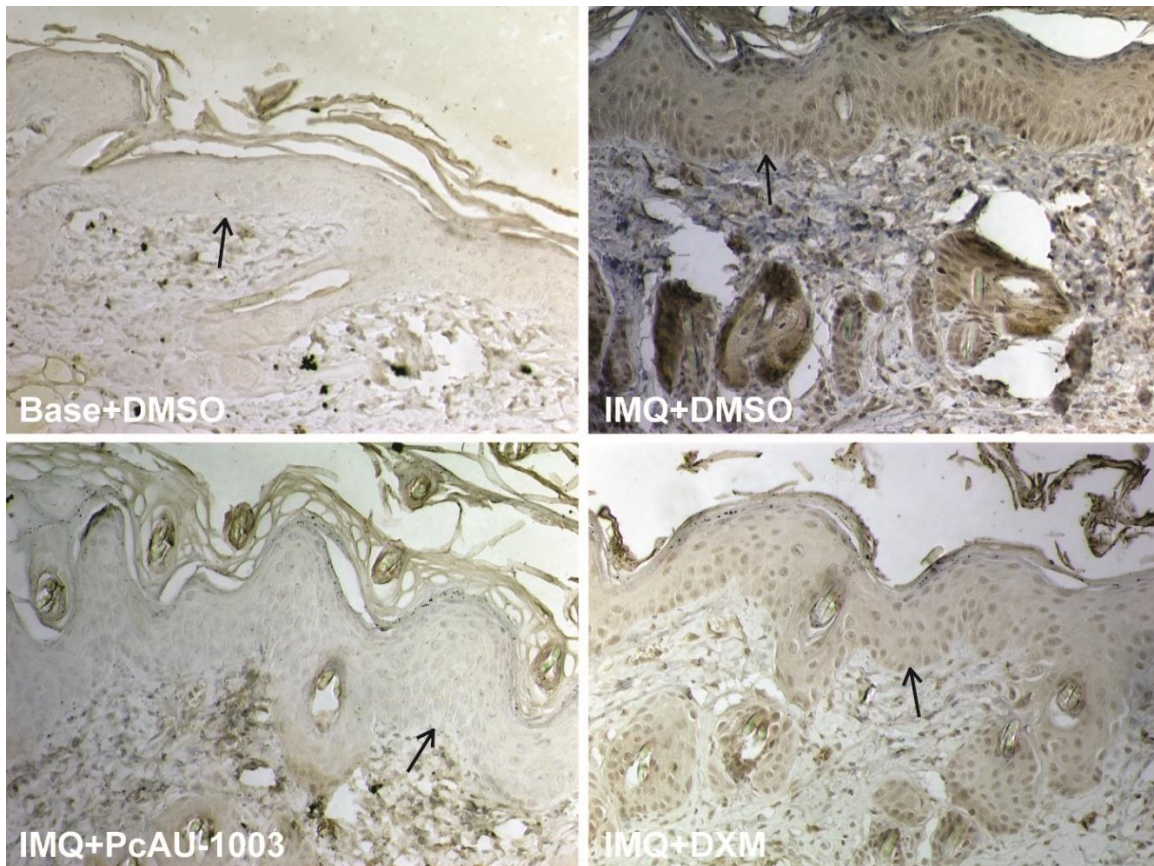


B)

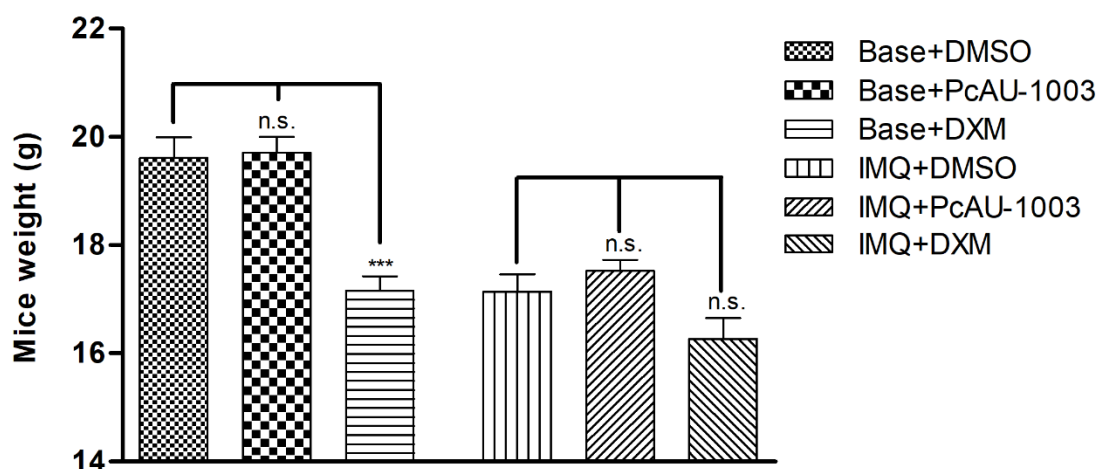


**Figure 3.4: PcAU-1003 reduces the proliferative state of the epidermis in IMQ-treated mice.** A) Mouse skin sections were immunolabeled for the proliferation marker Ki67 (green) and for the differentiation marker keratin 10 (red) and were observed using fluorescence microscopy (40 X). Red arrows indicate the basal layer of the epidermis while white arrows show the layer of differentiated keratinocytes. B) The cells in the basal layer expressing Ki67 were counted for each mouse group. The results are expressed as the ratio of the normalized number of Ki67-positive cells (Ki67-positive cells/total number of cells counted) for each treatment relative to the normalized number of Ki67-positive cells in the Base+DMSO mice. Bars represent mean values (n = 8)  $\pm$  S.E.M. \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .





**Figure 3.5: PcAU-1003 decreases IL-6 expression in the skins of IMQ-treated mice.** Detection of IL-6 by immunohistochemistry (40X) on sections of mouse skins treated with Base+DMSO, IMQ+DMSO, IMQ+PcAU-1003 and IMQ+DXM. Black arrows indicate the basal layer of the epidermis.



**Figure 3.6: PcAU-1003 does not show toxicity, under the conditions tested, in mice.** Mice from each group were weighted after the indicated 6-day treatments. Bars represent mean values (n = 8, except IMQ+DXM where n = 5) ± S.E.M. \*\*\*, P ≤ 0.001.

### 3.8 Discussion

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease that results from persistent hyperproliferation of the keratinocytes and the abundant release of cytokines. The most prescribed anti-inflammatory topical treatments against this disease are corticosteroids. Although highly effective, these are associated with many side effects like epidermal atrophy, stretch marks and telangiectasia (23) and may lose their effectiveness over time, resulting in the use of stronger corticosteroids and more significant side effects (8). As a result, there is a need for the development of novel topical anti-inflammatory treatments against psoriasis. We previously demonstrated that PcAUs act as inhibitors of IL-6 expression in HaCaT keratinocytes (17). IL-6 is a pleiotropic cytokine with a strong implication in multiple autoimmune diseases and is widely regarded as a promising target for the development of new drugs (24,25). In psoriasis, IL-6 has been described more specifically as an activator of keratinocyte proliferation and as a stimulator of Th17 differentiation (18,19). As a result, we examined whether PcAUs could be of interest for the development of a new treatment for psoriasis. In this regard, we tested two PcAUs on two different psoriasis skin models. We report here that PcAU-1003 shows beneficial effects on psoriasis symptoms in a human reconstituted skin model of psoriasis and in an IMQ-induced psoriasis mouse model.

Psoriasis is a complex autoimmune disease that involves crosstalk between the skin and the immune system. Epidermis keratinocytes play a major role in the onset of this pathology. Therefore, keratinocyte cell lines such as HaCaT remain a model of choice for the discovery of potential new antipsoriatic drugs (26). However, while keratinocytes monolayers are a simple and easy-to-use model, it does not consider the interactions between keratinocytes and the other cell types found in the skins such as the fibroblasts (27). As a result, this model is not suitable to fully evaluate the antipsoriatic potential of drug candidates. For that reason, tissue-engineered *in vitro* human skins are becoming increasingly more interesting as models of choice for this purpose since their multilayered epidermis are much closer to real epidermis and allow for the interaction of the epidermis with the dermis



(13,28). The human reconstituted skin model of psoriasis used in this study is composed of normal human keratinocytes grown on a layer of human psoriatic fibroblasts which naturally form a fully developed psoriatic epidermis (14).

We first studied the effects of PcAU-1003 and PcAU-1036 on the human reconstituted skin model of psoriasis and DMSO was used as a negative control to evaluate the effect of the vehicle. In this model, the effect of PcAU-1003 on IL-6 expression was very similar to what we previously observed in IL-17A and TNF $\alpha$ -stimulated HaCaT keratinocytes (~50% inhibition) (17). Surprisingly, while PcAU-1036 was identified as the most potent inhibitor of IL-6 expression in HaCaT cells (17), it proved to be less effective than PcAU-1003 in the human reconstituted skin model of psoriasis. Because the molecules were added to the culture media to avoid direct exposure of the epidermis to DMSO, these had to cross the fibroblast and the collagen layers to reach the epidermis. Therefore, the lack of efficacy of PcAU-1036 on IL-6 inhibition could be simply explained at least by insufficient bioavailability.

Lesional psoriatic skin is characterized by an increased number of proliferating keratinocytes, resulting in epidermal hyperplasia (29,30). Consequently, epidermal thickness is often used as an indicator of psoriasis severity in drug efficacy studies (31). The proliferation state of the skin can be evaluated by assessing the number of cells expressing the proliferation marker Ki67 (32). We found in the human reconstituted skin model of psoriasis that Ki67 was expressed in cells of the basal layer as previously reported (14). PcAU-1003 proved to be very effective at reducing the epidermal thickness in this model, which correlates with a decrease in the number of Ki67-positive cells. Surprisingly, while having a negligible effect on epidermis thickness, we found that PcAU-1036 decreased the number of Ki67-positive cells. This suggests that the reduction in the number of Ki67-positive cells is not solely responsible for the decrease in the thickness of the epidermis. During the differentiation process, keratinocytes lose their nuclei and become more compact, resulting in a thinner epidermis (36,37). Interestingly, we can observe the presence of nuclei in the layer of differentiated cells (stained in red by the K10

marker) in PcAU-1036-, but not in PcAU-1003-treated reconstituted skins (Figure 3.1C) It is therefore possible that PcAU-1003 reduces the epidermal thickness by increasing the differentiation of keratinocytes. The results obtained with PcAU-1003 in the reconstituted skin model of psoriasis model suggests that this small molecule could be an interesting drug candidate for the treatment of the disease.

The gold standard for the preclinical testing of drug candidates remain to this day the murine models (33). For this reason, we tested PcAU-1003 in the IMQ-induced psoriasis mouse model. As expected, application of IMQ on mice increased all three symptoms of inflammation in a time-dependent fashion and provoked a thickening of the epidermis. However, we observed that the major increase in symptom severity occurred on day 4, while in the original study describing the model, it occurred on day 6 (16). This could be explained by the nature of the vehicle we used. DMSO is known to disrupt lipid membranes and increase permeability (34) and as a result, it could increase the penetration of imiquimod in the skin. Moreover, DMSO itself could be partly responsible for the unexpected increase of the PASI score in cream base-treated mice as it is a known skin irritant (35). Indeed, this phenomenon was not observed in similar studies using other vehicles or no topical vehicle at all (16,36–38). The use of DMSO potentially explains why the epidermis of the cream base-treated mice with DMSO is 200  $\mu\text{m}$  thick whereas it should be much thinner (around 20–30  $\mu\text{m}$ ) (37,39). This warrants the need for the development of a more suitable vehicle for PcAUs.

Still, we found that PcAU-1003 and DXM reduce redness, scaling and thickness of the skin. Nevertheless, we expected a more potent effect of DXM since other studies showed that topical application or oral administration of this molecule could strongly improve several psoriasis symptoms in this mouse model (37,40). This discrepancy may be due to an inadequate dose or an inappropriate vehicle for DXM. For example, Dou et al. used two daily doses of 20.0 mg DXM dissolved in 50% ethanol and have observed a diminution of the cumulative PASI score from 8 to 4 (37). In our case, our choice of vehicle was limited because PcAUs are

hydrophobic molecules that precipitate in ethanol at high concentrations. We used a lower dose of DXM (0.25 mg) because, with the experimental conditions used, we observed strong toxicity at higher doses. However, DXM proved to be very efficient at reducing epidermis thickness. This observation is specific to IMQ-treated mice as DMX did not change the skin thickness of control mice (cream base).

PcAU-1003 proved to be efficient at reducing the epidermal thickness, although not as strongly as DXM. Since hyperproliferative keratinocytes is an important factor in the increase of epidermal thickness, we evaluated the number of Ki67-positive cells in the basal layer. Ki67 is a proliferation marker often used in preclinical studies of psoriasis as it is vastly overexpressed in lesional skin (41). As expected, reduction of the epidermal thickness correlated with a decrease in the proliferative state of the basal layer. Our results suggest that PcAU-1003 reduces the hyperproliferation of the keratinocytes in the psoriatic skin and alleviates the inflammation by decreasing *IL-6* expression, a cytokine with a key role in the inflammatory loop in the psoriasis disease (42).

Finally, we verified the innocuity of PcAU-1003 on mice. We observed that IMQ treatment caused an important weight loss, possibly because mice are known to show a loss of appetite during the first 5 days of the IMQ treatment (43). This is also consistent with another study in which IMQ-treated mice become apathetic, dehydrated and lose about 15% of total weight (16). As we have observed, Smyth et al. found that DMX alone can cause weight loss (44). In addition, it was previously reported that prolonged use of glucocorticoids is associated with toxicity and limited lifespan of mice (45). Our results show that PcAU-1003 does not cause weight loss in the treated mice, which suggests that it does not induce toxicity and that it is safe under the conditions tested.

### **3.9 Conclusion**

In conclusion, this study shows the beneficial effects of PcAU-1003 on a human model and on a mouse model of psoriasis. In both models, PcAU-1003 inhibits IL-6 expression and reduces keratinocytes proliferation, which results in a decrease in epidermis thickness. PcAU-1003 could thus provide the basis for the development of a new antipsoriatic drug. However, further work is needed to develop a more suitable vehicle for PcAUs. This could potentially improve the delivery and efficacy of PcAU-1003. Additional work on the structure of the small molecule could lead to the development of a compound with better efficacy and bioavailability.

### 3.10 References

1. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2012;7(1):385–422.
2. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *new Engl J Med Rev*. 2009;i(4):560–9.
3. Gladman DD. Psoriatic arthritis. *Dermatol Ther*. 2009;22(1):40–55.
4. Kurd SK, Troxel AB, Crits-Christoph P, Gelfand JM. The risk of depression, anxiety and suicidality in patients with psoriasis: A population-based cohort study. *Arch Dermatol*. 2011;146(8):891–5.
5. Nickoloff BJ. Keratinocytes regain momentum as instigators of cutaneous inflammation. *Trends Mol Med*. 2006;12(3):102–6.
6. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):679–91.
7. Albanesi C, Madonna S, Gisondi P, Girolomoni G. The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Front Immunol*. 2018;9:1–7.
8. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(1):1–18.
9. Reber A. Cyclosporine A in psoriasis. *Clin Dermatol*. 1991;9(4):515–22.
10. Menter A, Korman N, Elmets C, Feldman S, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Am Dermatology*. 2009;60(4):643–59.
11. Kalb RE, Strober B, Weinstein G, Lebwohl M. Methotrexate and psoriasis: 2009 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(5):824–37.
12. Mathes SH, Ruffner H, Graf-Hausner U. The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69–70:81–102.
13. Desmet E, Ramadhas A, Lambert J, Van Gele M. In vitro psoriasis models with focus on reconstructed skin models as promising tools in psoriasis research. *Exp Biol Med*. 2017;242(11):1158–69.
14. Ayehunie S, Hedin C, Landry T, Cataldo A, Spratt M, Clark R, et al. Development and Characterization of 3D Psoriatic Tissue Model. In: Society of Investigative Dermatology Meeting. 2012. p. 1–5.
15. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller AE, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol*. 2002;218(1–2):74–86.
16. van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J Immunol*. 2009;182(9):5836–45.
17. Tremblay S, Boutin J, Perreault M, Gobeil S, C-Gaudreault R. Synthesis and evaluation of substituted phenyl cycloalkylureas and bioisosteres as IL-6 expression inhibitors. *Med Chem Res*. 2020;
18. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(16):6367–71.
19. Goodman WA, Levine AD, Massari J V., Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD. IL-6 Signaling in Psoriasis Prevents Immune Suppression by Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2009;183(5):3170–6.
20. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1830–5.

21. Hawkes JE, Gudjonsson JE, Ward NL. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. *J Invest Dermatol.* 2017;137(3):546–9.
22. Rooman R, Koster JG, Bloemen R, Gresnigt R, Van Buul-Offers SC. The effect of dexamethasone on body and organ growth of normal and IGF- II-transgenic mice. *J Endocrinol.* 1999;163(3):543–52.
23. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, et al. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. *Int J Endocrinol.* 2012;2012(iv).
24. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Publ Gr.* 2015;16(5):448–57.
25. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):1–16.
26. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1–12.
27. Jeanmonod DJ, Rebecca, Suzuki K et al., Hrabovsky M, Mariana Furio Franco Bernardes MP, Lilian Cristina Pereira and Daniel Junqueira Dorta. Optimization of the Self-Assembly Method for the Production of Psoriatic Skin Substitutes. In: *Cell Culture.* 2018. p. 195–211.
28. Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering Skin reconstructed from cells in combination with scaffolds. *Rev Lit Arts Am.* 2009;19(2):107–13.
29. Lizzul PF, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Masud S, Dombrovskiy V, et al. Differential expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF- $\kappa$ B in response to treatment with etanercept. *J Invest Dermatol.* 2005;124(6):1275–83.
30. Lowes MA, Suárez-Farinas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227–55.
31. Feldman SR, Krueger GG. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(SUPPL. 2):65–8.
32. Sezer E, Böer-Auer A, Cetin E, Tokat F, Durmaz E, Sahin S, et al. Diagnostic utility of Ki-67 and Cyclin D1 immunostaining in differentiation of psoriasis vs. other psoriasiform dermatitis. *Dermatol Pract Concept.* 2015;5(3):7–13.
33. Assil S, Rissmann R, Bastiaan Adriaan van Doorn M. Pharmacological Challenge Models in Clinical Drug Developmental Programs. In: *Translational Studies on Inflammation.* 2019. p. 1–17.
34. Cheng CY, Song J, Pas J, Meijer LHH, Han S. DMSO Induces Dehydration near Lipid Membrane Surfaces. *Biophys J.* 2015;109(2):330–9.
35. Malten KE, den Arend J. Topical toxicity of various concentrations of DMSO recorded with impedance measurements and water vapour loss measurements Recording of skin's adaptation to repeated DMSO irritation. *Contact Dermatitis.* 1978;4(2):80–92.
36. Du Z, Xue T, Jiang M, Lu H, Ye Z, Ruan B, et al. Arctigenin attenuates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions via down-regulating keratin17. 2016;9(2):1639–47.
37. Dou R, Liu Z, Yuan X, Xiangfei D, Bai R, Bi Z, et al. PAMs ameliorates the imiquimod-induced psoriasis-like skin disease in mice by inhibition of translocation of NF-  $\kappa$  B and production of inflammatory cytokines. 2017;1–19.
38. Guo Q, Xiong H, Xu Y, Tan G, Han Y, Tang Z, et al. Glycyrrhizin Ameliorates Imiquimod- Induced Psoriasis-like Skin Lesions in BALB/c Mice and Inhibits TNF- $\alpha$

- Induced ICAM-1 Expression via NF- $\kappa$ B/MAPK in HaCaT Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(4):1335–46.
39. Schaper K, Dickhaut J, Japtok L, Kietzmann M, Mischke R, Kleuser B, et al. Sphingosine-1-phosphate exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects in mouse models of psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2013;71(1):29–36.
  40. Li Y, Zhang G, Chen M, Tong M, Zhao M, Tang F, et al. Rutaecarpine inhibited imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via inhibiting the NF- $\kappa$ B and TLR7 pathways in mice. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1876–83.
  41. Kim SAE, Ryu YW, Kwon J II, Choe MS, Jung JINW, Cho JWC. Differential expression of cyclin D1 , Ki - 67 , pRb , and p53 in psoriatic skin lesions and normal skin. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):735–42.
  42. Saggini A, Chimenti S, Chiricozzi A. IL-6 as a druggable target in psoriasis: Focus on pustular variants. *J Immunol Res*. 2014;2014.
  43. Zhang J, Yang X, Qiu H, Chen W. Weight loss may be unrelated to dietary intake in the imiquimod-induced plaque psoriasis mice model. *Open Life Sci*. 2020;15(1):79–82.
  44. Smyth T, Töttemeyer S, Haugland S, Willers C, Peters S, Maskell D, et al. Dexamethasone modulates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in vivo independently of the glucocorticoid-inducible protein annexin-A1. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;54(3):339–48.
  45. Quan L, Zhang Y, Dusad A, Ren K, Purdue PE, Steven R, et al. The evaluation of the therapeutic efficacy and side effects of a macromolecular dexamethasone prodrug in the collagen- induced arthritis mouse model. *Pharm Res*. 2016;33(1):186–93.

## 4 Discussion

### 4.1 Utilité des PcAUs pour traiter le psoriasis

Les PcAUs ont avant tout été caractérisés comme des inhibiteurs de l'IL-6. Cependant, l'utilité de bloquer spécifiquement cette cytokine pour traiter le psoriasis n'est pas encore démontrée. On pourrait penser que ce serait le cas puisqu'il a été démontré que la surexpression de l'IL-6 dans l'épiderme est suffisante pour induire des symptômes similaires au psoriasis chez la souris (Turksen, Kupper, Degenstein, Williams et Fuchs, 1992). Il existe actuellement deux anticorps contre le récepteur à l'IL-6, le tocilizumab (TCZ) et le sarilumab, qui ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* en 2010 pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Blauvelt, 2017; Tsai et Tsai, 2017). Malheureusement, les premiers essais avec le TCZ faits sur deux patients atteints de PsA ont montré que l'anticorps était inefficace pour faire disparaître les plaques, contrairement à un anticorps dirigé contre TNF $\alpha$  (Ogata, Umegaki, Katayama, Kumanogoh et Tanaka, 2012). De plus, des cas d'apparition de symptômes du psoriasis ont été rapportés chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et traités avec le TCZ (Grasland, Mahé, Raynaud et Mahé, 2013). Cet anticorps n'est donc généralement pas utilisé pour traiter le psoriasis et on favorise plutôt les anti-TNF $\alpha$ , dont l'utilité est mieux documentée (Braun et Sieper, 2003). Cependant, des cas ont été rapportés où le TCZ s'est montré efficace, mais pour traiter les cas de psoriasis pustuleux palmoplantaire causés par la prise d'inhibiteurs de TNF $\alpha$  (Jayasekera, Parslew et Al-Sharqi, 2014; Rueda-Gotor et al., 2012; Younis et al., 2012).

Ce phénomène est inattendu, car l'IL-6 est connue pour favoriser la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 pro-inflammatoires au profit des lymphocytes T régulateurs, qui sont responsables de l'homéostasie lors des réponses immunitaires (Kimura et Kishimoto, 2010). Une étude a été réalisée sur un modèle de souris psoriasiformes exprimant IL-17C de façon constitutive dans la peau (IL-17C+) pour tenter d'apporter une explication (Fritz et al., 2017). Les chercheurs ont observé que, chez les souris IL-17C+ déficientes pour l'IL-6 (IL-17C+KO), l'apparition de l'inflammation cutanée est retardée comparativement aux



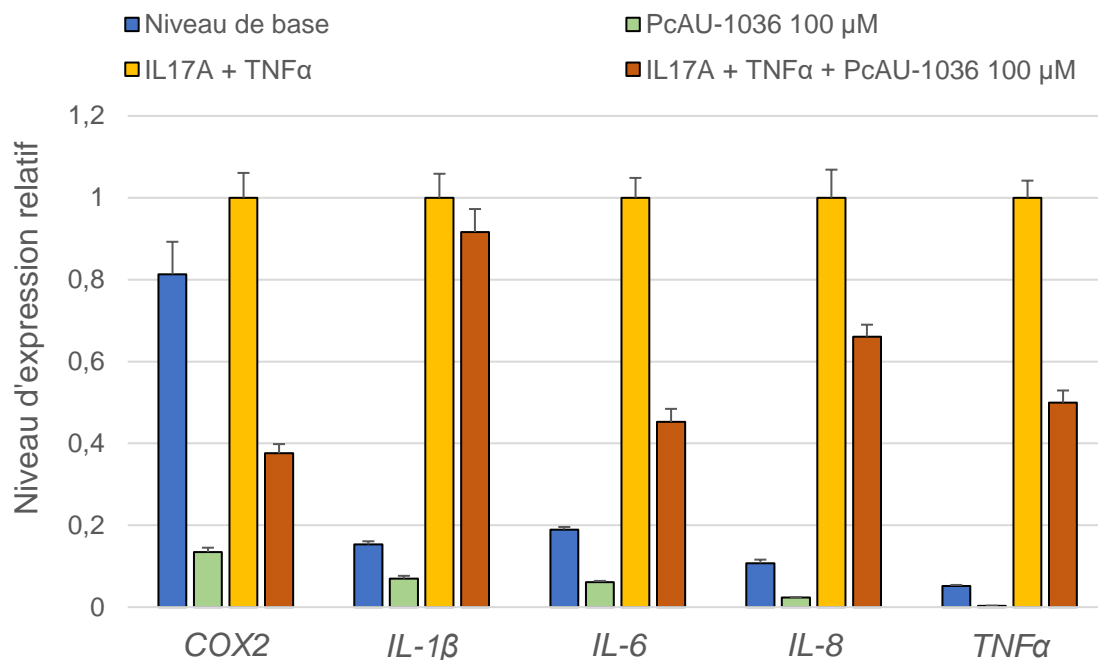
souris IL-17C+ normales. Cependant, après 14 semaines, les souris IL-17C+KO développent un phénotype similaire. On a remarqué chez ces souris une forte augmentation de l'expression de *TNF $\alpha$* , *S100A8/A9*, *IL36 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$*  et *IL-24* par rapport aux souris IL-17C+. Il semble donc que l'absence d'IL-6 soit compensée par une surexpression d'autres cytokines. Même si le blocage de la voie de l'IL-6 semble être contre-productif dans le traitement du psoriasis, il faut rappeler que les anticorps ont des effets systémiques et on ne sait pas si le TCZ peut inhiber l'IL-6 dans la peau. Il est donc tout à fait envisageable que le blocage de l'IL-6 aux sites des lésions psoriasiques de la peau puisse être bénéfique pour le patient.

Pour réaliser notre criblage, nous avons choisi de mesurer la production de l'IL-6 pour évaluer et comparer l'efficacité des PcAUs entre elles parce que l'effet de la tBEU et de la cHEU sur l'expression et la production de l'IL-6 était relativement constant d'une expérience à l'autre. De plus, comme elle est sécrétée dans le milieu de culture, l'IL-6 est rapidement quantifiable en ELISA, ce qui nous a permis d'étudier simultanément les effets d'un grand nombre de PcAUs. L'IL-6 est aussi généralement considérée comme un pronostic fiable du psoriasis et d'autres maladies auto-immunes (Hunter et Jones, 2015).

Cependant, nous avons aussi étudié les effets de la PcAU-1036 sur d'autres gènes de l'inflammation et nous avons observé qu'elle diminuait fortement l'expression de *COXII*, de *TNF $\alpha$*  et d'*IL-8* (Figure 4.1). *TNF $\alpha$*  a un rôle clef dans le psoriasis en perpétuant l'inflammation dans la peau par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et en activant l'inflammation chez les cellules dendritiques et endothéliales (Grine et al., 2015; Holbrook, Lara-reyna, Jarosz-griffiths et Mcdermott, 2019). Pour sa part, l'IL-8 est une chimiokine qui recrute et active les lymphocytes aux sites d'inflammation (Sticherling, Sautier, Schröder et Christophers, 1999). Il serait donc pertinent de cribler par ELISA l'effet des PcAUs pour sur ces deux médiateurs inflammatoires.

COXII permet la conversion de l'acide arachidonique en PGE2, un médiateur de l'inflammation qui contribue au psoriasis en stimulant la prolifération des kératinocytes et la vasodilatation (Bakry, Samaka, Shoeib et Aal, 2015; Lee, Mukhtar, Bickers, Kopelovich et Athar, 2003). Il a été démontré que ce gène est surexprimé dans les plaques psoriasiques (Bakry et al., 2015). Cependant, COXII n'est pas sécrété par les cellules et n'est donc pas directement détectable par ELISA. Il est néanmoins possible de mesurer indirectement son activité enzymatique par des essais biofonctionnels qui impliquent la métabolisation d'un substrat. On pourrait tester les PcAUs de cette façon pour leur capacité à inhiber l'activité de COXII.

Donc, il est plausible que les effets anti-psoriasiques de la PcAU-1003 sur les modèles précliniques du psoriasis ne soient pas simplement causés par l'inhibition de l'IL-6.



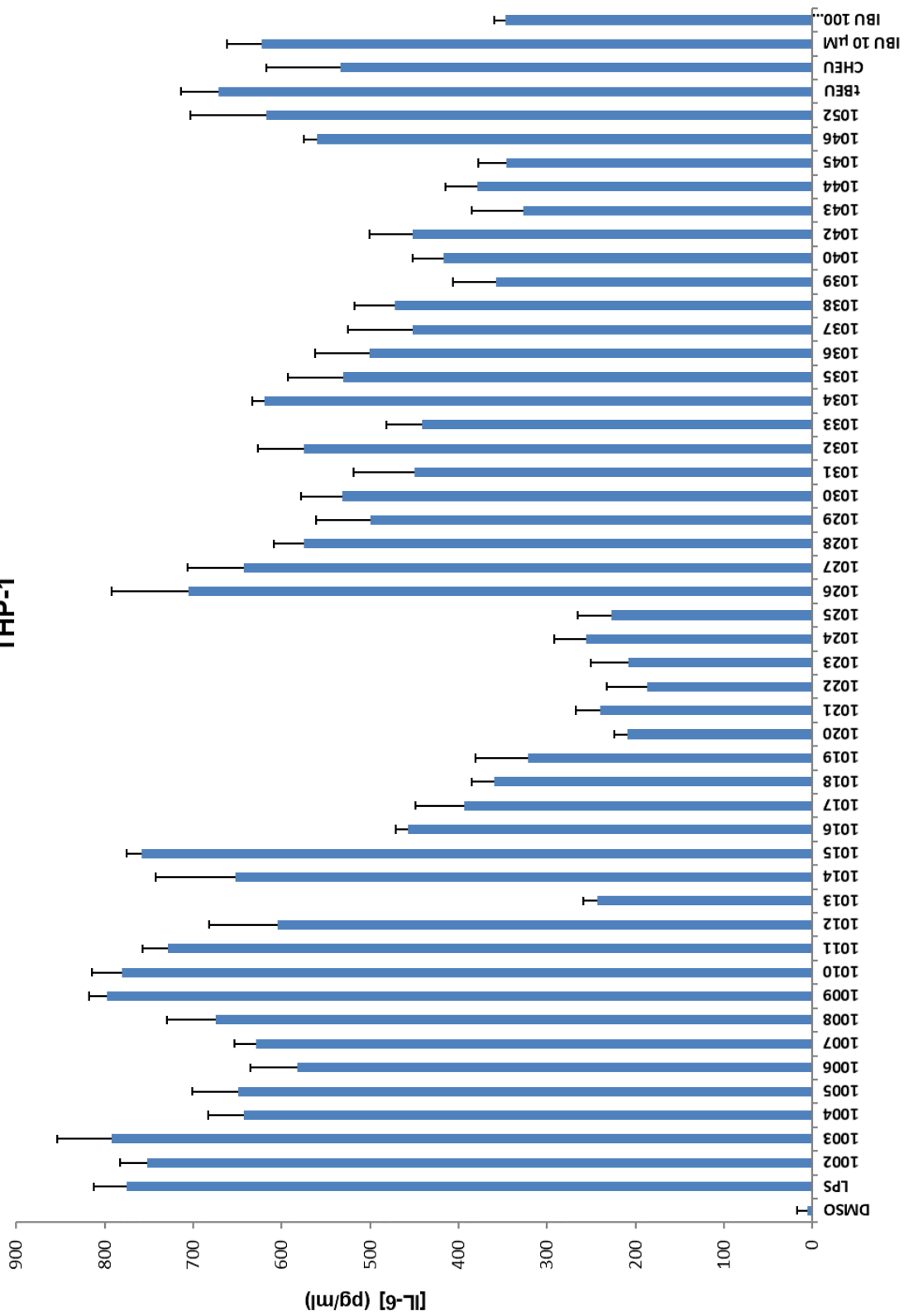
**Figure 4.1 : Effets de la PcAU-1036 à 100 μM sur l'expression de COXII, IL-1β, IL-6, IL-8 et TNFα.** Des cellules HaCaT ont été prétraitées 1 h avec la PcAU-1036 à 100 μM avant d'être traitées avec IL-17A (100 ng/mL), TNFα (10 ng/mL) et de la

PcAU-1036 fraîche. Les résultats représentent la moyenne des valeurs de trois qPCR  $\pm$  erreur type de la moyenne (expérience non dupliquée). Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au niveau d'expression du gène constitutif *U6*.

Puisque nos molécules ont été principalement étudiées dans l'optique de développer un traitement topique contre le psoriasis, nos expériences ont surtout été réalisées sur des kératinocytes. D'autres types de cellules sont aussi impliquées dans la pathologie. Entre autres, les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les macrophages sont des contributeurs majeurs des maladies auto-immunes. D'ailleurs, des expériences préliminaires faites sur des macrophages dérivés de monocytes THP-1 et stimulés avec du LPS montrent que les PcAUs ont aussi un effet sur ce type cellulaire (Figure 4.2). On observe que les PcAUs efficaces à inhiber IL-6 dans ce modèle ne sont pas les mêmes que celles agissant sur les kératinocytes HaCaT. Par exemple, la PcAU-1003, qui est efficace sur les HaCaT, n'a pas d'effet sur les macrophages dérivés des THP-1 dans les conditions testées. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les PcAUs modulent l'activation de la voie AHR. En effet, la voie de signalisation AHR joue un rôle différent dans les macrophages en induisant l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Zhu et al., 2018). De plus, elle favorise la polarisation des macrophages vers le sous-type M2, qui est immunomodulateur, au détriment du sous-type M1, qui est plutôt pro-inflammatoire.

**Figure 4.2 : Criblage des PcAUs par ELISA contre IL-6 sur des macrophages dérivés des THP-1 et stimulés avec du LPS.** Des monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages par un traitement avec du PMA 50 ng/mL pendant 48 heures. Ensuite, les cellules ont été prétraitées 1 h avec les PcAUs à 10  $\mu$ M, puis stimulées avec du LPS 100 ng/mL pendant 4 h. L'IL-6 dans le milieu de culture a ensuite été quantifiée par ELISA. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  écart type.

# Effets des PcAUs sur la sécrétion de l'IL-6 sur les macrophages dérivés des THP-1



## 4.2 Étude des PcAUs comme antagonistes de la voie de signalisation AHR

Nos travaux ont permis de montrer que la PcAU-1036 inhibe l'expression et la production de l'IL-6 et que l'antagonisme de AHR était lié à ce phénomène. Cela a été démontré par le fait que la PcAU-1036 perdait son effet en la co-incubant avec du FICZ, un agoniste puissant de AHR, et aussi en l'utilisant sur des cellules qui expriment un shRNA interférant contre AHR.

Il serait pertinent de vérifier si les autres PcAUs agissent aussi comme des antagonistes de AHR. Cependant, pour cribler autant de molécules de façon réaliste, il faut utiliser une méthode éprouvée, simple et qui peut se faire à haut débit. Si l'immunofluorescence permet de tester quelques molécules assez rapidement en regardant la localisation de AHR, les effets sont qualitatifs, ce qui rend difficile et laborieuse la comparaison entre les différentes expériences. Il serait intéressant d'utiliser l'essai EROD (Ethoxyresorufin O-Deethylase Assays). Cette technique consiste à mesurer la capacité des cellules à métaboliser par l'entremise de CYP1A1 la 7-éthoxyresorufin en résazurine, un composé bleu facilement détectable par un lecteur de plaques. Les cellules traitées avec du TCDD expriment plus fortement l'enzyme CYP1A1 et convertissent plus rapidement la 7-éthoxyresorufin alors que ce phénomène est contrecarré par l'ajout d'un antagoniste de AHR comme le CH223191 (Z. H. Chen et al., 2004; Choi, Lee, Dingle, Kim et Swanson, 2012). Le criblage des PcAUs par l'essai EROD permettrait de possiblement établir une relation entre l'antagonisme de AHR et l'inhibition de l'IL-6. Il est aussi plausible que l'antagonisme de la voie de signalisation de AHR soit propre à une portion seulement des PcAUs.

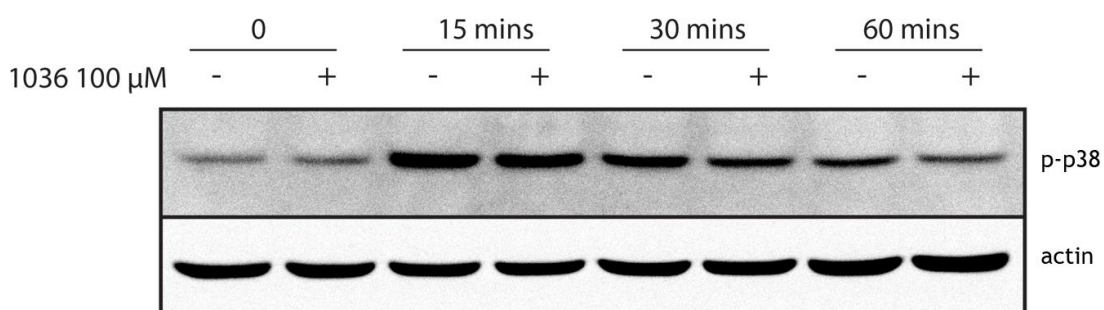
Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que la PcAU-1036 antagonise l'activation de la voie AHR. Cependant, on ne sait pas si cet effet découle d'une interaction directe avec la protéine ou indirecte par la modulation d'une autre voie de signalisation. D'ailleurs, cette information est également inconnue pour le CH223191. Il serait donc intéressant d'étudier la nature de l'interaction entre la PcAU-1036 et AHR. Malheureusement, répondre à cette question exige une grande

quantité de protéine AHR humaine recombinante. Ce genre de produit est accessible commercialement, mais le prix très élevé rend l'expérience difficile à entreprendre dans un milieu académique. Il serait toutefois possible de mettre au point une technique de production et de purification de la protéine au laboratoire. Une fois purifiée, on pourrait étudier par calorimétrie l'effet de la PcAU-1036 sur la liaison d'un ligand à AHR et ce, sans interférence d'autres protéines. Sinon, il est possible d'estimer la probabilité de liaison d'une molécule sur une protéine par modélisation 3D. Il serait fort intéressant d'évaluer *in silico* comment la PcAU-1036 pourrait se lier à AHR et de comparer ce résultat au CH223191.

Ensuite, il serait pertinent de tester l'utilité de la PcAU-1036 comme antagoniste de AHR dans un autre contexte que l'inflammation. Dans l'introduction, nous avons notamment décrit comment AHR était relié directement à la prolifération cellulaire. Nous avons aussi observé ce phénomène, car nos lignées *knockdown* de AHR avaient une vitesse de dédoublement beaucoup plus faible. Plusieurs études ont montré que dans des cellules de cancer du foie et de cancer de la tête et du cou, l'activation de AHR stimule la prolifération cellulaire alors que son inhibition a l'effet inverse (DiNitale et al., 2012; Kaarthick, Lahoti, Wagner, Hughes et Perdew, 2014). Dans d'autres contextes, comme dans le cas des cellules de cancer du sein, l'activation de AHR semble provoquer des effets pro- et antitumoraux selon le modèle employé (Kolluri, Jin et Safe, 2017). Le potentiel anti-prolifératif de la PcAU-1036 a été évalué jusqu'à maintenant sur des lignées primaires et les résultats montrent qu'à une concentration de 10  $\mu$ M, elle n'affecte pas leur vitesse de prolifération. Par conséquent, étant donné l'implication de AHR dans la progression tumorale, il serait intéressant d'évaluer à nouveau les propriétés antiprolifératives de la PcAU-1036 sur des lignées tumorales.

Même si nos résultats démontrent que l'inhibition de l'expression de l'IL-6 dans les kératinocytes dépend de la voie AHR, d'autres expériences sont nécessaires pour comprendre exactement comment cette inhibition se produit. Il faudrait aller plus loin pour mieux comprendre le mécanisme d'action moléculaire de

la PcAU-1036. Par immunofluorescence, nous avons observé qu'elle n'empêchait pas la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B de transloquer au noyau après stimulation par IL-17A et TNF $\alpha$ . Des études ont déjà montré dans d'autres modèles cellulaires que l'activation de AHR entraîne son recrutement aux promoteurs de gènes de l'inflammation, comme *IL-6* et *IL-8*, ainsi que le co-recrutement de p65 (DiNatale, Schroeder, Francey, Kusnadi et Perdew, 2010; Vogel et al., 2007). Il serait intéressant de vérifier par immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules HaCaT si l'antagonisme de la voie AHR par la PcAU-1036 peut affecter la localisation de AHR et de p65 sur le promoteur de l'*IL-6*. Il faudrait également vérifier si l'effet anti-inflammatoire de la PcAU-1036 n'est pas médié par l'inhibition de l'expression de *CYP1A1*. En effet, *CYP1A1* peut générer des radicaux oxydatifs pro-inflammatoires (Morel, Mermoud et Barouki, 1999). On pourrait répondre à cette question facilement en testant la PcAU-1036 sur des lignées de HaCaT qui expriment un shRNA contre *CYP1A1*. Enfin, une étude récente a démontré que dans des kératinocytes humains normaux, le *knockdown* de AHR inhibait la phosphorylation et l'activation de p65 et de la MAP kinase p38 lors d'un stress pro-inflammatoire. De façon intéressante, nous avons observé que la PcAU-1036 à 100  $\mu$ M inhibait la phosphorylation de la p38 (Figure 4.3). Il faudrait vérifier si l'on observe le même effet sur p65.



**Figure 4.3 : La PcAU-1036 inhibe la phosphorylation de la MAPK p38.** Des cellules HaCaT ont été prétraitées 1 h avec la PcAU-1036 à 100  $\mu$ M avant d'être traitées avec IL-17A (100 ng/mL), TNF $\alpha$  (10 ng/mL) et de la PcAU-1036 fraîche. À 0, 15, 30 et 60 minutes, les cellules ont été lysées et les extraits protéiques totaux

ont été analysés par immunobuvardage avec des anticorps contre la phospho-p38 et la  $\beta$ -actine.

### 4.3 Études du potentiel antipsoriasique des PcAUs

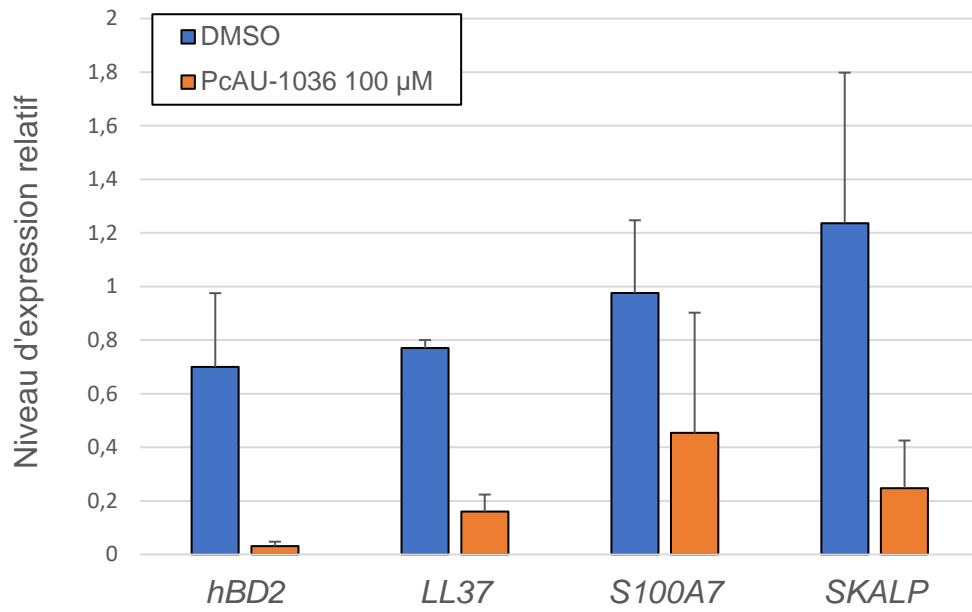
Au chapitre 3, nous avons montré que la PcAU-1036 à 10  $\mu$ M avait des effets mitigés sur le modèle pré-clinique de peaux humaines psoriasiques reconstituées MatTek. Nous avons aussi testé la PcAU-1036 à 100  $\mu$ M en parallèle et avons obtenu des résultats intéressants. Dans les peaux reconstituées traitées avec la PcAU-1036 à 100  $\mu$ M, l'expression des gènes *hBD2*, *LL37*, *S100A7* et *SKALP* ainsi que la production d'IL-6 est grandement diminuée par rapport aux peaux témoins. De plus, leur épiderme semble légèrement moins épais (Figure 4.4). Donc, la PcAU-1036 démontre un certain potentiel dans le modèle de peaux psoriasiques reconstituées. En modifiant le mode d'administration, il serait éventuellement possible de diminuer la concentration et augmenter l'efficacité de la PcAU-1036 dans ce modèle.

Deux modes d'administration sont possibles pour le modèle de peaux humaines psoriasiques reconstituées : 1- Les molécules peuvent être ajoutées directement au milieu de culture. De cette façon, elles doivent monter verticalement à travers les fibroblastes et la couche de collagène pour atteindre les kératinocytes. Nous avons privilégié ce mode d'administration pour l'étude présentée au chapitre 3. 2- Il est aussi possible d'ajouter les molécules sur le dessus des peaux reconstituées pour qu'elles soient directement en contact avec la couche de kératinocytes. Ceci a pour avantages de simuler un traitement topique et d'éliminer la possibilité que les molécules ne puissent entrer en contact avec les kératinocytes. Par contre, puisque notre véhicule, le DMSO, est connu pour être irritant (Malten et den Arend, 1978), nous avons décidé de mettre les molécules en contact avec le derme plutôt que l'épiderme. Il serait pertinent de répéter l'expérience sur le modèle MatTek en ajoutant, directement sur les kératinocytes, les PcAUs diluées dans un autre véhicule.

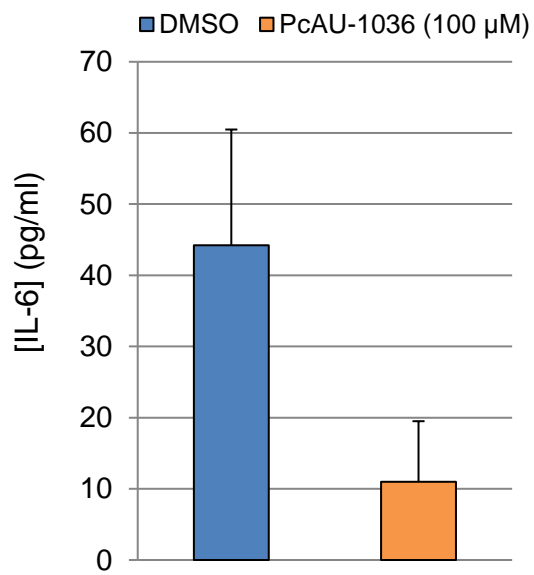


D'ailleurs, un nouveau véhicule moins irritant que le DMSO pourrait également servir pour réévaluer les PcAUs sur le modèle murin de psoriasis induit à l'imiquimod. Comme l'application quotidienne de DMSO peut causer de l'érythème et l'assèchement de la peau, cela affecte grandement les résultats obtenus (Wright et Winer, 1966). D'ailleurs, dans l'expérience sur le modèle de souris présentée au chapitre 4, les souris ayant reçu la crème base et le DMSO (Base+DMSO) ont un épiderme très épais lorsqu'on compare nos résultats à ceux d'études qui emploient le même modèle (100  $\mu\text{m}$  contre 20 à 30  $\mu\text{m}$ ) (Dou et al., 2017; Lin, Yang, Chen, Kao et Fang, 2015; Schaper et al., 2013). Afin d'apprécier pleinement les effets des PcAUs, il faudrait les dissoudre dans un véhicule ne causant que peu ou pas d'interférence. Il est également concevable que dans un autre véhicule, les PcAUs puissent traverser moins rapidement la peau et ainsi agir plus longtemps dans l'épiderme. Un autre véhicule pourrait donc augmenter la disponibilité des molécules pour les kératinocytes et potentiellement contribuer à améliorer les effets bénéfiques des PcAUs.

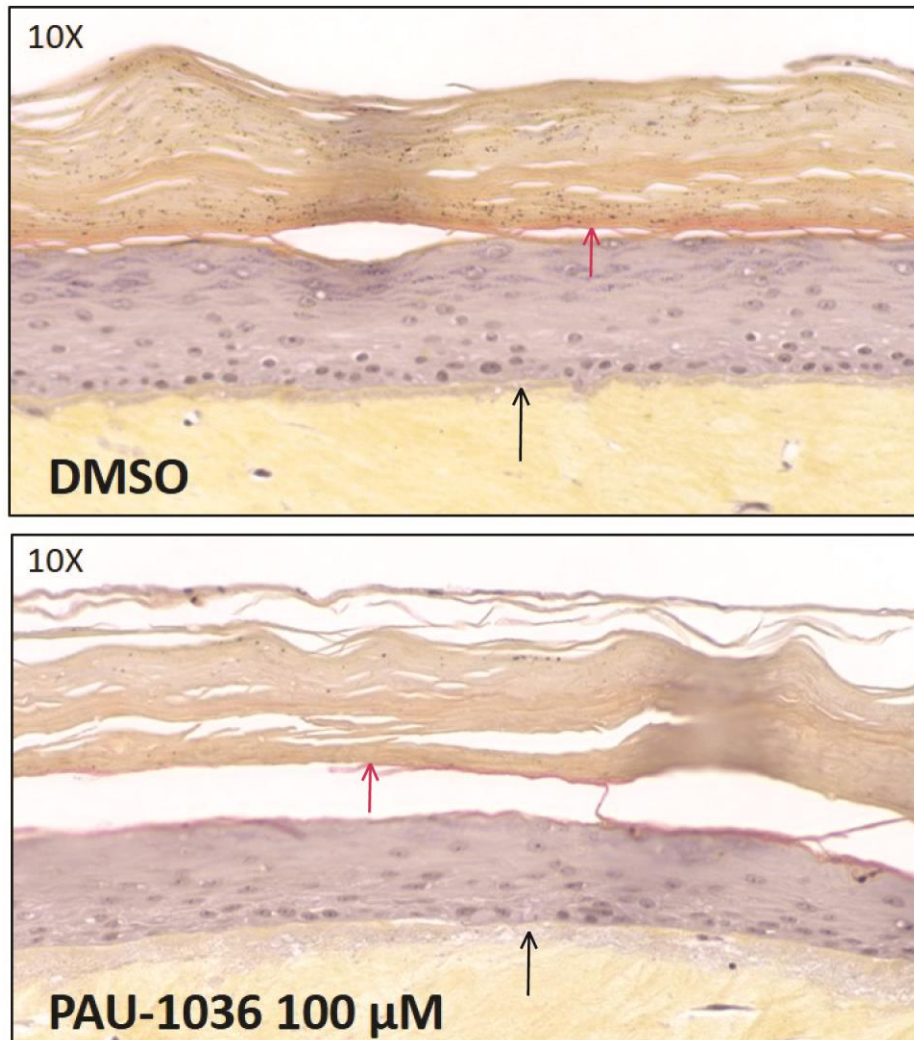
A)



B)



C)



**Figure 4.4 : Effets de la PcAU-1036 à 100  $\mu\text{M}$  sur le modèle de peaux psoriasiques reconstituées.** A) La PcAU-1036 diminue l'expression des gènes marqueurs de l'inflammation *hBD2*, *LL37*, *S100A7* et *SKALP* après 4 jours de traitement. L'expression de ces gènes a été normalisée par rapport à l'expression des gènes constitutifs *U6*, *B2M* et *TBP*. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ( $n = 2$ )  $\pm$  écart type. B) Mesure de l'IL-6 dans le milieu extracellulaire par ELISA au jour 4. Les résultats représentent les valeurs moyennes ( $n = 4$ )  $\pm$  écart-type. C) Coloration HES d'une coupe de peau à la fin du traitement de 4 jours. L'épiderme est coloré en mauve. Les flèches noires pointent la couche basale de l'épiderme et les flèches rouges, la couche cornée.

## Conclusion

Ce projet de recherche doctoral a permis d'établir les PcAUs comme une nouvelle famille de molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires. Le projet a débuté par des expériences avec la tBEU, la première molécule de la famille des PcAUs. Tout d'abord, la tBEU s'est révélée efficace pour réduire l'épaisseur de l'épiderme dans un modèle de peau psoriasique reconstituée alors qu'elle n'avait pas d'effet sur les peaux saines. Des travaux préliminaires ont permis de comprendre que la tBEU et la cHEU, un homologue supérieur, inhibaient l'expression de l'IL-6, une cytokine stimulant l'hyperprolifération des kératinocytes.

Le premier objectif de mon projet était de cribler une chimiothèque de dérivés et homologues de la tBEU (les PcAUs). Ces travaux nous ont permis d'identifier la PcAU-1036 comme étant la plus efficace pour réduire la production de l'IL-6. Le deuxième objectif du projet était de comprendre son mécanisme d'action moléculaire. Les travaux nous ont permis de comprendre que la PcAU-1036 agissait en tant qu'antagoniste de AHR et que AHR était impliqué dans l'inhibition de l'expression de l'IL-6 par ce composé.

Enfin, le dernier objectif du projet était de démontrer le potentiel anti-psoriasique des PcAUs dans deux modèles précliniques de psoriasis. En utilisant un modèle humain de peau psoriasique reconstituée puis un modèle murin de psoriasis induit à l'imiquimod, nos travaux ont permis de prouver que la PcAU-1003 montre des effets bénéfiques dans les deux modèles et pourrait servir de base au développement d'un nouveau traitement anti-psoriasique.

Pour conclure, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse aura permis de mieux comprendre les effets anti-inflammatoires et anti-psoriasiques d'une nouvelle famille de molécules, les PcAUs.

## Bibliographie

- Abel, E. A., DiCicco, L. M., Orenberg, E. K., Fraki, J. E. et Farber, E. M. (1986). Drugs in exacerbation of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15(5 Pt 1), 1007-22. doi:10.1016/S0190-9622(86)70265-X
- Abrouk, M., Nakamura, M., Zhu, T. H., Farahnik, B., Singh, R. K., Lee, K. M., ... Liao, W. (2016). The Patient's Guide to Psoriasis Treatment. Part 3: Biologic Injectables. *Dermatology and Therapy*, 6(3), 325-331. doi:10.1007/s13555-016-0131-8
- Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., ... Matsuda, T. (2001). Indirubin and Indigo are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31475-31478. doi:10.1074/jbc.C100238200
- Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P. et Girolomoni, G. (2018). The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-7. doi:10.3389/fimmu.2018.01549
- Alwawi, E. A., Mehlis, S. L. et Gordon, K. B. (2008). Treating psoriasis with adalimumab. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(2), 345-351. doi:10.2147/tcrm.s1265
- American Association Autoimmune Related Diseases. (2011). *The Cost Burden of Autoimmune Disease*. Repéré à [http://www.diabetesed.net/page/\\_files/autoimmune-diseases.pdf](http://www.diabetesed.net/page/_files/autoimmune-diseases.pdf)
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M. L., Pettersson, S., ... Poellinger, L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9990-9995. doi:10.1073/pnas.152706299
- Arias-Santiago, S., Espiñeira-Carmona, M. J. et Aneiros-Fernández, J. (2013). The Koebner phenomenon: Psoriasis in tattoos. *Cmaj*, 185(7), 585. doi:10.1503/cmaj.111299
- Armstrong, A. W., Harskamp, C. T. et Armstrong, E. J. (2012). The association between psoriasis and obesity: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrition and Diabetes*, 2(12), 1-6. doi:10.1038/nutd.2012.26
- Ayehunie, S., Hedin, C., Landry, T., Cataldo, A., Spratt, M., Clark, R. et Kupper, T. (2012). *Development and Characterization of 3D Psoriatic Tissue Model*. Communication présentée au Society of Investigative Dermatology Meeting (p. 1-5).
- Bakry, O. A., Samaka, R. M., Shoeib, M. A. M. et Aal, S. M. A. (2015). Nuclear factor kappa B and cyclo-oxygenase-2: Two concordant players in psoriasis pathogenesis. *Ultrastructural Pathology*, 39(1), 49-61. doi:10.3109/01913123.2014.952470
- Barker, C. L., McHale, M. T., Gillies, A. K., Waller, J., Pearce, D. M., Osborne, J., ... Pringle, J. H. (2004). The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(5), 892-901. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23435.x

- Barker, J. (1991). The pathophysiology of psoriasis. *The Lancet*, 338, 227-230. doi:0140-6736(91)90357-U [pii]
- Barouki, R., Coumoul, X. et Fernandez-Salguero, P. M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters*, 581(19), 3608-3615. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.046
- Beamer, B. W. G., Pelsue, S. C., Shultz, L. D., Sundberg, J. P. et Barker, J. E. (2018). The Flaky Skin (fsn) Mutation in Mice: Map Location and Description of the Anemia. *Blood*, 86(8), 3220-3227.
- Beischlag, T. V, Luis Morales, J., Hollingshead, B. D. et Perdew, G. H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 18(3), 207-250. doi:10.2964/jsik.kuni0223
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., ... Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235-238. doi:10.1038/nature04753
- Blauvelt, A. (2017). IL-6 Differs from TNF- $\alpha$ : Unpredicted Clinical Effects Caused by IL-6 Blockade in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(3), 541-542. doi:10.1016/j.jid.2016.11.022
- Boehncke, W.-H. et Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997), 983-994. doi:10.1016/S0140-6736(14)61909-7
- Boukamp, P, Popp, S., Bleuel, K., Tomakidi, E., Bürkle, A. et Fusenig, N. E. (1999). Tumorigenic conversion of immortal human skin keratinocytes (HaCaT) by elevated temperature. *Oncogene*, 18(41), 5638-45. doi:10.1038/sj.onc.1202934
- Boukamp, Petra, Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. et Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology*, 106(3), 761-771. doi:10.1083/jcb.106.3.761
- Boyman, O., Hefti, H. P., Conrad, C., Nickoloff, B. J., Suter, M. et Nestle, F. O. (2004). Spontaneous Development of Psoriasis in a New Animal Model Shows an Essential Role for Resident T Cells and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine*, 199(5), 731-736. doi:10.1084/jem.20031482
- Bradshaw, T. D. et Bell, D. R. (2009). Relevance of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) for clinical toxicology. *Clinical Toxicology*, 47(7), 632-642. doi:10.1080/15563650903140423
- Braun, J. et Sieper, J. (2003). Role of novel biological therapies in psoriatic arthritis: Effects on joints and skin. *BioDrugs*, 17(3), 187-199. doi:10.2165/00063030-200317030-00005
- Burbach, K. M., Poland, A. et Bradfield, C. A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 8185-8189. doi:10.1073/pnas.89.17.8185

- Burness, C. B. et McKeage, K. (2015). Adalimumab: A Review in Chronic Plaque Psoriasis. *Drugs*, 75(18), 2119-2130. doi:10.1007/s40265-015-0503-x
- Camporeale, A. et Poli, V. (2012). IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Frontiers in bioscience*, 17(7), 2306-2326.
- Candi, E., Schmidt, R. et Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(4), 328-40. doi:10.1038/nrm1619
- Céspedes, M. A., Galindo, M. I. et Couso, J. P. (2010). Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE*, 5(11), 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0015382
- Chaplin, D. D. (2015). Overview of the Immune Response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 826-828. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview
- Chen, P. H., Chang, H., Chang, J. T. et Lin, P. (2012). Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer. *Oncogene*, 31(20), 2555-2565. doi:10.1038/onc.2011.438
- Chen, Z. H., Hurh, Y. J., Na, H. K., Kim, J. H., Chun, Y. J., Kim, D. H., ... Surh, Y. J. (2004). Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, 25(10), 2005-2013. doi:10.1093/carcin/bgh183
- Cho, J.-W., Lee, K.-S. et Kim, C.-W. (2007). Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *International journal of molecular medicine*, 19(3), 469-474. doi:10.3892/ijmm.19.3.469
- Choi, E.-Y., Lee, H., Dingle, R. W. C., Kim, K. B. et Swanson, H. I. (2012). Development of Novel CH223191-Based Antagonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology*, 81(1), 3-11. doi:10.1124/mol.111.073643
- Cikes, N. (2000). Systemic lupus erythematosus. *Reumatizam*, 47(2), 11-17. doi:10.1007/978-3-030-23022-7\_9
- Dahlman-Ghozlan, K., Ortome, J. P., Heilborn, J. D. et Stephansson, E. (2004). Altered tissue expression pattern of cell adhesion molecules, ICAM-1, E-selectin and VCAM-1, in bullous pemphigoid during methotrexate therapy. *Experimental Dermatology*, 13(2), 65-69. doi:10.1111/j.0906-6705.2004.00113.x
- Danilenko, D. M. (2008). Review paper: preclinical models of psoriasis. *Veterinary pathology*, 45(4), 563-575. doi:10.1354/vp.45-4-563
- Davarinos, N. A. et Pollenz, R. S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28708-28715. doi:10.1074/jbc.274.40.28708
- de Benedetti, F., Massa, M., Robbioni, P., Ravelli, A., Burgio, G. R. et Martini, A. (1991).

Correlation of Serum Interleukin-6 Levels with Joint Involvement and Thrombocytosis in Systemic Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 34(9), 1158-1163. doi:10.1002/art.1780340912

- De Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L. J. M., Kucharekova, M., Pfundt, R., Van Der Valk, P. G., Blox, W., ... Schalkwijk, J. (2005). High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(6), 1163-1173. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23935.x
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P. et Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 141(1-2), 3-24. doi:10.1016/S0009-2797(02)00063-7
- Deyrieux, A. F. et Wilson, V. G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, 54(2), 77-83. doi:10.1007/s10616-007-9076-1
- Diehl, S. et Rincón, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*, 39(9), 531-536. doi:10.1016/S0161-5890(02)00210-9
- DiMeglio, P., Duarte, J. H., Ahlfors, H., Owens, N. D. L., Li, Y., Villanova, F., ... Stockinger, B. (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity*, 40(6), 989-1001. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.019
- DiNatale, B. C., Schroeder, J. C., Francey, L. J., Kusnadi, A. et Perdew, G. H. (2010). Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24388-24397. doi:10.1074/jbc.M110.118570
- DiNatale, B. C., Smith, K., Kaarthick, J., Krishnegowda, G., Amin, S. G. et Perdew, G. H. (2012). Ah receptor antagonism represses head and neck tumor cell aggressive phenotype. *Molecular Cancer Research*, 10(10), 1369-1379. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0216.Ah
- Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K. W., Barouki, R. et Transy, C. (2006). Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene*, 25(40), 5570-5574. doi:10.1038/sj.onc.1209553
- Dolwick, K. M., Swanson, H. I. et Bradfield, C. A. (1993). In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), 8566-70.
- Dou, R., Liu, Z., Yuan, X., Xiangfei, D., Bai, R., Bi, Z., ... Mao, C. (2017). PAMs ameliorates the imiquimod-induced psoriasis-like skin disease in mice by inhibition of translocation of NF- $\kappa$ B and production of inflammatory cytokines, 1-19.
- Dubois Declercq, S. et Pouliot, R. (2013). Promising new treatments for psoriasis. *The*



*Scientific World Journal*, 1-9.

- Duell, E. A., Ellis, C. N. et Voorhees, J. J. (1988). Determination of 5,12, and 15-Lipoxygenase Products in Keratomed Biopsies of Normal and Psoriatic Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 91(5), 446-450. doi:10.1111/1523-1747.ep12476562
- Duque, G. A. et Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1-12. doi:10.3389/fimmu.2014.00491
- Eagle, K. (2017). Psoriatic Arthritis. *Images in Clinical Medecine*, 333(5), 297. doi:10.1056/NEJMicm1704705
- Eckert, R. L. et Rorket, E. A. (1989). Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation. *Environmental Health Perspectives*, 80, 109-116. doi:10.1289/ehp.8980109
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M. et Rorke, E. a. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(3), 481-492. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23627.x
- Ekman, A. K., Vegfors, J., Bivik Eding, C. et Enerbäck, C. (2017). Overexpression of psoriasin (S100A7) contributes to dysregulated differentiation in psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica*, 97(4), 441-448. doi:10.2340/00015555-2596
- Elder, J. T., Sartor, C. I., Boman, D. K., Benrazavi, S., Fisher, G. J. et Pittelkow, M. R. (1992). Interleukin-6 in psoriasis: expression and mitogenicity studies. *Archives of Dermatological Research*, 284(6), 324-332. doi:10.1007/BF00372034
- Fernandez-Salguero, P. . (1997). Lesions of Aryl-Hydrocarbon Receptor-deficient Mice. *Veterinary pathology*, 34(6), 605-614.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. et Girardin, S. E. (2007). Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147(2), 227-235. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x
- Fritz, Y., Klenotic, P. A., Swindell, W. R., Yin, Z., Groft, S. G., Baliwag, J., ... Ward, N. L. (2017). Induction of alternative proinflammatory cytokines accounts for sustained psoriasiform skin inflammation in IL-17C+IL-6KO mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(3), 696-705. doi:10.1016/j.jid.2016.10.021.Induction
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stähle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H. et Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15258-15263. doi:10.1074/jbc.272.24.15258
- Fujishima, S., Watanabe, H., Kawaguchi, M., Suzuki, T., Matsukura, S., Homma, T., ... Iijima, M. (2010). Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 302(7), 499-505. doi:10.1007/s00403-010-1033-8
- Fusenig, N. E. et Boukamp, P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in

immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*, 23(3), 144-158. doi:10.1002/(SICI)1098-2744(199811)23:3<144::AID-MC3>3.0.CO;2-U

Gendreau, I. (2015). *Études Dermopharmacologiques D'Une Nouvelle Molécule Destinée Au Traitement Du Psoriasis Grâce À L'Utilisation D'Un Modèle De Substitut Cutané Pathologique Optimisé*. Université Laval.

Gladman, D. D. et Chandran, V. (2011). Review of Clinical Registries of Psoriatic Arthritis: Lessons Learned? Value for the Future? *Current Rheumatology Reports*, 13(4), 346-352. doi:10.1007/s11926-011-0182-x

Glickman, F. S. (1986). Lepra, psora, psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 14(5), 863-866. doi:10.1016/S0190-9622(86)70101-1

Gonzalez Ortiz, N. E., Nijhawan, R. I. et Weinberg, J. M. (2013). Acitretin. *Dermatologic Therapy*, 26(5), 390-399.

Goodman, W. A., Levine, A. D., Massari, J. V., Sugiyama, H., McCormick, T. S. et Cooper, K. D. (2009). IL-6 Signaling in Psoriasis Prevents Immune Suppression by Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3170-3176. doi:10.4049/jimmunol.0803721

Grasland, A., Mahé, E., Raynaud, E. et Mahé, I. (2013). Psoriasis onset with tocilizumab. *Joint Bone Spine*, 80(5), 541-542. doi:10.1016/j.jbspin.2013.03.014

Griffiths, C., Barker, J., Bleiker, T., Chalmers, R. et Cream, D. (2016). *Rook's Textbook of Dermatology*.

Grine, L., Dejager, L., Libert, C. et Vandenbroucke, R. E. (2015). An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(1), 25-33. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.10.009

Gross, V., Andus, T., Caesar, I., Roth, M. et Schölmerich, J. (1992). Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 102(2), 514-519. doi:10.1016/0016-5085(92)90098-J

Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., ... Gottlieb, a B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86(16), 6367-6371. doi:10.1073/pnas.86.16.6367

Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H. et Elder, J. T. (2007). Mouse Models of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(6), 1292-1308. doi:10.1038/sj.jid.5700807

Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A. et Perera, S. A. (2002). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13743-13748. doi:10.1073/pnas.94.25.13743

- Hawkes, J. E., Adalsteinsson, J. A., Gudjonsson, J. E. et Ward, N. L. (2018). Research Techniques Made Simple: Murine Models of Human Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(1), e1-e8. doi:10.1016/j.jid.2017.10.013
- Hengge, U. R., Ruzicka, T., Schwartz, R. A. et Cork, M. J. (2006). Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(1), 1-18. doi:10.1016/j.jaad.2005.01.010
- Henry, E. C. (2003). Agonist but Not Antagonist Ligands Induce Conformational Change in the Mouse Aryl Hydrocarbon Receptor as Detected by Partial Proteolysis. *Molecular Pharmacology*, 63(2), 392-400. doi:10.1124/mol.63.2.392
- Herman, S., Shin, M., Holbrook, A. et Rosenthal, D. (2006). The role of antimalarials in the exacerbation of psoriasis: A systematic review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 7(4), 249-257. doi:10.2165/00128071-200607040-00006
- Herman, S., Zurgil, N. et Deutsch, M. (2005). Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflammation Research*, 54(7), 273-280. doi:10.1007/s00011-005-1355-8
- Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., ... Kishimoto, T. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 18(11), 1797-1802. doi:10.1002/eji.1830181122
- Hirobe, T. (2014). Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica*, 32(4), 200-204. doi:10.1016/j.dsi.2014.05.002
- Hogenesch, H., Janke, S., Boggess, D. et Sundberg, J. P. (1999). Absence of Peyer's patches and abnormal lymphoid architecture in chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm) mice. SHARPIN deficiency LUBAC component low IgE, eosinophilic dermatitis. *Journal of immunology*, 162, 3890-3896.
- Hogenesch, H., Torregrosa, S. E., Boggess, D., Sundberg, B. A., Carroll, J. et Sundberg, J. P. (2001). Increased expression of type 2 cytokines in chronic proliferative dermatitis (cpdm) mutant mice and resolution of inflammation following treatment with IL-12. *European Journal of Immunology*, 31(3), 734-742. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<734::AID-IMMU734>3.0.CO;2-9
- Holbrook, J., Lara-reyna, S., Jarosz-griffiths, H. et Mcdermott, M. F. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000 Research*, 8(111), 1-12.
- Hollingshead, B. D. B. D., Beischlag, T. V. T. V., DiNatale, B. C. B. C., Ramadoss, P. et Perdew, G. H. G. H. (2008). Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer research*, 68(10), 3609. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6168.Inflammatory
- Hoy, S. M. et Scott, L. J. (2007). Etanercept: A review of its use in the management of ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Drugs*, 67(17), 2609-2633. doi:10.2165/00003495-200767170-00009

- Huang, Z. J., Edery, I. et Rosbash, M. (1993). PAS is a novel dimerization domain shared by the *Drosophila* period protein and by several transcription factors. *Nature*, 364(July), 259-262.
- Hunter, C. A. et Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Publishing Group*, 16(5), 448-457. doi:10.1038/ni.3153
- Ikuta, T., Kobayashi, Y. et Kawajiri, K. (2004). Cell Density Regulates Intracellular Localization of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19209-19216. doi:10.1074/jbc.M310492200
- Jansen, P. A. M., Rodijk-Olthuis, D., Hollox, E. J., Kamsteeg, M., Tjabringa, G. S., de Jongh, G. J., ... Schalkwijk, J. (2009).  $\beta$ -Defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. *PLoS ONE*, 4(3). doi:10.1371/journal.pone.0004725
- Jayasekera, P., Parslew, R. et Al-Sharqi, A. (2014). A case of tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitor- and rituximab-induced plantar pustular psoriasis that completely resolved with tocilizumab. *British Journal of Dermatology*, 171(6), 1546-1549. doi:10.1111/bjd.13146
- Jean, J., Garcia-Pérez, M. E. et Pouliot, R. (2012). Bioengineered Skin: The Self-Assembly Approach. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 03(05), 1-10. doi:10.4172/2157-7552.s5-001
- Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J. et Pouliot, R. (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *Journal of Dermatological Science*, 53(1), 19-25. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.07.009
- Jordan, C. T., Cao, L., Roberson, E. D. O., Pierson, K. C., Yang, C. F., Joyce, C. E., ... Bowcock, A. M. (2012). PSORS2 is due to mutations in CARD14. *American Journal of Human Genetics*, 90(5), 784-795. doi:10.1016/j.ajhg.2012.03.012
- Jost, P. J. et Ruland, J. (2007). Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma : mechanisms , consequences , and therapeutic implications. *Blood*, 109(7), 2700-2708. doi:10.1182/blood-2006-07-025809.
- Jullien, D., Prinz, J. C. et Nestle, F. O. (2015). Immunogenicity of biotherapy used in psoriasis: The science behind the scenes. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(1), 31-38. doi:10.1038/jid.2014.295
- Kaarthick, J., Lahoti, T. S., Wagner, K., Hughes, J. et Perdew, G. H. (2014). The Ah Receptor Regulates Growth Factor Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Physiology & behavior*, 53(10), 765-776. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
- Kalb, R. E., Strober, B., Weinstein, G. et Lebwohl, M. (2009). Methotrexate and psoriasis: 2009 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(5), 824-837. doi:10.1016/j.jaad.2008.11.906
- Kany, S., Vollrath, J. T. et Relja, B. (2019). Cytokines in inflammatory disease.

- Kazlauskas, A., Poellinger, L. et Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13519-13524. doi:10.1074/jbc.274.19.13519
- Kemanetzoglou, E. et Andreadou, E. (2017). CNS Demyelination with TNF- $\alpha$  Blockers. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(4). doi:10.1007/s11910-017-0742-1
- Kemény, L., Csoma, Z., Bagdi, E., Banham, a. H., Krenács, L. et Koreck, a. (2010). Targeted phototherapy of plaque-type psoriasis using ultraviolet B-light-emitting diodes. *British Journal of Dermatology*, 163(1), 167-173. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09763.x
- Keystone, E. et Omair, M. A. (2015). Interleukin-6 inhibition. Dans *Rheumatology (Sixth Edition)* (p. 485-491).
- Kim, C.-H., Kim, J.-Y. et Lee, A.-Y. (2015). Therapeutic and immunomodulatory effects of glucosamine in combination with low-dose cyclosporine A in a murine model of imiquimod-induced psoriasis. *European Journal of Pharmacology*, 756, 43-51. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.010
- Kim, S., Henry, E. C., Kim, D., Kim, Y., Shin, K. J., Han, M. S., ... Suh, P. (2006). Novel Compound 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic Acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) Prevents 2,3,7,8-TCDD-Induced Toxicity by Antagonizing the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology*, 69(6), 1871-1878. doi:10.1124/mol.105.021832.1997
- Kimura, A. et Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1830-1835. doi:10.1002/eji.201040391
- Kira, S. H. A. et Akira, S. (2013). Regnase-1, a Ribonuclease Involved in the Regulation of Immune Responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, LXXVIII, 1-11. doi:10.1101/sqb.2013.78.019877
- Kluger, N., Estève, E., Fouéré, S., Dupuis-Fourdan, F., Jegou, M. H. et Lévy-Rameau, C. (2017). Tattooing and psoriasis: a case series and review of the literature. *International Journal of Dermatology*, 56(8), 822-827. doi:10.1111/ijd.13646
- Kolluri, S. K., Jin, U.-H. et Safe, S. (2017). Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as an Anti-Cancer Drug Target Siva. *Archives of Toxicology*, 91(7), 2497-2513. doi:10.1109/EMBC.2016.7590696.Upper
- Kolluri, S. K., Weiss, C., Koff, A. et Göttlicher, M. (1999). p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes and Development*, 13(13), 1742-1753. doi:10.1101/gad.13.13.1742
- Konstantinova, N. V., Duong, D. M. T., Remenyik, E., Hazarika, P., Chuang, A. et Duvic, M. (1996). Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(4), 615-621. doi:10.1111/1523-1747.ep12584215

- Koster, M. I. (2009). Making an epidermis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170(303), 7-10. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04363.x
- Krueger, G. G. et Jorgensen, C. M. (1990). Experimental models for psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, 95(5 Suppl), 56S-58S. doi:10.1111/1523-1747.ep12505791
- Kung, T., Murphy, K. A. et White, L. A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 536-546. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.031
- Kupper, T. S., Min, K., Sehgal, P., Mizutani, H., Birchall, N. et Ray, A. (1989). Production of IL-6 by Keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 557(1), 454-465. doi:10.1111/j.1749-6632.1989.tb24038.x
- Kurd, S. K., Troxel, A. B., Crits-christoph, P. et Gelfand, J. M. (2011). The risk of depression, anxiety and suicidality in patients with psoriasis: A population-based cohort study. *Arch Dermatol.*, 146(8), 891-895. doi:10.1001/archdermatol.2010.186.The
- Lahvis, G. P., Lindell, S. L., Thomas, R. S., McCuskey, R. S., Murphy, C., Glover, E., ... Bradfield, C. A. (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19), 10442-10447. doi:10.1073/pnas.190256997
- Lahvis, G. P., Pyzalski, R. W., Glover, E., Pitot, H. C., McElwee, M. K. et Bradfield, C. A. (2005). The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. *Molecular pharmacology*, 67(3), 714-20. doi:10.1124/mol.104.008888
- Langley, R. G. B. (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(suppl\_2), ii18-ii23. doi:10.1136/ard.2004.033217
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. et Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open*, 7, 1-9. doi:10.1016/j.biopen.2018.05.001
- Lebwohl, M. (1999). The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *International Journal of Dermatology*, 38(1), 16-24. doi:10.1046/j.1365-4362.1999.00500.x
- Lebwohl, M. (2003). Psoriasis. *The Lancet*, 361(9364), 1197-1204. doi:10.1016/S0140-6736(03)12954-6
- Lee, J. L., Mukhtar, H., Bickers, D. R., Kopelovich, L. et Athar, M. (2003). Cyclooxygenases in the skin: Pharmacological and toxicological implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(3), 294-306. doi:10.1016/S0041-008X(03)00301-6
- Leigh, I. M., Navsaria, H., Purkis, P. E., McKay, I. A., Bowden, P. E. et Riddle, P. N. (1995). Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *British Journal of Dermatology*, 133(4), 501-511.

doi:10.1111/j.1365-2133.1995.tb02696.x

- Li, W., Han, J., Choi, H. K. et Qureshi, A. A. (2012). Smoking and risk of incident psoriasis among women and men in the United States: A combined analysis. *American Journal of Epidemiology*, 175(5), 402-413. doi:10.1093/aje/kwr325
- Lin, Y.-K., Yang, S.-H., Chen, C.-C., Kao, H.-C. et Fang, J.-Y. (2015). Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. *Plos One*, 10(9), e0137890. doi:10.1371/journal.pone.0137890
- Lindroos, J., Svensson, L., Norsgaard, H., Lovato, P., Moller, K., Hagedorn, P. H., ... Labuda, T. (2011). IL-23-mediated epidermal hyperplasia is dependent on IL-6. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(5), 1110-1118. doi:10.1038/jid.2010.432
- Lorthoix, I., Simard, M., Morin, S. et Pouliot, R. (2019). Infiltration of T cells into a three-dimensional psoriatic skin model mimics pathological key features. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). doi:10.3390/ijms20071670
- Lowes, M. A., Suárez-Farinas, M. et Krueger, J. G. (2014). Immunology of Psoriasis. *Annual review of immunology*, 32, 227-255. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120225.Immunology
- Ma, Q. et Whitlock, J. P. (2015). The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5), 2144-2150. doi:10.1128/mcb.16.5.2144
- Madison, K. C. (2003). Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), 231-241. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x
- Mahé, E., MacCari, F., Beauchet, A., Lahfa, M., Barthelemy, H., Reguiaï, Z., ... Sigal, M. L. (2013). Childhood-onset psoriasis: Association with future cardiovascular and metabolic comorbidities. *British Journal of Dermatology*, 169(4), 889-895. doi:10.1111/bjd.12441
- Mahida, Y. R., Kurlac, L., Gallagher, A. et Hawkey, C. J. (1991). High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut*, 32(12), 1531-1534. doi:10.1136/gut.32.12.1531
- Malten, K. E. et den Arend, J. (1978). Topical toxicity of various concentrations of DMSO recorded with impedance measurements and water vapour loss measurements Recording of skin's adaptation to repeated DMSO irritation. *Contact Dermatitis*, 4(2), 80-92. doi:10.1111/j.1600-0536.1978.tb03740.x
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., ... Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T H17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231-234. doi:10.1038/nature04754
- Marlowe, J. L., Knudsen, E. S., Schwemberger, S. et Puga, A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28),

29013-29022. doi:10.1074/jbc.M404315200

- Masuda, K., Ripley, B., Nishimura, R., Mino, T., Takeuchi, O., Shioi, G., ... Kishimoto, T. (2013). Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), 9409-9414. doi:10.1073/pnas.1307419110
- Mathes, S. H., Ruffner, H. et Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69-70, 81-102. doi:10.1016/j.addr.2013.12.006
- Matsuda, S. et Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 119-125. doi:10.1016/S0162-3109(00)00192-2
- Matsuda, S., Moriguchi, T., Koyasu, S. et Nishida, E. (1998). T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12378-12382. doi:10.1074/jbc.273.20.12378
- Mease, P. J., Gladman, D. D., Papp, K. A., Khraishi, M. M., Thaçi, D., Behrens, F., ... Alvarez, D. (2013). Prevalence of rheumatologist-diagnosed psoriatic arthritis in patients with psoriasis in European/North American dermatology clinics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(5), 729-735. doi:10.1016/j.jaad.2013.07.023
- Menter, A., Korman, N., Elmets, C., Feldman, S., Gelfand, J. M., Gordon, K. B., ... Voorhees, A. S. Van. (2009). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. *Journal of American Dermatology*, 60(4), 643-659. doi:10.1016/j.jaad.2008.12.032
- Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P. et Perdew, G. H. (1998). Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 18(2), 978-988. doi:10.1128/mcb.18.2.978
- Miller, I. M., Ellervik, C., Yazdanyar, S. et Jemec, G. B. E. (2013). Meta-analysis of psoriasis, cardiovascular disease, and associated risk factors. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(6), 1014-1024. doi:10.1016/j.jaad.2013.06.053
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. et Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & development*, 13(1), 20-5. doi:10.1101/gad.13.1.20
- Mitra, A. et Atillasoy, E. (2012). Topical Therapies for Psoriasis. *Psoriasis*, 5, 519-525. doi:10.5772/27027
- Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Ittrich, C., Poellinger, L. et Schwarz, M. (2004). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Research*, 64(14), 4707-4710. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-0875



- Morel, Y., Mermoud, N. et Barouki, R. (1999). An Autoregulatory Loop Controlling CYP1A1 Gene Expression : Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NFI. *Molecular and cellular biology*, 19(10), 6825-6832.
- Mori, H., Arita, K., Yamaguchi, T., Hirai, M. et Kurebayashi, Y. (2016). Effects of Topical Application of Betamethasone on Imiquimod-induced Psoriasis-like Skin Inflammation in Mice, 62(4).
- Morizane, S. et Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *Journal of Dermatology*, 39(3), 225-230. doi:10.1038/jid.2014.371
- Moudgil, K. D. et Choubey, D. (2011). Cytokines in autoimmunity: Role in induction, regulation, and treatment. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 31(10), 695-703. doi:10.1089/jir.2011.0065
- Nagpal, S., Thacher, S. M., Patel, S., Friant, S., Malhotra, M., Shafer, J., ... Chandraratna, R. A. S. (1996). Negative regulation of two hyperproliferative keratinocyte differentiation markers by a retinoic acid receptor-specific retinoid: Insight into the mechanism of retinoid action in psoriasis. *Cell Growth and Differentiation*, 7(12), 1783-1791.
- Naldi, L., Chatenoud, L., Linder, D., Fortina, A. B., Peserico, A., Virgili, A. R., ... La Vecchia, C. (2005). Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: Results from an Italian case-control study. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), 61-67. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23681.x
- National Psoriasis Foundation. (2019). Repéré à <https://www.psoriasis.org/about-psoriasis/treatments/topicals>
- Nebert, D. W., Considine, N. et Owens, I. S. (1974). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase Activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 157(1), 148-159. doi:10.1016/0003-9861(73)90400-1
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z. et Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 679-691. doi:10.1038/nri2622
- Neuner, P., Urbanski, A., Trautinger, F., Möller, A., Kirnbauer, R., Kapp, A., ... Luger, T. A. (1991). Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 97(1), 27-33.
- Newton, K. et Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). doi:10.1101/cshperspect.a006049
- Nguyen, N. T., Nakahama, T., Le, D. H., Van Son, L., Chu, H. H. et Kishimoto, T. (2014). Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: Recent advances in autoimmune disease research. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1-6. doi:10.3389/fimmu.2014.00551
- Ogata, A., Umegaki, N., Katayama, I., Kumanogoh, A. et Tanaka, T. (2012). Psoriatic arthritis in two patients with an inadequate response to treatment with tocilizumab. *Joint Bone Spine*, 79(1), 85-87. doi:10.1016/j.jbspin.2011.06.011

- Onderdijk, A. (2015). *Clinical and Experimental Interventions in Psoriasis*.
- Papoutsaki, M. et Costanzo, A. (2013). Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 27 Suppl 1, 3-12. doi:10.1007/BF03325637
- Park, C. C., Kim, K. J., Woo, S. Y., Chun, J. H. et Lee, K. H. (2009). Comparison of the expression profile of junb, c-Jun, and S100A8 (calgranulin A) in psoriasis vulgaris and guttate psoriasis. *Annals of Dermatology*, 21(1), 35-38. doi:10.5021/ad.2009.21.1.35
- Pasare, C. et Medzhitov, R. (2003). Toll Pathway – Dependent Blockade of CD4+ CD25+ T Cell–Mediated Suppression by Dendritic Cells. *Science (New York, N.Y.)*, 299(February), 1033-1036. doi:10.1126/science.1078231
- Perera, G. K., Di Meglio, P. et Nestle, F. O. (2012). Psoriasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 385-422. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132448
- Pol, A., Bergers, M. et Schalkwijk, J. (2003). Comparison of Antiproliferative Effects of Experimental and Established Antipsoriatic Drugs on Human Keratinocytes , Using a Simple 96-Well-Plate Assay Author ( s ): Arno Pol , Mieke Bergers and Joost Schalkwijk Source : In Vitro Cellular & Developmental. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 39(1), 36-42.
- Prey, S., Paul, C., Bronsard, V., Puzenat, E., Gourraud, P. a., Aractingi, S., ... Ortonne, J. P. (2010). Cardiovascular risk factors in patients with plaque psoriasis: A systematic review of epidemiological studies. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24(Suppl. 2), 23-30. doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03564.x
- Qin, H. et Powell-Coffman, J. A. (2004). The Caenorhabditis elegans aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Developmental Biology*, 270(1), 64-75. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.004
- Qin, H., Zhai, Z. et Powell-Coffman, J. A. (2006). The Caenorhabditis elegans AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Developmental Biology*, 298(2), 606-615. doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.017
- Rachakonda, T. D., Schupp, C. W. et Armstrong, A. W. (2014). Psoriasis prevalence among adults in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(3), 512-516. doi:10.1016/j.jaad.2013.11.013
- Rajan, N. et Langtry, J. A. (2006). Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. *Clinical and experimental dermatology*, 31(1), 140-141. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01938.x
- Rather, I. A., Bajpai, V. K., Han, J. et Nam, G.-J. (2016). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mouse model. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(4), 849. doi:10.3329/bjp.v11i4.28662
- Ratini, M. (2019). How Does Psoriatic Arthritis Affect Your Body? Repéré à

<https://www.webmd.com/arthritis/psoriatic-arthritis/ss/slideshow-psoriatic-arthritis-body>

- Raychaudhuri, S. P. et Farber, E. M. (2001). The prevalence of psoriasis in the world. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 15(1), 16-17. doi:10.1046/j.1468-3083.2001.00192.x
- Raychaudhuri, S. P., Jiang, W.-Y. et Raychaudhuri, S. K. (2008). Revisiting the Koebner Phenomenon. *The American Journal of Pathology*, 172(4), 961-971. doi:10.2353/ajpath.2008.070710
- Reich, K., Yasothan, U. et Kirkpatrick, P. (2009). Ustekinumab. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(5), 355-356. doi:10.1038/nrd2878
- Reinisch, W. (1999). Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: Single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *American Journal of Gastroenterology*, 94(8), 2156-2164. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01288.x
- Reyes, H., Reisz-porszasz, S. et Hankinsont, O. (1992). Identification of the Ah Receptor Nuclear Translocator Protein ( Arnt ) as a Component of the DNA Binding Form of the Ah Receptor. *Science*, 256(5060), 1193-1195.
- Robinson, J. R., Nebert, W., Rf, J., Akr, N., Akr, J., Hen, C. H. et Hn, C. B. A. (1974). Generic Expression of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction. *J. Biol. Chem.*, 249(18), 5851-5859.
- Rose-John, S. (2012). Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1237-1247. doi:10.7150/ijbs.4989
- Rueda-Gotor, J., González-Gay, M. A., Blanco Alonso, R., Gonzalez-Vela, C., Lopez-Obregon, C. et González-López, M. A. (2012). Successful effect of tocilizumab in anti-TNF- $\alpha$ -induced palmoplantar pustulosis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 79(5), 510-513. doi:10.1016/j.jbspin.2012.06.010
- Saggini, A., Chimenti, S. et Chiricozzi, A. (2014). IL-6 as a druggable target in psoriasis: Focus on pustular variants. *Journal of Immunology Research*, 2014. doi:10.1155/2014/964069
- Schaldach, C. M., Riby, J. et Bjeldanes, L. F. (1999). Lipoxin A4: A new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, 38(23), 7594-7600. doi:10.1021/bi982861e
- Schaper, K., Dickhaut, J., Japtok, L., Kietzmann, M., Mischke, R., Kleuser, B. et Bäumer, W. (2013). Sphingosine-1-phosphate exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects in mouse models of psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 71(1), 29-36. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.03.006
- Scheinfeld, N. (2005). Adalimumab: a review of side effects. *Expert opinion on drug safety*, 4(December), 637-641. doi:10.1517/14740338.4.4.637

- Schmidt, J. V., Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C. et Bradfield, C. A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6731-6736. doi:10.1073/pnas.93.13.6731
- Schoepe, S., Schäcke, H., May, E. et Asadullah, K. (2006). Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Experimental Dermatology*, 15(6), 406-420. doi:10.1111/j.0906-6705.2006.00435.x
- Schön, M. . et Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology*, 157, 8-13. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x
- Schonthaler, H. B., Guinea-Viniegra, J., Wculek, S. K., Ruppen, I., Ximénez-Embún, P., Guío-Carrión, A., ... Wagner, E. F. (2013). S100A8-S100A9 Protein Complex Mediates Psoriasis by Regulating the Expression of Complement Factor C3. *Immunity*, 39(6), 1171-1181. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.011
- Schoop, V. M., Mirancea, N. et Fusenig, N. E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCat keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(3), 343-353. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x
- Schroeder, J. C., DiNatale, B. C., Murray, I. A., Flaveny, C. A., Liu, Q., Laurenzana, E. M., ... Perdew, G. H. (2010). The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry*, 49(2), 393-400. doi:10.1021/bi901786x
- Sezer, E., Böer-Auer, A., Cetin, E., Tokat, F., Durmaz, E., Sahin, S. et Ince, U. (2015). Diagnostic utility of Ki-67 and Cyclin D1 immunostaining in differentiation of psoriasis vs. other psoriasiform dermatitis. *Dermatology Practical & Conceptual*, 5(3), 7-13. doi:10.5826/dpc.0503a02
- Shehzad, A., Wahid, F. et Lee, Y. S. (2011). The targets of curcumin. *Current Drug Targets*, 12(3), 332-47.
- Shimba, S., Komiyama, K., Moro, I. et Tezuka, M. (2002). Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) accelerates the cell proliferation of A549 cells. *Journal of Biochemistry*, 132(5), 795-802. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003289
- Sinal, C. J. et Bend, J. R. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of Cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Molecular Pharmacology*, 52(4), 590-599. doi:10.1124/mol.52.4.590
- Slagel, G. A., Corps, M., James, W. D. et Corps, M. (1985). Adverse reactions Plaquenil-induced erythroderma \*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 857-862.
- Smith, K. J., Murray, I. A., Tanos, R., Tellew, J., Boitano, A. E., Bisson, W. H., ... Perdew, G. H. (2011). Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(1), 318-327. doi:10.1124/jpet.110.178392

- Smolen, J. S., Aletaha, D. et McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 388(10055), 2023-2038. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
- Song, J., Clagett-Dame, M., Peterson, R. E., Hahn, M. E., Westler, W. M., Sicinski, R. R. et DeLuca, H. F. (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14694-14699. doi:10.1073/pnas.232562899
- Srinivasan, A., Selvarajan, S. et Dkhar, S. A. (2017). The Pleiotropic Effects of Curcumin. *International Journal of Advanced Research*, 5(7), 2749-2756. doi:10.21474/ijar01/5020
- Stevens, E. A., Mezrich, J. D. et Bradfield, C. A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: A perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, 127(3), 299-311. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x
- Sticherling, M., Sautier, W., Schröder, J. M. et Christophers, E. (1999). Interleukin-8 plays its role at local level in psoriasis vulgaris. *Acta Dermato-Venereologica*, 79(1), 4-8. doi:10.1080/000155599750011606
- Sundberg, J. P., Boggess, D., Shultz, L. D., Fineman, R. J. A., Demant, P., Hogenesch, H. et Cox, G. A. (2000). The chronic proliferative dermatitis mouse mutation (cpdm): mapping of the mutant gene locus. *Journal of Experimental Animal Science*, 41, 101-108.
- Takahashi, H., Ibe, M., Kinouchi, M., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y. et Iizuka, H. (2003). Similarly potent action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues, tacalcitol, calcipotriol, and maxacalcitol on normal human keratinocyte proliferation and differentiation. *Journal of Dermatological Science*, 31(1), 21-28. doi:10.1016/S0923-1811(02)00136-6
- Tanaka, N., Fujioka, A., Tajima, S., Ishibashi, A. et Hirose, S. (2000). Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: Interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  stimulate its secretion in vitro. *British Journal of Dermatology*, 143(4), 728-732. doi:10.1046/j.1365-2133.2000.03766.x
- Tanaka, T., Narazaki, M. et Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), 1-16.
- Tjabringa, G., Bergers, M., van Rens, D., De Boer, R., Lamme, E. et Schalkwijk, J. (2008). Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *American Journal of Pathology*, 173(3), 815-823. doi:10.2353/ajpath.2008.080173
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F. et Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389, 1741-1755. doi:10.1016/S0140-6736(16)31711-1
- Tsai, Y.-C. et Tsai, T.-F. (2017). Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 9(11), 277-294. doi:10.1177/https
- Tsankov, N. K., Kazandjieva, J. et Drenovska, K. (1998). Drugs in exacerbation and

- provocation of psoriasis. *Clinics in Dermatology*, 16(3), 333-351. doi:10.1016/S0738-081X(98)00005-4
- Turksen, K., Kupper, T., Degenstein, L., Williams, I. et Fuchs, E. (1992). Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 5068-5072. doi:10.1073/pnas.89.11.5068
- Ubranski, A., Schwarz, T., Neuner, P., Krutmann, J., Kirnbauer, R., Köck, A. et Luger, T. A. (1990). Ultraviolet Light Induces Increased Circulating Interleukin-6 in Humans. *Journal of Investigative Dermatology*, 94(6), 808-811.
- Uva, L., Miguel, D., Pinheiro, C., Antunes, J., Cruz, D., Ferreira, J. et Filipe, P. (2012). Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. *International Journal of Endocrinology*, 2012(iv). doi:10.1155/2012/561018
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., ... Lubberts, E. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5836-5845. doi:10.4049/jimmunol.0802999
- Vivier, A. (1976). Tachyphylaxis to Topically Applied Steroids. *Archives of Dermatology*, 112(9), 1245-1248. doi:10.1001/archderm.1976.01630330015002
- Vogel, C. F. A., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G. et Matsumura, F. (2007). ReIB , a New Partner of Aryl Hydrocarbon, 21(12), 2941-2955. doi:10.1210/me.2007-0211
- Wagner, E. F., Schonthaler, H. B., Guinea-Viniegra, J. et Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(12), 704-714. doi:10.1038/nrrheum.2010.157
- Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., ... van den Broek, M. (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature communications*, 4, 1560. doi:10.1038/ncomms2566
- Wang, X., Sun, J. et Hu, J. (2015). IMQ Induced K14-VEGF Mouse: A Stable and Long-Term Mouse Model of Psoriasis-Like Inflammation. *Plos One*, 10(12), e0145498. doi:10.1371/journal.pone.0145498
- Webb, E. (2014). Structural and Functional Characterization of the Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Binding Domain by Homology Modeling and Mutational Analysis, 46(3), 101-114. doi:10.1021/bi061460t.Structural
- Wei, Y. D., Helleberg, H., Rannug, U. et Rannug, A. (1998). Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chemico-Biological Interactions*, 110(1-2), 39-55. doi:10.1016/S0009-2797(97)00111-7
- Wei, Y. D., Rannug, U. et Rannug, A. (1999). UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chemico-Biological Interactions*, 118(2), 127-140. doi:10.1016/S0009-2797(98)00118-5

- Weichenthal, M. et Schwarz, T. (2005). Phototherapy: How does UV work? *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 21(5), 260-266. doi:10.1111/j.1600-0781.2005.00173.x
- Weinstein, G. D. et Van Scott, E. J. (1965). Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 45(4), 257-62.
- Weller, R., Hunter, J., Savin, J. et Dahl, M. (2013). *Clinical Dermatology*. doi:10.1002/9781444300086
- Weng, Z., Patel, A. B., Vasiadi, M., Therianou, A. et Theoharides, T. C. (2014). Luteolin inhibits human keratinocyte activation and decreases NF- $\kappa$ B induction that is increased in psoriatic skin. *PLoS ONE*, 9(2), 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0090739
- Wickett, R. R. et Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10), S98-S110. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.295
- Wiles, M. R., Williams, J. et Ahmad, K. A. (2010). Basic Biology of the skin. Dans *Essentials of Dermatology for Chiropractors* (p. 3-14). doi:10.1007/978-3-540-78814-0\_1
- Wilson, E. (1863). *On Diseases of the Skin*.
- Wollina, Q., Pabst, F., Schönlebe, J., Abdel-Naser, M. B., Konrad, H., Gruner, M., ... Schreiber, G. (2007). Side-effects of topical androgenic and anabolic substances and steroids. a short review. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 16(3), 117-122.
- Wright, E. T. et Winer, L. H. (1966). Topical Application of Dimethyl Sulfoxide (dmsO) to Skin of Guinea Pigs. *Journal of Investigative Dermatology*, 46(4), 409-414. doi:10.1038/jid.1966.60
- Wu, J. K., Siller, G. et Strutton, G. (2004). Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australasian Journal of Dermatology*, 45(1), 47-50. doi:10.1111/j.1440-0960.2004.00030.x
- Young, B., O'Dowd, G. et Woodford, P. (2013). *Wheater's Functional Histology, 6e édition.pdf*.
- Younis, S., Rimar, D., Slobodin, G., Rosner, I., Necrosis, T. et Pustular, F. P. (2012). Tumor Necrosis Factor-associated Palmoplantar Pustular Psoriasis Treated with Interleukin 6 Blocker. *The Journal of Rheumatology*, 39(10), 4-6.
- Yu, H., Pardoll, D. et Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 798-809. doi:10.1038/nrc2734
- Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., DeLuca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., ... Romani, L. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39(2), 372-385.

doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003

- Zhang, H. et Sun, S. C. (2015). NF-kappa B in inflammation and renal diseases. *Cell and Bioscience*, 5(1), 1-12. doi:10.1186/s13578-015-0056-4
- Zhang, N. (2011). The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 2(2), 91-95. doi:10.4103/0975-3583.83033
- Zhang, T., Kimura, Y., Jiang, S., Harada, K., Yamashita, Y. et Ashida, H. (2014). Luteolin modulates expression of drug-metabolizing enzymes through the AhR and Nrf2 pathways in hepatic cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 557, 36-46. doi:10.1016/j.abb.2014.05.023
- Zhang, X. J., Yan, K. L., Wang, Z. M., Yang, S., Zhang, G. L., Fan, X., ... Liu, J. J. (2007). Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2544-2551. doi:10.1038/sj.jid.5700896
- Zhao, B., DeGroot, D. E., Hayashi, A., He, G. et Denison, M. S. (2010). Ch223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (dioxin) receptor. *Toxicological Sciences*, 117(2), 393-403. doi:10.1093/toxsci/kfq217
- Zhu, J., Luo, L., Tian, L., Yin, S., Ma, X., Cheng, S., ... Liang, H. (2018). Aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 expression in inflammatory macrophages through Src-STAT3 signaling pathway. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 1-14. doi:10.3389/fimmu.2018.02033