



HAL
open science

Mécanismes de dérégulation de la polarisation des macrophages et de la résolution de l'inflammation au cours de la cicatrisation de plaies cutanées chez des souris diabétiques de type 2: restauration par application topique d'aspirine

Christophe Dardenne

► **To cite this version:**

Christophe Dardenne. Mécanismes de dérégulation de la polarisation des macrophages et de la résolution de l'inflammation au cours de la cicatrisation de plaies cutanées chez des souris diabétiques de type 2: restauration par application topique d'aspirine. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30358 . tel-01519357

HAL Id: tel-01519357

<https://theses.hal.science/tel-01519357>

Submitted on 6 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité : Physiopathologie

Présentée et soutenue par
Christophe DARDENNE

Le 16 Mars 2015

Titre :
*Mécanismes de dérégulation
de la polarisation des macrophages et de la résolution de l'inflammation
au cours de la cicatrisation de plaies cutanées chez des souris diabétiques de type 2 ;
restauration par application topique d'aspirine*

JURY

Mme Dominique SIGAUDDO-ROUSSEL, Chargée de Recherche, CNRS, LYON - Rapporteur
M. Lhousseine TOUQUI, Directeur de Recherche, Institut PASTEUR, PARIS - Rapporteur
M. Bruno SEGUI, Professeur des Universités, TOULOUSE - Président du jury
Mme Marielle BOUSCHBACHER, Responsable Recherche Amont URGO, DIJON - Examinatrice
M. Michel TREILHOU, Professeur des Universités, ALBI - Examinateur
Mme Agnès COSTE, Maître de Conférences, TOULOUSE - Examinatrice
M. Bernard PIPY, Directeur de Recherche INSERM, TOULOUSE - Examinateur

Ecole doctorale : Biologie Santé Biotechnologies

Unité de recherche : UMR 152 équipe MRN2I

Directeur(s) de Thèse : Mme Agnès COSTE et M. Bernard PIPY

Rapporteurs : Mme Dominique SIGAUDDO-ROUSSEL et M. Lhousseine TOUQUI



A mes proches, ma famille, mes parents ...

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à

Madame **SIGAUO –ROUSSEL Dominique** et Monsieur **TOUQUI Lhousseine** d'avoir accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteur. Je vous remercie pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit. Vos remarques très enrichissantes m'auront été de précieux conseils. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

À Madame **BOUSCHBACHER Marielle** et Monsieur **TREILHOU Michel** d'avoir accepté de siéger à ce jury de thèse. Je les remercie de l'intérêt et de la considération portée envers ces travaux, qui m'ont permis d'améliorer grandement la qualité de ce mémoire. Qu'ils soient assurés de ma profonde gratitude.

A Monsieur **SEGUI Bruno**. Je le remercie pour toutes les remarques constructives et les conseils scientifiques avisés dont il a fait preuve à mon égard. Je tiens à lui exprimer mes remerciements pour l'honneur qu'il me fait en étant président de ce jury de thèse.

A Madame **COSTE Agnès** et Monsieur **PIPY Bernard**, respectivement co-directrice et directeur de ce doctorat pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je leur suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de leur grande compétence et de leur rigueur intellectuelle. Je les remercie pour toute la patience et la disponibilité dont ils ont fait preuve et leurs nombreux conseils durant la rédaction de mon manuscrit. Soyez assuré de mon attachement et de mon plus sincère respect.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans le soutien des **Laboratoires URGO** qui ont financés cette thèse dans le cadre d'une bourse CIFRE. Leurs compétences scientifiques et techniques ainsi que leur expertise dans le domaine auront été l'assurance de la réussite de ce travail. J'en remercie ici tous les membres.

De manière plus informelle et personnelle, je souhaite remercier en premier lieux les membres de mon laboratoire d'accueil :

Bernard PIPY. Vous êtes la première personne que j'ai rencontrée et surtout la toute première à m'avoir fait confiance. Je ne l'oublierai jamais. Dès le début, vous m'avez proposé des projets ambitieux, où partir de rien et voguer à l'inconnu était légion. Vous m'avez accordé votre confiance, je vous ai donné la mienne. Finalement, vous vous n'êtes pas trompé et moi non plus. A croire que tout cela aller nous suivre tout le long de cette aventure. A force de persévérance, ensemble nous y seront parvenu. Après tout, l'obstination est le chemin de la réussite (*Charli Chaplin*).

Durant toutes cette année-là, j'ai découvert un directeur de recherche exceptionnel, galvanisé par ce travail ou plutôt devrais-je dire, par cette passion. Grâce à vous, je découvert un monde fascinant et surtout une personne toujours prête à tout pour me venir en aide. Même dans les moments difficiles, et dieu sait qu'il y en a eu, vous trouviez toujours un point positif et de quoi rebondir.

Plus qu'un simple guide professionnel à mes yeux, j'aurai énormément appris de vos qualités humaines. Pour beaucoup, le bureau d'un directeur de laboratoire est un lieu chargé de nombreuses appréhensions, pour moi il aura été un lieu privilégié, propice la mise en œuvre de toutes les idées qui germaient dans nos esprits. Nos échanges, nos réflexions auront été un réel pur bonheur.

Merci Bernard d'avoir été mon directeur de thèse, de m'avoir soutenu jusqu'au bout et particulièrement dans la dernière ligne droite. La rédaction de ce manuscrit et sa présentation orale n'auraient jamais pu être achevées sans vous. Durant toutes ces années, cela aura été un honneur d'avoir pu travailler avec vous et un privilège d'avoir eu votre confiance.

Agnès COSTE. Tes connaissances scientifiques, ton aide à la rédaction mais aussi tes qualités humaines font que tu as été toujours proches des étudiants dont je faisais partis. Tout ce travail n'aurait sans doute pu être finalisé sans ton sens synthétique et ta rigueur. Il est vrai qu'avec mon organisation un peu particulière et surtout des idées partant dans tous les sens. Il fallait bien une personne qui canalise un peu tout cela. Dans ce travail Il nous fallait une personne afin de nous rappeler que toute bonne chose à un commencement mais surtout une fin. Je crois que je serai toujours en thèse sinon ... Tu auras fait le maximum pour nous donner les moyens de nos ambitions. Beaucoup de personne ne disent jamais rien et n'en pense pas moins pour autant, pourtant toi c'est plutôt tout l'inverse. Ton franc parlé, certes un peu déroutant au début, m'aura permis d'apprendre beaucoup sur moi-même et d'avancer dans ce projet. Compréhensive et patiente, merci m'avoir encouragé et aidé pour que je donne le meilleur de moi-même.

José BERNAD. Dans la vie, il y a des personnes que l'on croise et que l'on n'oublie jamais. José tu fais partie de ces personnes. Plus qu'un simple collègue de travail tu auras été pour moi, une personne de confiance, un soutien inébranlable, un ami à qui on peut tout dire. Toujours un mot pour rassurer, pour redonner confiance et remotiver. Crois-moi cela compte ! Tu as été mon tout premier encadrant il y a fort longtemps déjà... et que de chemin parcouru ensemble. Sans nul doute un artisan de ma passion pour la recherche et cela dès mon M1 où tu m'as transmis une infime partie de ton savoir, mais quel savoir : une mine d'expérience et de détails qui font la réussite de tout projet. Cela aura été un véritable plaisir de discuter et de partager ensemble tous ces moments. Ne change surtout pas. J'espère que d'autre personnes auront la chance et l'opportunité, comme celle que j'ai eu, de pouvoir travailler avec toi. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as pu faire pour moi.

Hélène AUTHIER. Unanimement, la personne la plus sensible et gentille de ce laboratoire. Malheureusement quand tout semble marche pour le mieux, il arrive que pour toi cela ne se passe pas de la même manière... C'est ce petit côté qui fait que nous on t'adore car tu gardes toujours cet entrain et cette force qui font que tu ne lâches jamais rien. Un exemple à suivre pour nous tous. Quel plaisir que d'avoir pu apprendre à tes côtés.

Etienne MEUNIER. Tu vois, j'y suis arrivé ! Le dernier du trio après David et toi ^^ . Etienne que dire de toi. On s'est connu et on a partagé tous les moments d'une thèse. Les meilleurs mais surtout les pires. Quand tu étais au fond du trou et que tu creusais toujours, j'étais à tes côtés avec ma pelle à creuser aussi... Qu'il est loin ce temps où l'on se rencontrait, un samedi soir, autour d'un petit tube de cytométrie ou d'une plaque ELISA. Souviens-toi, l'hiver à nos bureaux, les courants d'air... des moments inoubliables qui me font bien sourire maintenant. Durant toutes ces années où nous avons partagé nos galères, nous avons appris à nous connaître, à nous serrer les coudes et à nous entraider. Plus qu'un simple collègue, tes conseils et ton savoir vivre m'auront énormément apporté sur le plan professionnel mais surtout personnel. Ce fût un réel plaisir que de travailler à tes côtés.

David OLAGNIER. Nous avons partagé un petit bout de chemin ensemble et surtout un petit bout de bureau durant mes toutes premières années. Derrière ce chercheur appliqué et consciencieux se cache un véritable homme de valeur. Un modèle pour moi dans le travail mais aussi dans la vie. Tu as mené ta carrière professionnelle comme ta vie privée, tel un chef. Tes conseils resteront à jamais gravée dans ma mémoire. Nous nous recroiserons dans le futur, je n'en doute pas et cela avec un grand plaisir que l'on se remémorera le bon vieux temps.

Lise LEFEVRE. Je te connais depuis de longues années et pourtant, tu es restée la même avec le temps qui passe. Une personne sur qui l'on peut compter, à l'écoute et toujours prête à nous apporter ses conseils. A tes débuts tu étais consciencieuse, rigoureuse et avec un petit brin de folie qui faisait que l'on s'attachait vite à toi. Je te rassure, tu n'as pas changé. Après avoir passé des années dans bureau, entourée d'hommes (dont je faisais partis), à avoir endurer nos blagues et autres commentaires, je crois que tu es parée à tout dorénavant. Lise, je ne peux espérer que de bonnes choses pour ton avenir.

Mohamad ALA EDDINE. Le Gad Elmaleh du laboratoire (Momo pour les intimes) ... Quand Je t'ai vu arrivé, qui aurait pu croire que tu allais nous apporter tant de bonne humeur. Toujours un mot pour faire rire, ta joie de vivre, ton sourire m'auront vraiment aidé dans les moments les plus durs. S'il est bien une personne prête à rendre service c'est bien toi. J'ai découvert une personne attachante mais toujours sérieuse dans ce qu'il entreprend. Tu feras un excellent chercheur j'en suis convaincu.

Agnès AUBOUY. Quel courage, menée de front une carrière de chercheur et avoir une vie de famille si épanouie, je ne peux être qu'admiratif. Il fut un temps où l'on se croisais plus souvent à l'animalerie que dans les bureaux. Décidément l'animalerie aura été un lieu important pour nous deux. Un régal de pouvoir discuter avec toi de travail mais surtout de toute tes aventures qui font relativiser beaucoup de chose. Prendre du recul fait toujours du bien, tu m'auras ouvert les yeux sur beaucoup de chose. Ton dévouement et ta passion pour la recherche auront été pour moi une vraie source d'inspiration.

Philippe BATIGNE, la personne que j'aurai certainement le plus vu durant ce doctorat, mon seul contact humain j'aurai presque envie de dire durant certaines périodes ! Et oui, j'aurai pu sombrer dans la folie et même me mettre à parler à mes petits animaux si tu n'avais pas été là. Un réel plaisir à travailler avec toi Philippe. Travailleur de l'ombre comme tu m'as si bien dit un jour, et pourtant tu fais partie de ces personnes souvent oubliées qui compte dans la réussite d'un tel projet ! Personnes ne sait mieux que toi les difficultés que j'ai rencontrées et pourtant, tu avais toujours des mots pour faire rire. Crois-moi, ta bonne humeur, ta disponibilité auront été pour moi un soutien des plus importants.

Maryse BERAUD, vous faites partie des personnes que j'ai eu la chance d'apprendre à connaître depuis le tout début de cette aventure. Que de protocoles et de données traitées ensemble ! Vous m'avez apporté beaucoup de choses aussi bien sur le plan professionnel mais surtout de votre expérience de la vie. Une aide comme cela on ne l'oublie jamais.

Bénédicte BERTRAND. La sportive du groupe, qui partage la même passion que moi. Un déferlement d'énergie qui fait trembler les murs à son passage. Ta patience, ta gentillesse m'auront beaucoup touché durant toutes ces années. Les cônes me manqueront...

Christine PERES, toujours présentes pour moi, tu auras fait le maximum pour que ma thèse se déroule dans les meilleures dispositions possibles. Un problème, une urgence, pas de soucis tu étais là. Patiente et toujours à l'écoute merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Saliha MIMAR. Que de discussions tous les deux, à parler de tout, de rien mais de science aussi, il ne faut pas l'oublier. Merci de ta gentillesse et de l'oreille que tu as pu m'apporter lorsque j'en avais le plus besoin.

Comment ne pas parler du futur de cette équipe : **Mélissa, Khaddouj** merci les filles pour la bonne ambiance et pour tout le soutien que vous avez apporté. J'ai vécu beaucoup de très bons moments avec vous. Que d'histoire et de « papotage » sur des sujets sans queue ni tête. Je peux vous le garantir, vos discussions entre fille m'auront beaucoup fait sourire. Courage pour la suite, la réussite est au bout ! Je vous souhaite de tout cœur le meilleur pour votre avenir.

Je n'oublie pas l'ensemble des membres des Laboratoires URGO. **Marielle BOUSCHBACHER**, tout comme Bernard, tu as été la première personne que j'ai pu rencontrer de cette formidable équipe. Je ne te remercierai jamais assez de la confiance que tu as pu m'accorder sur un tel projet. Toujours à l'écoute, j'ai plus qu'apprécié que de pouvoir travailler avec une personne telle que toi. Tu auras été un soutien inébranlable durant cette aventure et une personne formidable sur qui je pouvais compter. Cela aura été un pur bonheur que de pouvoir mené à bien toutes ces études à tes côtés. Merci pour tout. Comment ne pas parler de **Michel** : des idées plein la tête, toujours prêt à rendre service et surtout toujours disponible dès que j'en avait besoin. Une vraie source d'inspiration pour beaucoup, mais je n'oublie pas le reste de l'équipe pour autant, n'est-ce pas **Virginie, Guillaume, les deux Julien et toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer** ... Il me faudrait des lignes et des lignes pour vous remercier mais sachez que je n'oublierai jamais l'accueil chaleureux dont vous avez fait preuve à chacune de mes venues. Un véritable plaisir que de venir sur DIJON. Enfin, **Christelle LAURENSOU** et **Laurent APERT**, ce travail n'aurait pu être réalisé sans votre soutien. Je vous remercie sincèrement d'avoir été disponible, prévenant et de m'avoir fait confiance pour la réussite de cette aventure. Travailler sous votre direction aura été un réel plaisir. Avoir la chance de rencontrer des personnes avec vos qualités humaines et professionnelles aura été un privilège, je ne l'oublierai jamais. Mille mercis pour tout ce que vous avez pu faire pour moi.

Je remercie également, toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, durant ces années de thèse. **Christiane** une petite pensée pour toi qui à partager de longue après-midi avec moi en cytométrie. Disponible et toujours présente pour me donner un petit coup de main. Merci pour ta patience.

Mes derniers remerciements ; sans nul doute les plus difficiles à exprimer et à retranscrire sur du papier, vont à mes proches et à ma famille.

S'il y a bien une personne qui me comprend mieux que quiconque, c'est bien toi **Aude BERTOLUTTI**. Je peux le dire, ce doctorat on l'aura indiscutablement vécu à deux. Patiente, compréhensive et surtout toujours là pour moi, tu auras été une aide et un soutien inestimable à mes yeux. Ces épreuves ont les auras traversées tous les deux. Des pages et des pages ne suffiraient pas à exprimer tous mes remerciements et ma gratitude. Aude merci de tout mon cœur.

Enfin mes derniers mots iront à **ma famille, mes parents et à mon frère**. Une famille soudée, présente dans les moments de bonheur mais surtout dans les moments les plus durs. Si je suis en train de rédiger ces dernières pages, c'est en grande partie à vous tous que je le dois. Vous avez fait d'énormes sacrifices, toujours à faire le maximum m'offrir le meilleur des avenir et cela, je ne vous en remercierai jamais assez. Quant à toi mon petit frère, ta bonne humeur, ta présence pour me donner un coup de main à n'importe quelle heure et surtout pour discuter ensemble afin de me changer les idées auront été pour moi vraiment une vraie bouffée de bonheur. Pour tous ces moments partagés, qui m'ont fait un bien fou je tenais à vous le dire, Maman, Papa, Cédric, **Merci**.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
TABLE DES ABREVIATIONS	14
CONTEXTE DE RECHERCHE	16
CONTEXTE DE RECHERCHE	17
PARTIE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	20
CHAPITRE I	
LA PEAU	21
1. L'épiderme	22
2. Le derme	23
3. L'hypoderme	25
4. Les annexes épidermiques	26
5. Particularités de la peau de souris	27
CHAPITRE II	
LA CICATRISATION CUTANEE	29
1. L'inflammation	30
1.1. L'hémostase	31
1.1.1 L'hémostase primaire	31
1.1.2 L'hémostase secondaire	32
1.1.3 La fibrinolyse	32
1.2. La phase inflammatoire proprement dite	33
2. Phase proliférative et de réparation	34
2.1. Formation du tissu de granulation	34
2.2. La réépithélialisation	35
2.3. L'angiogenèse	36
3. Phase de remodelage	37

CHAPITRE III**MACROPHAGES ET CICATRISATION 38**

1. Polarisation des macrophages	38
1.1. Les macrophages de type 1 activés classiquement (M1)	39
1.2. Les macrophages de type 2 activés alternativement (M2)	39
1.2.1 Les macrophages M2a	40
1.2.2 Les macrophages M2b	40
1.2.3 Les macrophages M2c	40
1.2.4 Les macrophages M2d	41
1.2.5 Les autres phénotypes de macrophages	41
2. Les macrophages dans les différentes étapes de la cicatrisation	42
2.1. La phase inflammatoire	43
2.2. La résolution de l'inflammation	45
2.3. La phase de prolifération et de granulation	47
2.4. Le remodelage tissulaire	47

CHAPITRE IV**DIABETE ET PROCESSUS CICATRICIEL 49**

1. Le diabète	49
2. La physiopathologie de la plaie du diabétique	50
2.1. La neuropathie diabétique périphérique	50
2.2. L'artériopathie des membres inférieurs chez le sujet diabétique	51
2.3. Les composantes infectieuses	52
2.4. Les thérapies existantes	53
3. La physiopathologie de la cicatrisation chez le diabétique.	56
3.1. L'hyperglycémie	56
3.2. Un environnement cicatriciel délétère	58
3.3. Un environnement hypoxique	59
4. Macrophages et inflammation au cours de la cicatrisation de plaies chez le diabétique	59

CHAPITRE V**LE METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE ET SON IMPLICATION****DANS LA CICATRISATION 62**

1. Les phospholipases A2, enzymes clefs du métabolisme des acides gras polyinsaturés	63
2. Les cyclooxygénases ou prostaglandine H₂ synthétases	64
3. Voies métaboliques des cyclooxygénases	67
3.1. Les prostanoides synthétases	67

3.2.	Les prostaglandines de la série E	67
3.3.	Les prostaglandines de la série D	69
3.4.	La prostacycline	71
3.5.	Les thromboxanes	71
4.	Voies métaboliques des lipoxygénases	72
4.1.	Voies métaboliques de la 5-lipoxygénase	72
4.1.1	Métabolisme du 5(S)-HPETE	73
4.1.2	Métabolisme du LTA ₄ : la voie de la LTA ₄ hydrolase	73
4.1.3	Métabolisme du LTA ₄ : la voie de la LTC ₄ synthétase	75
4.2.	Voies métaboliques de la 12/15-lipoxygénase	76
4.2.1	La résolution de l'inflammation par les lipoxines	78
4.2.2	Synthèse des épi-lipoxines	79
4.2.3	Mécanisme de résolution de l'inflammation par les lipoxines et les épi-lipoxines	80
4.2.4	Aspirine et cicatrisation	
	82	
PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE		84
1.	Etat de l'art	85
2.	Dispositif non-invasif, destiné à recueillir les exsudats d'une plaie son utilisation et kit comprenant ledit dispositif (ANNEXE 1 : FR 2984 722)	88
3.	Méthode d'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie à des niveaux microscopiques et macroscopiques (ANNEXE 2 : FR 2984 719)	91
4.	Aspirin topic treatment improves cutaneous wound healing in diabetic mice through lipoxygenase-dependent production of pro-resolving lipid mediator	92
4.1.	Abstract	92
4.2.	Introduction	93
4.3.	Experimental procedures	94
4.4.	Results	97
4.5.	Discussion	109
4.6.	References	111
5.	Utilisation d'acide acétylsalicylique pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique (ANNEXE 3 : FR 299 936)	115

PARTIE 3 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	116
1. Mise en place d'un nouveau dispositif expérimental	117
2. Choix du modèle murin pour les études <i>in vivo</i>	118
3. Les macrophages dans la résolution de la phase inflammatoire de la cicatrisation	120
4. Le traitement des plaies par l'aspirine améliore le processus cicatriciel des souris diabétiques	122
5. L'aspirine améliore le processus cicatriciel des animaux diabétiques via un mécanisme original impliquant la 5-lipoxygénase et la 12/15-lipoxygénase	123
6. La 12/15 lipoxygénase est une enzyme clef du processus cicatriciel	125
7. Conclusion et perspective	126
PARTIE 4 : BIBLIOGRAPHIE	128
PARTIE 5: ANNEXES	159

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u>	:	Structure de la peau. Adaptée de (Geras, 1990).
<u>Figure 2</u>	:	Structure de l'épiderme. Adaptée de (OpenStax-College, 2013) et (Regeants-of- University-of-Michigan-Medical-School., 2012).
<u>Figure 3</u>	:	Organisation du derme. Extrait de (Jacquemoud, 2007).
<u>Figure 4</u>	:	Organisation de la jonction épidermique. Extrait de (Laplante, 2002) et adapté de (Regeants-of-University-of-Michigan-Medical-School., 2012).
<u>Tableau 5</u>	:	Différences majeures entre la peau murine et humaine. Adaptée de (Wong et al., 2011).
<u>Figure 6</u>	:	Comparaison des structures et composants cellulaires de la peau murine et humaine. Adaptée de (Pasparakis et al., 2014; Wagner et al., 2010).
<u>Figure 7</u>	:	Phases principales du processus de cicatrisation cutanée. Adaptée de (Kloth, 2002).
<u>Figure 8</u>	:	Les différents types de cicatrisation. Adaptée de (Biology Discussion Forums For All Your Science Needs, 2013).
<u>Figure 9</u>	:	L'hémostase. Adaptée de (Berridge, 2012).
<u>Figure 10</u>	:	Cascade de la coagulation. Adaptée de (Mackman, 2004).
<u>Tableau 11</u>	:	Effets des facteurs de croissance et des cytokines produites durant le processus cicatriciel. Adapté de (Werner and Grose, 2003).
<u>Figure 12</u>	:	Interaction entre les fibroblastes et les différentes populations cellulaires. Adaptée de (Greaves et al., 2013).
<u>Figure 13</u>	:	Représentation schématique des 2 modèles de réépithélialisation. Extrait de (Usui et al., 2005).
<u>Figure 14</u>	:	Facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Extrait de (Greaves et al., 2013).
<u>Figure 15</u>	:	La polarisation des macrophages.
<u>Figure 16</u>	:	Dynamique de la réponse inflammatoire durant la cicatrisation d'une plaie cutanée. Adaptée de (Willenborg and Eming, 2014).
<u>Figure 17</u>	:	Macrophages et phase inflammatoire. Adaptée de (Mahdavian Delavary et al., 2011).
<u>Figure 18</u>	:	Polarisation M2 des macrophages et efférocytose. Adaptée de (Tabas, 2010).
<u>Figure 19</u>	:	Les différents phénotypes de macrophages impliqués dans les différentes phases du processus cicatriciel.
<u>Figure 20</u>	:	Prévalence du diabète en France en 2007 : taux standardisé. Extrait de (Kusnik-Joinville et al., 2008).
<u>Figure 21</u>	:	Le mal perforant plantaire. Extrait de (Bellaye et al., 2014).
<u>Figure 22</u>	:	Technologies des pansements et physiologie de la plaie.
<u>Figure 23</u>	:	La thérapie par pression négative (TPN). Extrait de (Schweiger, 2014).
<u>Figure 24</u>	:	Implication du diabète dans la génération d'un stress oxydatif. Adaptée de (Vincent and Taylor, 2006).
<u>Figure 25</u>	:	Activation des récepteurs RAGEs et cascade de signalisation. Extrait de (Rondeau, 2009).
<u>Figure 26</u>	:	Voies de formation des métabolites de l'acide arachidonique.

<u>Figure 27</u>	:	Superfamille des Phospholipase A₂. Adaptée de (Dennis et al., 2011).
<u>Figure 28</u>	:	Structure tridimensionnelle et domaines enzymatiques de COX-1.
<u>Figure 29</u>	:	Métabolisme de l'AA par COX-1 et COX-2.
<u>Tableau 30</u>	:	Tableau comparatif de COX-1 et de COX-2.
<u>Figure 31</u>	:	Biosynthèse des prostanoïdes. Extrait de (Hata and Breyer, 2004).
<u>Tableau 32</u>	:	Caractéristiques des récepteurs aux LTB₄. Adaptée de (Tager and Luster, 2003).
<u>Figure 33</u>	:	Métabolisme de la 5-LOX et voies de signalisation.
<u>Tableau 34</u>	:	Caractéristiques des récepteurs aux CystLTs. Adapté de (Rovati and Capra, 2007).
<u>Figure 35</u>	:	Métabolisme de la voie des lipoxgénases.
<u>Figure 36</u>	:	Aspirine et métabolisme de l'AA.
<u>Figure 37</u>	:	Récepteurs aux lipoxines : mécanismes d'activation de FRP2.
<u>Figure 38</u>	:	« Blessure d'une monocouche de kératinocytes et de fibroblastes. Extrait de (BioExigence, 2014a).
<u>Figure 39</u>	:	Lattices de collagène. Extrait de (BioExigence, 2014b). et (BioExigence, 2014c).
<u>Figure 40</u>	:	Exemple de chambre implantable. Adaptée de (Laschke et al., 2011).
<u>Figure 41</u>	:	Chambre de cicatrisation.
<u>Tableau 42</u>	:	Volume de l'exsudat prélevé et infiltration cellulaire.
<u>Figure 43</u>	:	Validation du modèle de diabète nutritionnel induit (HFD).
<u>Figure 44</u>	:	Le macrophage dans la résolution de l'inflammation.
<u>Figure 45</u>	:	Mécanisme d'action de l'aspirine et modulation du métabolisme de l'AA chez les animaux diabétiques.
<u>Figure 46</u>	:	Métabolisme de l'AA dans les modèles murin 5-LOX KO et 12/15-LOX KO.

TABLE DES ABREVIATIONS

HPETE	Hydroxyperoxyeicosatétraénoïque
HETE	Hydroxyeicosatétraénoïque
AA	Acide Arachidonique
ADP	Adenosine 5' Diphosphate
AGE	Advanced Glycation End Product
AGPI	Acide Gras Polyinsaturés
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
ATP	Adénosine-5'-Triphosphate
COX	Cyclooxygénases
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DAG	Diacylglycerol
DID	Diabète Insulino-Dépendant
DETC	Cellules T Dendritiques Epidermiques
DGLA	Acide Dihomo-gamma-linolenique
DHA	Acide docosahexaénoïque
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
EGF	Epidermal Growth Factor
HB-EGF	Heparin Bound EGF
EPA	Acide Eicosapentaénoïque
EPC	Endothelial Progenitor Cell
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLAP	FIVE-Lipoxygénase Activating Protein
HFD	High Fat Diet
HIF	Hypoxia Inductible Factor
HMGB	High Mobility Group Box
IFN	Interféron
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-	Interleukine
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRFs	Interferon Regulatory Factors
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lippopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
LTA_{4h}	Leucotriène A ₄ hydrolase
LTB₄	Leucotriène B ₄
LX	Lipoxine
MAP Kinases	Mitogen-Activated Protein Kinases
M-CSF	Macrophages Colony-Stimulating Factor
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéase Matricielles
MPP	Mal Perforant Plantaire
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PG	Prostaglandine
PL	Phospholipase

PGI	Prostacyline
PKC	Protein kinase C
PL	Phospholipase
PNN	Polynucléaire Neutrophile
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
ROS	Reactive Oxygen Species
STAT	signal transducer and activator of transcription
SRS-A	Slow Reacting Substance of Anaphylaxis
TAM	Tumor Associated Macrophages
TGF-	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Métalloprotease
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPN	Thérapie par Pression Négative
TREG	Lymphocyte T Régulateur
TX	Thromboxane
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

CONTEXTE DE RECHERCHE

CONTEXTE DE RECHERCHE

Le diabète non insulino-dépendant de type 2 est un problème majeur de santé publique en raison de sa prévalence et du taux élevé de complications dégénératives qu'il induit. Parmi ces complications, le défaut de cicatrisation, et plus particulièrement celui des plaies du « pied diabétique » représente une des causes majeures de morbidité et de mortalité des patients diabétiques.

La cicatrisation des plaies est un processus physiologique, multifactoriel et dynamique visant à rétablir l'intégrité et la fonctionnalité des tissus lésés. Cette réponse biologique complexe nécessite une orchestration et une communication précise entre les différentes populations cellulaires du tissu lésé et les cellules inflammatoires notamment des polynucléaires, des monocytes et des macrophages, infiltrés au niveau de la lésion. Ce processus peut être divisé en 3 phases distinctes : une phase d'hémostase généralement couplée à une phase inflammatoire exsudative précoce. Cette phase inflammatoire est arrêtée par une phase de résolution qui est suivie d'une phase proliférative avec formation du tissu de granulation. Enfin une phase de remodelage de la cicatrice finalise ce processus.

Les données de la littérature suggèrent que le retard de cicatrisation des personnes diabétiques résulterait de la chronicité de la phase inflammatoire. Actuellement, bien que certains composés actifs aient montré une réelle efficacité, notamment dans la prévention des surinfections des plaies, peu d'options de traitements sont disponibles pour traiter les plaies les plus graves et améliorer la vitesse de cicatrisation chez les patients diabétiques. Elles consistent pour la majorité d'entre-elles à contrôler l'état diabétique du patient et dans les cas les plus graves à réduire et à soulager les symptômes. Ainsi, la compréhension de la dérégulation des mécanismes cellulaires et moléculaires du processus cicatriciel chez le diabétique représente un enjeu essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé.

Notre hypothèse de travail a été de démontrer que le retard de cicatrisation au cours du diabète de type 2 était la conséquence d'un défaut majeur de la phase de résolution de l'inflammation. Ce défaut associé à une programmation altérée des macrophages infiltrant la plaie, pourrait résulter d'une dérégulation des voies métaboliques contrôlant la synthèse des médiateurs lipidiques pro- et anti-inflammatoires au niveau de la lésion durant la phase précoce du processus cicatriciel.

Par une approche pharmacologique originale, notre objectif a été de favoriser la synthèse de médiateurs impliqués dans la résolution de l'inflammation. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une application topique d'acide acétylsalicylique (aspirine), à faible dose, afin d'orienter préférentiellement la production des métabolites lipidiques pro-inflammatoires vers la synthèse de médiateurs aux potentialités anti-inflammatoires, les lipoxines.

La première partie de ce mémoire est une revue bibliographique, qui introduit les différents éléments relatifs à notre travail de thèse. Après une description des structures de la peau, nous aborderons le rôle des macrophages dans le processus normal de cicatrisation. Nous préciserons les événements cellulaires et moléculaires impliqués dans les troubles de cicatrisation des plaies des patients diabétiques ainsi que les moyens actuellement utilisés pour y remédier. Enfin, nous présenterons le rôle clé des médiateurs lipidiques dans les différentes phases du processus cicatriciel en abordant les enzymes impliquées dans leur synthèse et la modulation pharmacologique de leurs activités.

La seconde partie de ce travail, sera consacrée aux travaux de recherche menés durant cette thèse qui ont abouti (i) au développement d'un nouveau modèle expérimental et à sa valorisation sous

forme de 2 brevets ; (ii) à la mise en place d'une stratégie pharmacologique originale ciblant la modulation du métabolisme de l'acide arachidonique par l'aspirine et à sa valorisation par le dépôt d'un brevet ; (iii) à la caractérisation du mécanisme d'action de l'aspirine sur la cicatrisation des plaies du diabétique, présenté sous forme de résultats qui feront l'objet d'une publication originale.

La dernière partie de ce manuscrit présente est une discussion générale des résultats obtenus et les perspectives qui se dégagent de ces travaux de recherche. L'importance des médiateurs lipidiques provenant des lipoxgénases et de la cyclooxygénase-2 dans la résolution de l'inflammation au cours du processus cicatriciel sera abordée.

PARTIE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LA PEAU

Indispensable à la vie, la peau (du latin *pellis*), enveloppe protectrice du corps, est une barrière physique protégeant l'ensemble des organes et tissus des agressions extérieures (Eckert, 1989). Elle demeure un lieu privilégié de contact et d'échanges avec le milieu extérieur. La peau est considérée comme l'organe le plus étendu mais également le plus volumineux du corps humain avec une surface proche des 2m² (Mosteller, 1987) pour environ 16% du poids total de l'individu. L'épaisseur de la peau varie selon la zone anatomique considérée : de 0,5mm (paupières, mamelon, pavillon de l'oreille) à 2,5mm en moyenne (membres, thorax, paume), voire 4 à 5mm au niveau de la plante des pieds. Elle se compose approximativement de 70% d'eau, 27% de protéines, 2% de lipides et près de 1% d'oligo-éléments (Woodard and White, 1986). Trois couches superposées définissent la peau (**Figure 1**) :

- **L'épiderme:** tissu épithélial de revêtement, stratifié et kératinisé.
- **Le derme:** tissu conjonctif dense de soutien.
- **L'hypoderme:** tissu conjonctif, de réserve, le plus profond.

Au sein de ces différentes structures sont présentes des annexes représentées par les phanères (cheveux, poils, ongles), les glandes sébacées et les glandes sudoripares.

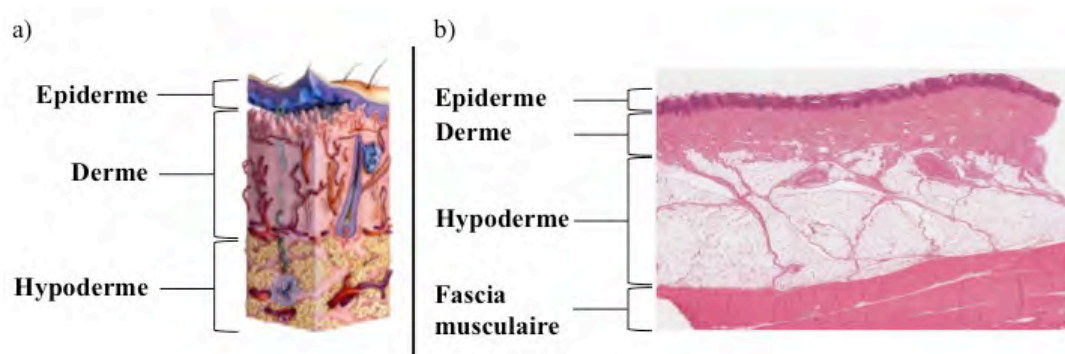


Figure 1 : Structure de la peau. Adaptée de (Geras, 1990). **a)** Représentation schématique de la peau humaine. **b)** Coupe histologique d'une peau humaine : coloration hématoxyline/éosine.

La peau possède plusieurs fonctions fondamentales :

- **Fonction de thermorégulation** (Downey et al., 1971) : avec le maintien de la température corporelle, grâce notamment au système vasomoteur (capillaires sanguins et système nerveux).
- **Fonction de protection** (Bachelez, 2005; Proksch et al., 2008) : contre les agressions mécaniques (chocs, pression et autres) mais aussi contre le rayonnement ultraviolet. Le sébum produit est à l'origine du film épidermique hydrolipidique. Il agit comme un écran protecteur (Lee et al., 2006).
- **Fonction immunitaire** (Bangert et al., 2011) : en assurant une première ligne de défense de l'hôte, de par sa constitution particulière, son pH acide (4,7 à 5,6) et son renouvellement cellulaire perpétuel qui limite la fixation des pathogènes (Elias, 2007). De plus, grâce aux cellules immunitaires de l'épiderme, du derme et l'implication d'une flore bactérienne non pathogène (flore saprophyte) (Grice and Segre, 2011), la peau constitue une véritable barrière immunologique (Heath and Carbone, 2013).

- **Fonction sensitive** : via une multitude de récepteurs sensibles notamment à la pression, à la douleur et à la température (Chery-Croze, 1983; Delmas et al., 2011; Voets et al., 2004).
- **Fonction métabolique** : l'hypoderme est une réserve d'énergie sous forme de triglycérides (Avram et al., 2005). La peau participe également à la synthèse de la vitamine D (Holick, 2003).
- **Dimension sociale** : outre sa fonction informative, l'aspect de la peau a des conséquences psychosociales non négligeables (Westerhof, 2007). De nombreuses affections dermatologiques sont associées à des stress psychosociaux (Hall et al., 2012).

1. L'épiderme

L'épiderme constitue la structure externe la plus fine de la peau avec une épaisseur moyenne de 100µm, allant de 50µm sur les paupières à 1mm sur la paume des mains ou la plante des pieds. L'épiderme n'est pas vascularisé (ni vaisseaux sanguins, ni vaisseaux lymphatiques), mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres (Boulaïs and Misery, 2008). C'est un épithélium pavimenteux, pluristratifié composé de cellules kératinisées (**Figure 2**). Cette organisation entraîne un processus de différenciation propre aux kératinocytes (Barrandon, 1998; Lajtha, 1979; Lavker and Sun, 1983; Stenn, 1992). L'équilibre entre la perte, et l'apparition de nouvelles cellules superficielles, permet le renouvellement de l'épiderme en 28 jours (Taylor et al., 2000).

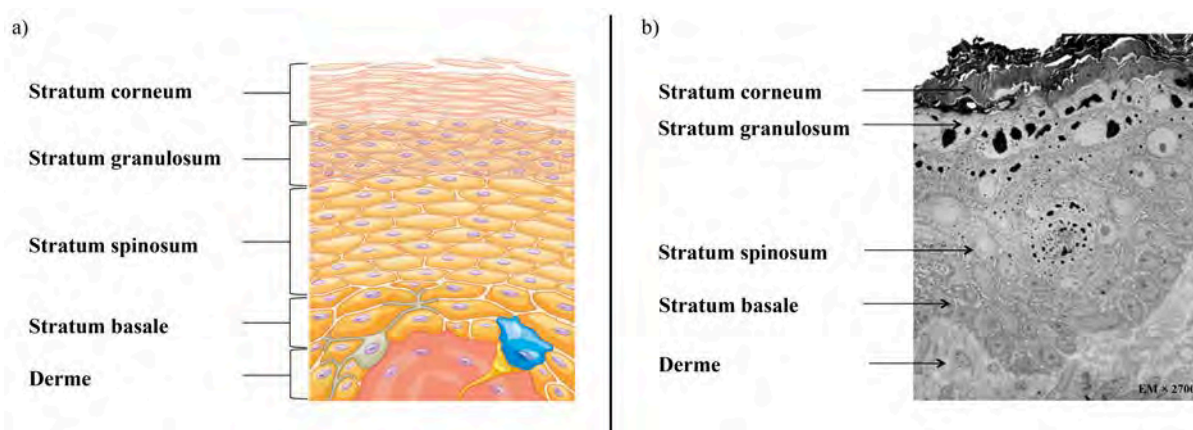


Figure 2 : Structure de l'épiderme. a) Représentation schématique de l'épiderme humain. Adapté de (OpenStax-College, 2013). **b)** Epiderme humain observé en microscopie électronique. Adaptée de (Regeants-of-University-of-Michigan-Medical-School., 2012).

L'épiderme est organisé en 4 couches cellulaires superposées

- **La couche basale** (*stratum basale*) ou couche germinative est la plus profonde de l'épiderme. C'est le compartiment prolifératif (Lavker et al., 2003) responsable du renouvellement des kératinocytes. Elle est reliée à une membrane basale (qui assure sa nutrition par diffusion) par des hémidesmosomes (Borradori and Sonnenberg, 1999). Ils consolident la jonction entre le derme et l'épiderme. Cette couche est constituée d'une seule assise de kératinocytes, de cellules souches de l'épiderme et de cellules amplificatrices transitoires dites TA (Transit Amplifying). Les cellules souches ont un fort potentiel de prolifération et une capacité illimitée d'auto-renouvellement (Potten and Booth, 2002) contrairement aux cellules TA (cellules filles des cellules souches) qui sont vouées à la différenciation définitive (Jones and Watt, 1993; Roh et al., 2005).
- **La couche épineuse** (*stratum spinosum*), ou corps muqueux de Malpighi, est une superposition de 5 à 15 strates de kératinocytes.

- **La couche granuleuse** (*stratum granulosum*) est constituée de 1 à 3 strates de kératinocytes aplatis et granuleux contenant des grains volumineux (les kératohyalines) (Sidhu et al., 2000).
- **La couche cornée** (*stratum corneum*) représente la couche la plus externe de l'épiderme en contact avec l'environnement extérieur. Elle se compose de 5 à 15 couches de des cellules polyédriques aplaties et complètement kératinisées, dénommées cornéocytes (Norlen, 2006). Dans certains cas de peau épaisse, comme les zones palmaires et les lèvres (Zirra, 1976), le *stratum lucidum* assure la transition entre le *stratum granulosum* et le *stratum corneum*. Il s'agit de fines couches de cellules mortes où les kératinocytes y présentent un phénotype intermédiaire (notamment un noyau remplacé par une vacuole).

En plus des kératinocytes qui représentent à eux seuls environ 90 % de la population cellulaire totale, 3 autres types cellulaires principaux composent l'épiderme.

Tout d'abord, **les mélanocytes**, responsables de la synthèse et de la sécrétion de mélanine (5 à 10% des cellules épidermiques), sont à l'origine de la pigmentation de la peau (Lin and Fisher, 2007; Slominski et al., 2004) et de sa protection vis à vis des rayons ultraviolets.

Les cellules de Merkel sont distribuées de manière irrégulière au sein de la couche basale (Boulais and Misery, 2007), sont peu abondantes et ne représente environ qu'1% des cellules présentes. Ces mécanorécepteurs (Misery and Gaudillere, 1996) renferment des vésicules neuroendocrines, et sont couplés aux terminaisons sensorielles libres intraépidermiques ou intrapapillaires (Xiao et al., 2014).

Enfin, **Les cellules de Langerhans**, cellules dendritiques, jouent le rôle de sentinelle et sont impliquées dans l'induction de la réponse immunitaire cutanée. Elles jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes spécifiques de l'épiderme et ont une importance considérable dans la défense et tolérance (Clausen and Kel, 2010).

2. Le derme

Le derme, est en moyenne, quatre fois plus épais que l'épiderme. Il est fortement vascularisé, et contribue à la thermorégulation de l'organisme (Sanyal and Maji, 2001). C'est un tissu conjonctif fibroélastique de soutien, conférant à la peau ses propriétés biomécaniques de résistance, de souplesse et d'élasticité (Daly, 1982; Prost-Squarcioni et al., 2008). Le derme est principalement composé de fibres de collagène (Branchet et al., 1991), mais également de protéoglycanes et de glycoprotéines de structure qui interviennent dans les interactions cellule-matrice (Krieg and Aumailley, 2011). L'ensemble de ces fibres est dénommé matrice extracellulaire (MEC).

Le derme est principalement colonisé par des fibroblastes, cellules d'origine mésenchymateuse fusiformes et étoilées avec de longs prolongements cytoplasmiques (Sorrell and Caplan, 2004). Les fibroblastes produisent et sécrètent la majorité des molécules constituant la MEC mais également des protéases, les métalloprotéases matricielles (MMPs) capables de dégrader et remodeler cette matrice (Page-McCaw et al., 2007; Woessner, 1991). D'autres cellules sont également présentes au sein du derme : des cellules endothéliales qui composent les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (Detmar, 1996) ainsi que de nombreuses cellules inflammatoires et immunitaires comme les cellules dendritiques (Lappin et al., 1996), les lymphocytes T (LT) (McLellan et al., 1998), les cellules natural killer (NK) (Muller et al., 2000), les mastocytes (Cowen et al., 1979; Janssens et al., 2005) et les macrophages (de Panfilis, 1996; Dupasquier et al., 2004).

Deux régions sont définies dans le derme. Elles diffèrent de par la composition et l'organisation de leur matrice extracellulaire (Breathnach, 1995) (**Figure 3**).

Le derme papillaire est le plus superficiel. Il est caractérisé par de nombreuses papilles dermiques dont il tient le nom. Il est plus cellulaire, vascularisé et innervé que le derme réticulaire. Il contient des capillaires qui s'étendent depuis le plexus sous-papillaire jusqu'aux papilles dermiques afin d'apporter par diffusion, les nutriments nécessaires à l'épiderme (Hern and Mortimer, 1999). Il se compose d'un assemblage de fines fibres de collagène de type I et III et de fibres d'oxytalan (Cotta-Pereira et al., 1976) synthétisées par les fibroblastes. De nature élastique, ces fibres sont disposées en un réseau irrégulier et peu dense (Smith et al., 1986). C'est au niveau du derme papillaire que sont retrouvés les annexes épidermiques (glandes sudoripares eccrines et mérocrine, les follicules pileux) et les récepteurs nerveux sensitifs (McLafferty et al., 2012).

Localisé sous le derme papillaire en profondeur, **le derme réticulaire** est défini comme un tissu conjonctif dense avec de nombreux faisceaux épais de fibres de collagène principalement de type I (Lochner et al., 2007; Weber et al., 1984). Ces fibres de collagène sont entremêlées à des fibres élastiques d'élaunine et d'élastine. Ces fibres ont un diamètre de plus en plus important à mesure qu'elles s'enfoncent dans la profondeur du derme (Yasui et al., 2004) et elles s'orientent parallèlement à la surface de la peau afin d'en accroître la résistance mécanique (Silver et al., 2001).

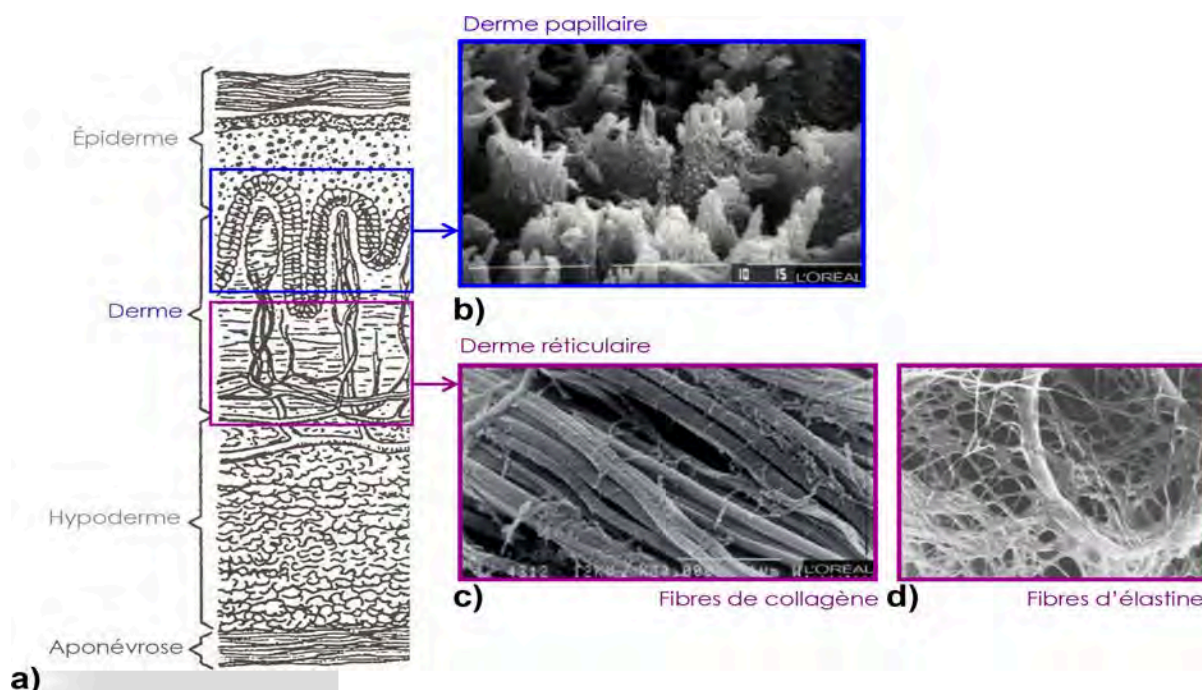


Figure 3 : Organisation du derme. Extrait de (Jacquemoud, 2007). a) Représentation schématique de la peau humaine. b) Derme papillaire à la jonction dermo-épidermique, observé en microscopie électronique à balayage. c)-d) Fibres de collagène et fibres d'élastine du derme réticulaire observées en microscopie électronique.

La jonction dermo-épidermique assure dans la peau des fonctions fondamentales. Elle possède un rôle de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et un rôle de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments. De plus, elle est également le support de l'adhésion et de la migration des kératinocytes lors de la restauration de l'intégrité épidermique, grâce notamment aux glycoprotéines qui la composent et plus particulièrement aux laminines (Aumailley and Rousselle, 1999; Karecla et al., 1994).

La jonction dermo-épidermique se compose de 4 parties allant de l'épiderme vers le derme (**Figure 4**).

La première partie est mince (environ 120nm). C'est l'ensemble formé par la membrane plasmique des kératinocytes basaux et leur structure d'attaches transmembranaires : **les hémidesmosomes**. Les hémidesmosomes assurent un lien permettant aux kératinocytes basaux de l'épiderme de se fixer au derme adjacent (Borradori and Sonnenberg, 1999; Green and Jones, 1996).

Deux structures définissent **la lame basale**, attenante à l'épiderme : la lamina lucida et la lamina densa. La lamina lucida est directement en contact avec l'épiderme ; elle provient de l'agencement de protéoglycanes et de glycoprotéines (Briggaman and Wheeler, 1975; Fine, 1991). La lamina densa (environ 70nm) est principalement composée de collagène de type IV (Yaoita et al., 1978), mais également de laminines, de nidogène ou entactine (Breitkreutz et al., 2013) et de protéoglycanes (Hellstrom et al., 2014).

La **lame réticulaire** en continuité avec le derme (Burgeson and Christiano, 1997), consiste en une matrice dense formée notamment de filaments de collagène de type III et I (Evans et al., 2000). Des fibrilles d'ancrage de collagène VII (principalement situées sous les hémidesmosomes), liées à la laminine 332 ou au collagène IV de la lamina densa, se projettent dans la matrice dermique (Rousselle et al., 1997) pour y être reliées et solidifier la membrane basale. Les fibrilles d'ancrage s'attachent au derme papillaire grâce à des plaques d'ancrage et à l'entrecroisement des filaments de collagène afin de constituer un véritable réseau d'enracinement tridimensionnel. À partir des plaques d'ancrage, d'autres fibrilles s'enracinent plus profondément ou relient les plaques entre elles.

Enfin, **la zone fibrillaire** contient des fibres d'ancrages reliant la lamina densa de la membrane basale à des plaques d'ancrage du derme papillaire. Les fibres d'ancrage sont constituées de collagène de type VII (Keene et al., 1987).

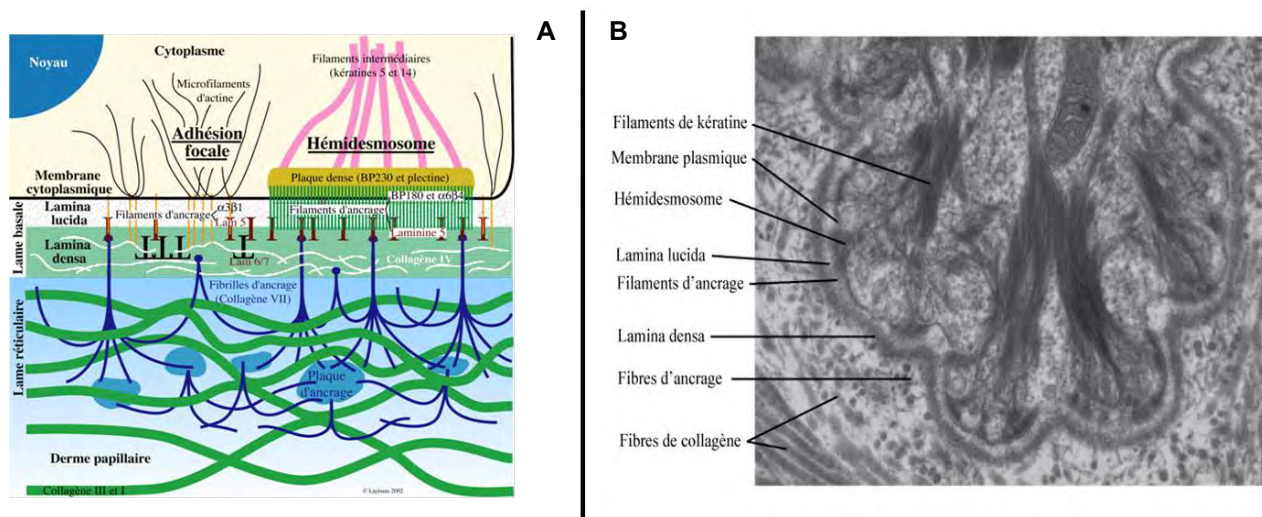


Figure 4 : Organisation de la jonction dermo-épidermique. a) Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique (Laplante, 2002). b) Jonction dermo-épidermique observée en microscopie (Regeants-of-University-of-Michigan-Medical-School., 2012).

3. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu graisseux sous-cutané, situé sous le derme profond. L'hypoderme est réparti sur tout le corps mais présente des épaisseurs variables selon sa localisation et le caractère sexuel de l'individu (Prigent, 2002). La limite entre le derme profond et l'hypoderme peut être difficile à différencier notamment si l'hypoderme contient une grande quantité de tissu adipeux. Il n'est séparé

par aucune structure bien précise et repose en profondeur sur les aponévroses musculaires ou directement sur le périoste osseux. Il joue un rôle de stabilisateur en limitant les trop grands déplacements de la peau.

L'hypoderme est composé de tissu conjonctif spongieux de nature adipeuse, parsemé d'adipocytes. Il contient des travées conjonctives fibreuses, peu cellulaires, lieu de passage des vaisseaux et des nerfs (ou septa). Il contient aussi des lobules graisseux plus ou moins volumineux faits d'adipocytes (Fruhbeck et al., 2001). Ces cellules graisseuses mésenchymateuses différenciées stockent les lipides sous forme de triglycérides (Flier, 1995) afin de libérer des acides gras en cas de besoin énergétique (Kanitakis, 1995). Ce tissu assure également l'isolation thermique de l'organisme et le protège des chocs grâce à ses amas de cellules groupées.

4. Les annexes épidermiques

Les glandes sudoripares/sudorales sont réparties sur toute la surface de la peau. Ces glandes sont à l'origine de la sécrétion de la sueur, mécanisme indispensable à la thermorégulation de l'organisme (Sato et al., 1989). Elles participent également à la protection de l'organisme via la synthèse d'un film hydrolipidique et à la sécrétion de toxines (Saga, 2002). Deux types de glandes sudoripares sont identifiables (Saga, 2001) les eccrines et les apocrines. Les eccrines sont principalement localisées dans le derme au niveau des régions palmoplantaires. Elles sont à l'origine de la sécrétion à la surface de l'épiderme de la sueur (mélange d'eau, d'acide lactique, d'urée, d'acides aminés, et de toxines issues du métabolisme (Hould, 1982). Les glandes apocrines sont situées dans l'hypoderme uniquement dans des zones précises comme les aisselles, les paupières, le pubis et les parties génitales. La sécrétion de sueur (non permanente) par les glandes apocrines, ne débute réellement qu'à la puberté, sous l'influence du système hormonal, des émotions et du stress. Cette sécrétion laiteuse est riche en molécules organiques (lipides, protéines) et de phéromones. Ces glandes sont toujours annexées à un follicule pilo-sébacé.

Les glandes sébacées, sont localisées au niveau du derme moyen, où elles sont accolées aux follicules pileux pour former les follicules pilo-sébacés, sauf au niveau des régions spécialisées comme l'aréole du sein et les lèvres. Elles sont constituées de sébocytes qui fabriquent et excrètent du sébum à la surface de la peau. Ce sébum participe avec la sueur, à la composition du film hydrolipidique (Downing et al., 1987), qui protège la peau du dessèchement, des petites écorchures ou agressions cutanées et des infections bactériennes via des propriétés antifongiques et antibactériennes (Makrantonaki et al., 2011).

Les poils ou les cheveux possèdent une structure complexe composée d'un bulbe ou matrice pileuse. C'est un amas de cellules matricielles qui prolifèrent et donnent naissance à des cellules épithéliales qui se kératinisent. Ce processus d'accroissement du poil s'effectue par cycles, alternant périodes de repos et de croissance. La gaine épithéliale est une invagination tubulaire de l'épiderme s'enfonçant dans le derme qui permet aux cellules matricielles de progresser vers la surface. La gaine épithéliale est entourée par le « sac fibreux du poil », gaine conjonctive formée par le derme et renfermant des vaisseaux et des terminaisons nerveuses sensibles. La dernière partie visible est la tige, biologiquement morte qui est dans l'axe de la gaine épithéliale. La coloration des poils et des cheveux est due à l'incorporation de mélanosomes aux cellules épithéliales destinée à former la kératine des phanères. La quantité de mélanosomes présents et la qualité du pigment (eumélanine noire ou phémélanine jaune orangée) contenu dans ces cellules (Slominski et al., 2005) conditionne la

coloration finale du poil. Le poil dans sa gaine, le muscle arrecteur (muscle redresseur du poil chez le mammifère), la glande sébacée et dans certaines régions la glande sudoripare apocrine, constituent le follicule pileux.

L'ongle comporte 3 parties : la racine, le corps et l'extrémité dont la croissance est ininterrompue (en moyenne de 0,1mm/jour) du fait de l'absence de desquamation. Il est constitué de cellules épithéliales kératinisées issues de la prolifération tangentielle de la matrice unguéale. Chaque ongle couvre et protège le dessus de la dernière phalange des doigts et des orteils.

5. Particularités de la peau de souris

Bien que la peau de mammifères soit assez semblable d'une espèce à l'autre, il est nécessaire de définir les spécificités que présente la peau de ces rongeurs par rapport à la peau humaine précédemment décrite (**Tableau 5**). Il est à noter que peu d'études publiées décrivent explicitement les différences structurelles et fonctionnelles entre ces deux types de peau.

	SOURIS	HOMME
Cycle pileaire	Approximativement 3 semaines	Grandement variable, région-dépendant
Architecture épithéliale	Pas de crêtes épidermiques	Crêtes épidermiques présentes
Glandes sudoripares apocrines	Non présentes dans la peau Vastes dans les glandes mammaires	Aisselles Région inguinale et périanale
Propriétés biomécaniques	Fine, souple, lâche	Plus épaisse sur certaines localisations Relativement rigide Adhérente aux tissus profonds
Epaisseur hypodermique	Dépendant du cycle pileaire	Moins variable
Couche musculaire sous-cutanée	Présent à travers le <i>panniculus carnosus</i>	Présente uniquement dans la région du cou (platysma)
Principale méthode de cicatrisation des plaies	Contraction	Formation d'un tissu de granulation Processus de réépithélialisation

Tableau 5 : Différences majeures entre la peau murine et humaine. Adapté de (Wong et al., 2011).

Globalement, avec une moyenne de 400µm, contre 1400µm pour la peau humaine, l'épaisseur de la peau de souris est beaucoup plus fine (**Figure 6**). Cette différence s'explique par le faible nombre d'assises cellulaires épidermiques (2-3) que l'on retrouve chez l'animal comparé à l'humain (10 à 15). Le tissu sous-cutané (*panniculus carnosus*) de la souris, ne possède aucune adhésion avec le fascia musculaire et donc lui confère une certaine mobilité et une aptitude de déplacement relativement importante (Calvin, 1998). La peau du mâle est 40% plus rigide que celle de la femelle. Cela est dû en partie à un derme plus épais. Cependant, chez la femelle, ce sont l'épiderme et l'hypoderme qui se retrouvent hypertrophiés (Azzi et al., 2005). Cette particularité n'est pas présente chez l'homme.

La différence la plus notable se situe au niveau du nombre de follicules pileux (Sundberg and King, 1996) nettement plus important chez ces rongeurs (1000 par mm² contre 25 par mm² pour l'Homme). La présence et le développement de certains poils sont exacerbés comme c'est le cas avec les vibrisses, organes sensoriels à part entière qui renseignent l'animal sur le monde extérieur. Les poils murins ont également un cycle de vie différent de celui de ceux des humains (Porter, 2003) (Paus et al., 1999). Le cycle pileaire, peut être décomposé en trois phases : anagène, catagène et télogène (phase de croissance, repos et d'expulsion).

Les cellules de Merkel ne sont pas présentes dans l'épithélium murin mais se retrouvent dans la gaine folliculaire externe des vibrisses et des coussinets plantaires (Moll et al., 1996). Chez l'homme, une faible proportion de cellules LTCD8⁺ sont observées dans l'épiderme, avec une part très faible de LT γ (à l'inverse des LT $\alpha\beta$ ⁺). Ces cellules sont dispersées dans l'épiderme au niveau de la couche basale des kératinocytes et du derme (Tamaki et al., 2001). Cette situation est très différente de celle observée chez la souris, où l'on retrouve une forte population de LT $\gamma\delta$ et de LT V γ 5V δ 1, appelés cellules T dendritiques épidermiques (DETC) (Jameson and Havran, 2007) et des cellules NK 1.1⁺ (Clark, 2010).

Plus récemment, l'analyse comparative de transcriptomes (murins versus tissu cutané humain) a permis de mettre en évidence le faible pourcentage (30,2%) de degré de similitude entre la peau de l'homme et celle de la souris (Gerber et al., 2014). La majorité des gènes identifiés comme étant communs, codent pour des protéines en relation avec des fonctions structurales. Néanmoins, des similitudes avec des gènes impliqués dans certaines composantes fonctionnelles cellulaires comme la morphogenèse et l'adhésion cellulaire, ainsi que dans la transduction de signaux cellulaires sont retrouvées.

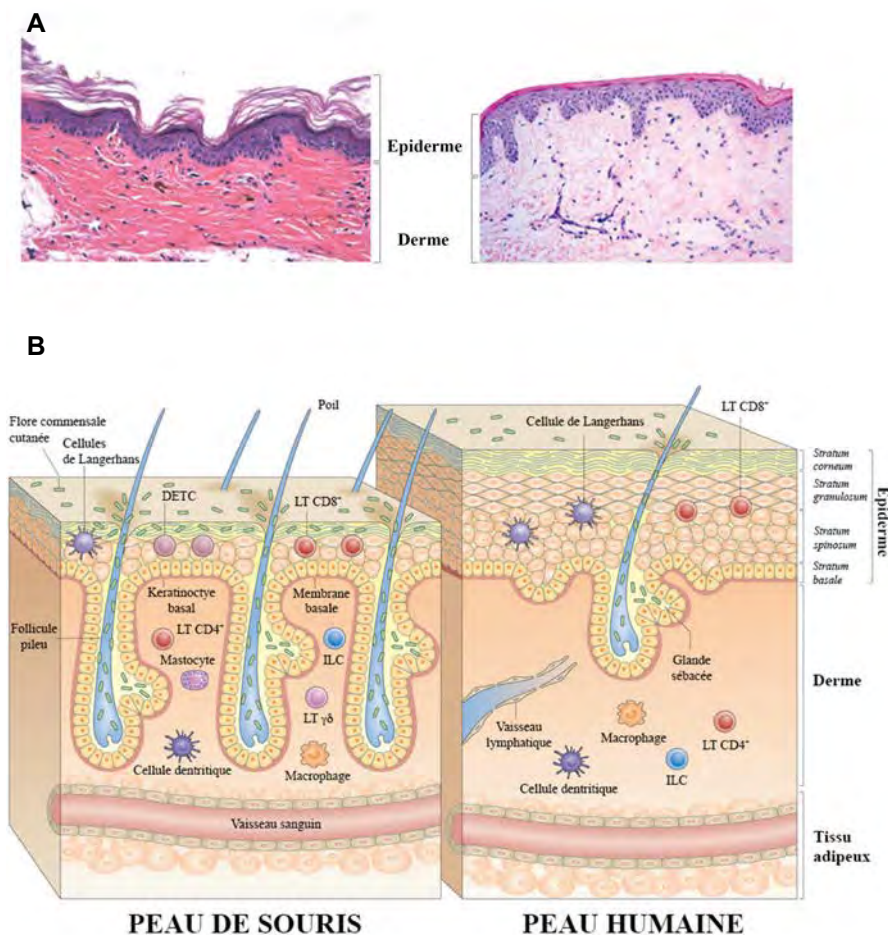


Figure 6 : Comparaison des structures et composants cellulaires de la peau murine et humaine. Adaptée de (Pasparakis et al., 2014; Wagner et al., 2010). **a)** La peau humaine a un épiderme et un derme plus épais que la peau de souris. La peau de souris présente des follicules pileux très denses contrairement à la peau humaine, où de plus grandes zones interfolliculaires sont visibles. **b)** Les types de cellules immunitaires les plus répandues dans l'épiderme humain sont des cellules de Langerhans et les cellules TCD8⁺. Dans l'épiderme de la souris, les cellules dendritiques épidermiques V γ 5⁺ T (DETC) sont fortement présentes et sont absentes de l'épiderme humain. Chez l'homme et la souris, le derme est peuplé par des macrophages, des mastocytes, des cellules T $\alpha\beta$ classiques et une petite population de cellules lymphoïdes innées (ILC).

CHAPITRE II

LA CICATRISATION CUTANEE

La cicatrisation d'une plaie est un processus physiopathologique naturel, multifactoriel et dynamique visant à rétablir l'intégrité et la fonctionnalité des tissus lésés (Martin, 1997; Singer and Clark, 1999). Elle s'articule autour de cascades complexes impliquant des événements cellulaires et biochimiques.

De manière générale, le processus de cicatrisation peut être divisé en trois phases majeures (Hosgood, 2006; Stadelmann et al., 1998) (Figure 7).

- **Une phase inflammatoire**, généralement initiée par une étape d'hémostase.
- **Une phase de prolifération ou de granulation** correspondant à la phase de réparation tissulaire. La transition entre la phase inflammatoire et la phase de prolifération/réparation est sous le contrôle d'une étape dite de **résolution de l'inflammation**
- Enfin, **la phase de remodelage**, la plus longue. Elle permet aux structures nouvellement créés, de retrouver des caractéristiques fonctionnelles et esthétiques proches des tissus originaux.

Bien que traditionnel, ce découpage est assez arbitraire. En effet, le processus cicatriciel ne se déroule pas comme une succession de phases strictement indépendantes mais comme un enchevêtrement d'étapes dépendantes les unes des autres (Gosain and DiPietro, 2004).

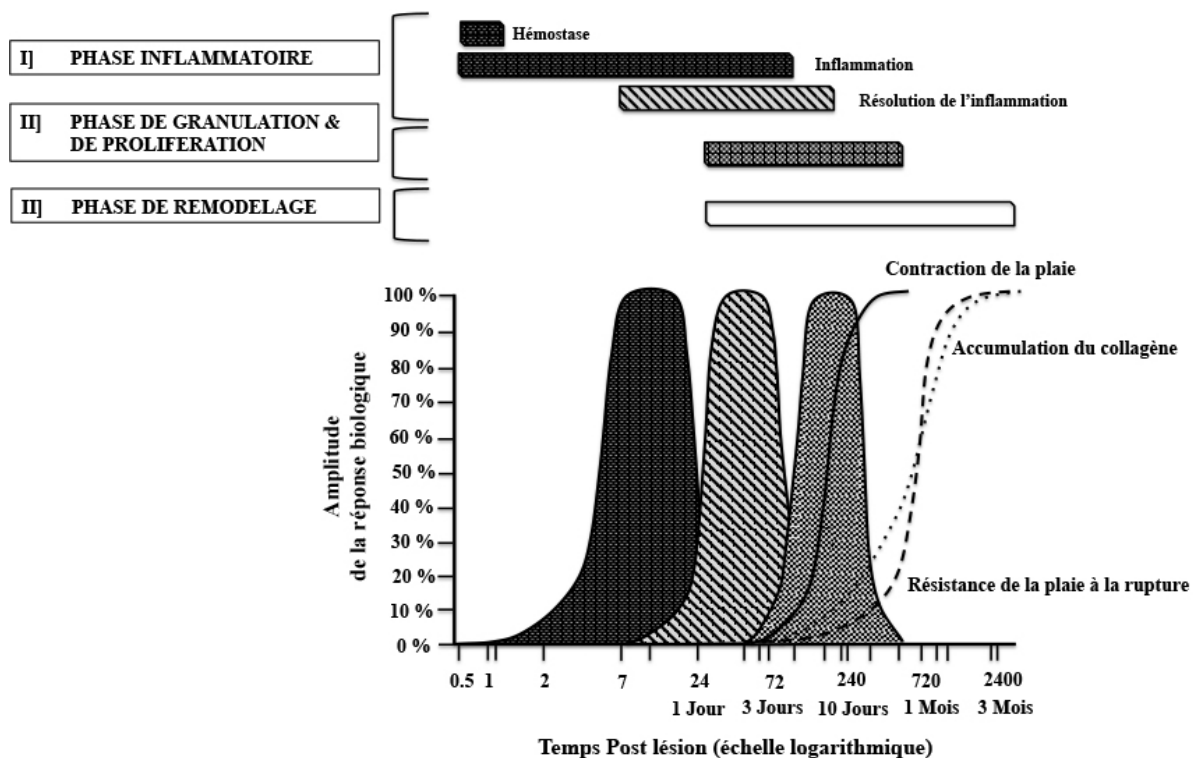


Figure 7 : Principales phases du processus de cicatrisation cutanée. Les 3 principales étapes de la cicatrisation : Phase inflammatoire, phase de granulation et de prolifération et la phase de remodelage. Adaptée de (Kloth, 2002).

Il existe deux processus de cicatrisation : la régénération et la réparation (Ud-Din et al., 2014). Malgré le potentiel de régénération visible au stade fœtal, la plupart des plaies chez les mammifères adultes cicatrisent suivant le mode de réparation (Colwell et al., 2003; Kishi et al., 2012; Murawala et al., 2012). C'est plus particulièrement le cas des plaies cutanées. Ce processus ne restaure pas l'intégrité fonctionnelle et phénotypique initiale des organes touchés, mais aboutit à la formation d'une cicatrice (Bayat et al., 2003) plus ou moins invalidante, avasculaire et le plus souvent fibreuse (Gurtner et al., 2008).

Classiquement, trois types de cicatrisation sont décrites (Broughton et al., 2006) (**Figure 8**). La cicatrisation par première intention (Johnstone and Farley, 2005), la cicatrisation par seconde intention dans les cas où des complications surviennent avec une perte tissulaire plus importante (Lowry et al., 1997) et la cicatrisation de troisième intention (ou de seconde suture) qui concerne les plaies laissées volontairement à l'air libre. Le plus souvent infectées, la fermeture de ces lésions ne progresse plus et entraîne à terme, l'installation d'une plaie chronique (Strodtbeck, 2001).

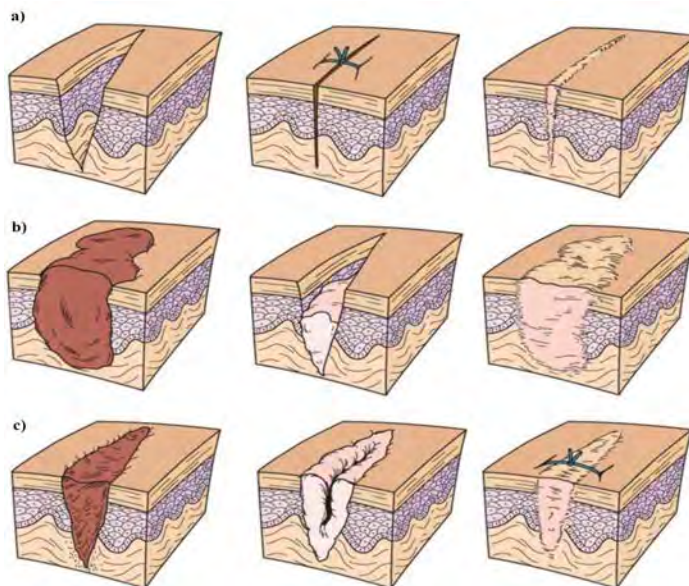


Figure 8 : Les différents types de cicatrisation. a) Cicatrisation de première intention. La plaie est de faible envergure, avec peu de pertes du tissu biologique initiales. La cicatrice résultante est minime. **b) Cicatrisation de deuxième intention.** La plaie est étendue, hémorragique avec possibilité de traces de nécroses. La cicatrice est large, peu esthétique et de fonctionnalités réduites. **c) Cicatrisation de troisième intention.** Plaie stagnante, évoluant vers la chronicité. Elle est laissée à l'air libre, nettoyée puis fermée par acte chirurgical. La cicatrice est très épaisse et invalidante. Adaptée de (Biology Discussion Forums For All Your Science Needs, 2013).

1. L'inflammation

« Rubor et tumor cum calor et dolore », cette description de l'inflammation par Cornelius Celsus au 1er siècle avant JC a traversé le temps. Les aspects qui y sont décrits sont généralement proches de la réalité : la rougeur, la chaleur, l'œdème et la douleur résument bien les signes cliniques relatifs à une inflammation, semblables à ceux rencontrés dans le contexte cicatriciel. Le processus inflammatoire est un processus complexe qui implique une série d'événements cellulaires et biochimiques interdépendants essentiels au déclenchement de la réparation des tissus endommagés (Medzhitov, 2008).

L'inflammation est la première étape indispensable au processus de réparation tissulaire, cependant, une réponse inflammatoire inefficace ou incontrôlée contribue à des dysfonctionnements cellulaires et à des défauts de réparation tissulaire.

1.1. L'hémostase

Suite à une blessure, de nombreux vaisseaux peuvent être endommagés. En réponse, l'organisme déclenche l'hémostase (**Figure 9**). Cette réponse immédiate permet d'arrêter l'épanchement sanguin au niveau de la brèche vasculaire (Zucker, 1947). Tout comme le processus de cicatrisation, l'hémostase regroupe plusieurs mécanismes, initiés simultanément et liés entre eux (Brass et al., 2005; Furie and Furie, 2007).

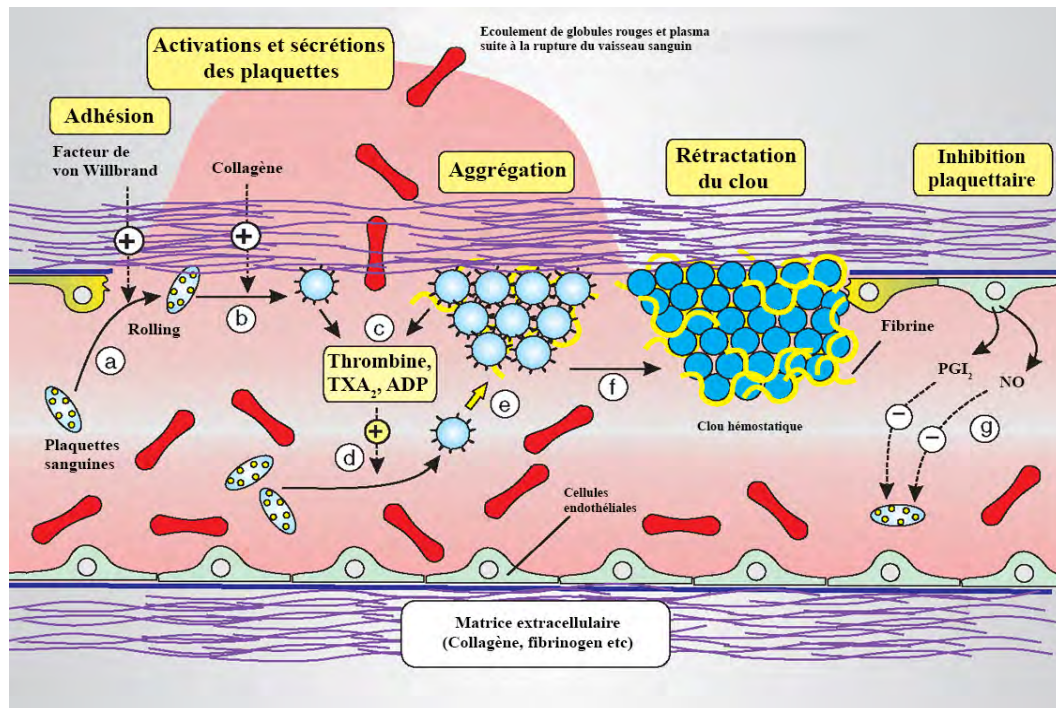


Figure 9 : L'hémostase. a) Adhésion des plaquettes sur l'endothélium endommagé. b) -c) Activation plaquettaire et dégranulation d'agents pro-agrégants. d)-e) Fixation le fibrinogène. Un réseau réversible de plaquettes agrégées se forme. f) Le fibrinogène est transformé en fibrine : formation du clou hémostatique. Le réseau plaquettaire se rétracte, c'est l'homostase secondaire. g) Fibrinolyse : dissolution du caillot sanguin. Adaptée de (Berridge, 2012).

1.1.1 L'hémostase primaire

L'hémostase primaire débute par une vasoconstriction réflexe des vaisseaux lésés. L'endothélium des vaisseaux synthétise plusieurs composés qui inhibent l'aggrégation plaquettaire comme la prostacycline (PGI₂) (Darius et al., 1995; Weiss and Turitto, 1979) ou le monoxyde d'azote (NO) (Radomski et al., 1987; Yan et al., 1996). Lors d'une atteinte vasculaire, la rupture de la continuité vasculaire met à nu la monocouche de cellules endothéliales du sous-endothélium. Les plaquettes sanguines peuvent alors reconnaître et lier les structures matricielles endommagées (Nuyttens et al., 2011). Cette reconnaissance peut se faire soit de manière directe, via des récepteurs aux intégrines (notamment $\alpha 2\beta 1$) et via la GPIV reconnaissant le collagène (Clemetson and Clemetson, 2007); soit de manière indirecte via les récepteurs GPIb-V-IX et le facteur XIII de Willebrand qui permet leur fixation au sous-endothélium. L'activation et la production de thromboxane A₂ (TXA₂) (Shida et al., 2014) qui en découle provoque quasi instantanément la dégranulation des granules plaquettaire avec la libération de nombreux médiateurs pro-agrégants : adénosine5'-diphosphate (ADP), sérotonine, TXA₂... (Coppinger et al., 2004; Paul et al., 1999). Les récepteurs GPIIb/IIIa (CD41a) plaquettaire changent de conformation et viennent fixer également le fibrinogène plasmatique (facteur I de la coagulation) (Bennett, 2001). Ces événements concourent à une aggrégation plaquettaire et la formation d'un clou thrombotique (Jackson, 2011; Ruggeri, 2002).

1.1.2 L'hémostase secondaire

La cascade de coagulation (**Figure 10**) implique une série de facteurs plasmatiques permettant la conversion du fibrinogène en fibrine afin de rendre le clou thrombotique stable (Renne et al., 2006).

La voie intrinsèque (Gailani and Renne, 2007) (ou endogène) implique une activation en cascade de facteurs sanguins dépendants de l'activation du facteur XII, lorsque celui-ci entre en contact avec le collagène exposé. Le déclenchement de la cascade de coagulation et la formation du clou plaquettaire sont donc concomitants.

A l'inverse, **la voie extrinsèque** (Mackman et al., 2007) est initiée par un facteur extérieur aux vaisseaux sanguins produit par les cellules endommagées après un traumatisme tissulaire : la thromboplastine ou facteur III.

Ces deux voies distinctes s'achèvent par l'obtention du complexe X, à l'origine du complexe activateur de la prothrombine ou prothrombinase (facteur Xa, et Va) et par la synthèse de thrombine. La thrombine convertit finalement le fibrinogène en fibrine (Wolberg, 2007). C'est le facteur XIIIa qui viendra stabiliser le tout (Ariens et al., 2002). Lorsque le caillot est formé, les plaquettes emprisonnées vont induire une rétraction du réseau de fibrine, et de ce fait le rapprochement des bords de la lésion (Tucker et al., 2012).

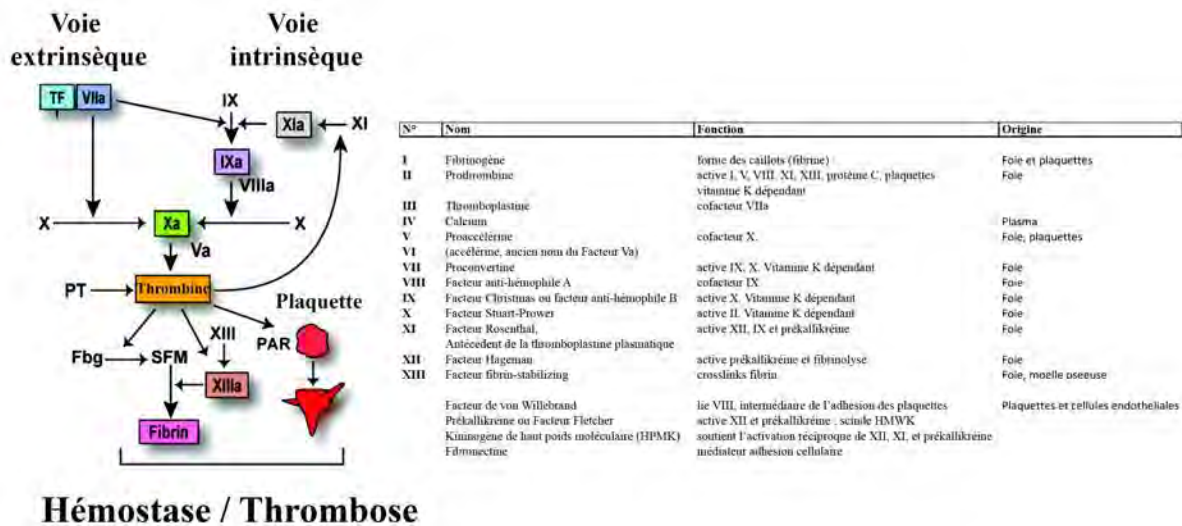


Figure 10 : Cascade de la coagulation. Adaptée de (Mackman, 2004). Facteurs tissulaires dans la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. PAR : Protease-Activated Receptors ; PT : Prothrombine ; SFM : Monomère de Fibrine Soluble ; TF :Facteur Tissulaire.

1.1.3 La fibrinolyse

La fibrinolyse, via la plasmine, a pour but d'empêcher l'extension du clou hémostatique pour permettre sa dissolution (Thompson et al., 1996) et engager le processus de repermeabilisation de la paroi endommagée. C'est une enzyme protéolytique, issu du plasminogène présent dans le sang, très puissante capable de dégrader le réseau de fibrine, de détruire le fibrinogène ainsi que d'autres facteurs de coagulation. Elle est le produit de la transformation du plasminogène plasmatique en plasmine via : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), principalement synthétisé par les cellules endothéliales au niveau de la lésion (Kooistra et al., 1994) ; et via l'urokinase produite au niveau du caillot sanguin, à partir de la pro-urokinase (Myohanen and Vaheri, 2004).

Cette fibrinolyse est assurée par les cellules endothéliales préalablement activées et les macrophages qui vont produire de nombreuses MMPs, des activateurs du plasminogène (et de la plasmine) capables de désagréger les membranes basales, le réseau de fibrine et ses structures environnantes (Nagase and Woessner, 1999).

Les inhibiteurs de la plasmine comme l'alpha 2 macroglobuline (de Boer et al., 1993), l'alpha 2 antiplasmine (Carpenter and Mathew, 2008), et les inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1 et le PAI-2) (Gils and J., 2003; Saksela et al., 1985) assurent l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse (Li et al., 2003).

1.2. La phase inflammatoire proprement dite

La phase d'hémostase laisse progressivement place à l'apparition d'un œdème au niveau du pourtour de la lésion. Son origine est multiple. Il est provoqué aussi bien par la congestion des vaisseaux sanguins, que par l'occlusion de ceux du système lymphatique. Les cellules endothéliales, sous l'effet des médiateurs libérés, se contractent, provoquent un accroissement des espaces intracellulaires, une augmentation de la perméabilité capillaire et une extravasation supplémentaire (Maslinska and Gajewski, 1998). Le plasma et ses constituants vont alors traverser les parois vasculaires. Ce liquide, nommé « exsudat » contient de nombreuses cellules, enzymes, anticorps et diverses molécules impliquées dans la poursuite du processus inflammatoire.

Durant cette phase, de nombreux médiateurs cytokiniques mais aussi lipidiques sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. Le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), fortement produit durant cette phase, favorise l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et facilite la migration leucocytaire sur le site lésionnel via leurs récepteurs (CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11c/CD18 (gp150, 95) et CD11d/CD18) (Carman and Springer, 2004; Kulidjian et al., 1999). Les cytokines de la famille de l'interleukine 1 (IL-1) (notamment IL-1 α et IL-1 β) induisent également l'expression de molécules d'adhésion et stimulent les cellules stromales. La libération des chimiokines qui en découle, favorise le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires sur le site de la lésion (Chang et al., 2012; Dinarello, 1996).

Les neutrophiles (PNNs), jouent un rôle majeur dans l'élimination des corps étrangers, des agents pathogènes susceptibles de contaminer la plaie, mais également dans la suppression des débris cellulaires et tissulaires (Hart, 2002). Les PNNs sont à l'origine de la production de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de protéases qui peuvent endommager les tissus nouvellement formés (Dovi et al., 2004). Les PNNs nécessaires au bon déroulement de la phase inflammatoire (Singer and Clark, 1999) doivent donc progressivement laisser leur place afin de limiter leurs fonctions pro-inflammatoires (El Kebir and Filep, 2010; Geering and Simon, 2011). Dans une situation normale, les PNNs ont une courte durée de vie et entrent rapidement en apoptose (Savill, 2000) afin que le processus de réparation puisse s'amorcer.

L'implication des lymphocytes a été établie via notamment de nombreuses études portant sur la déplétion de cette population (Martin and Muir, 1990). Plus particulièrement, il a été mis en évidence la participation des DETC dans l'origine de la production de nombreux facteurs de croissance comme l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) et le fibroblast growth factor (FGF) 7 et 10 (Barbul and Regan, 1990; Jameson et al., 2002; Schaffer and Barbul, 1998; Toulon et al., 2009).

Les mastocytes, en dégranulant libèrent une multitude d'enzymes, histamine, et autres amines actives qui sont impliquées dans les signes caractéristiques de l'inflammation (Noli and Miolo, 2001). Ainsi, la perméabilisation des vaisseaux devient plus importante et permet aux monocytes circulant de s'infiltrer plus facilement (Artuc et al., 1999; Oskeritzian, 2012).

Cette phase inflammatoire doit progressivement laisser sa place au processus de réparation tissulaire dépendant de l'apparition de la phase de résolution de l'inflammation, elle-même contrôlée par les macrophages. Bien qu'il fût établi que la résolution de la réponse inflammatoire aiguë était un processus passif, il est maintenant clairement démontré qu'il s'agit d'un processus actif. En effet, cette réponse implique l'activation rapide de voies de signalisation finement contrôlées, qui induisent la génération d'une réponse inflammatoire adaptée (Serhan et al., 2007).

2. Phase proliférative et de réparation

Cette étape a pour but de reconstruire le tissu conjonctif, la MEC et l'épithélium via deux principaux mécanismes : (i) la génération d'un tissu de granulation et son épithémisation ; (ii) et sa néo-angiogenèse. Cette phase est initiée par des facteurs de croissance et des cytokines libérés par les cellules immunitaires et les plaquettes (**Tableau 11**).

Processus	Facteurs de croissances/Cytokines impliqués
Infiltration de neutrophiles	TGF- β , MCP-1, MIP2/GRO- α , IL-8, IL-6, IL-10(—)
Infiltration des macrophages	TGF- β , MCP-1, MIP-1 α , IL-10(—)
Angiogénèse	VEGF-A, PLGF, FGF2, Angiopoietins, HGF, Cyr61, MCP-1, IL-8, GRO- α , GM-CSF, IP-10(—)
Fibroplasiae	PDGF, TGF- β , CTGF, GM-CSF, IGFs
Dépôt de matrice	FGF2, IGF-1, NGF, TGF- β , Activin, MCP-1, CTGF, Cyr61
Cicatrice	IGF-1, TGF- β , Activin, CTGF, IL-6, IL-10(—)
Reepithélialisation	FGF2, FGF7, FGF10, EGF, TGF- α , HB-EGF, NDF, IGFs, NGF, Activin, MCP-1, IL-6, GM-CSF, Leptin, TGF- β (—), BMP-6(—), IP-10(—)

Tableau 11 : Effets des facteurs de croissance et des cytokines produites durant le processus cicatriciel. Adapté de (Werner and Grose, 2003).

2.1. Formation du tissu de granulation

Les cellules mésenchymateuses non différenciées, situées dans le tissu conjonctif périphérique de la lésion vont être à l'origine du recrutement des fibroblastes au niveau des berges de la plaie (**Figure 12**). Ces cellules sortent de leur état de quiescence pour s'activer et adopter un phénotype leur permettant de migrer dans la matrice provisoire de fibrine en direction de molécules chimiotactiques produits lors de l'inflammation. Ceci est dû à leur sensibilité prononcée à certains facteurs, comme le FGF (Gospodarowicz, 1974), le platelet-derived growth factor (PDGF) (Seppa et al., 1982) et le transforming growth factor β (TGF- β) (Postlethwaite et al., 1987). En plus de ce chimiotactisme, les fibroblastes vont prendre appui sur le réseau de fibrine (en le dégradant) et sur le réseau de collagène, afin de s'en servir comme support de migration.

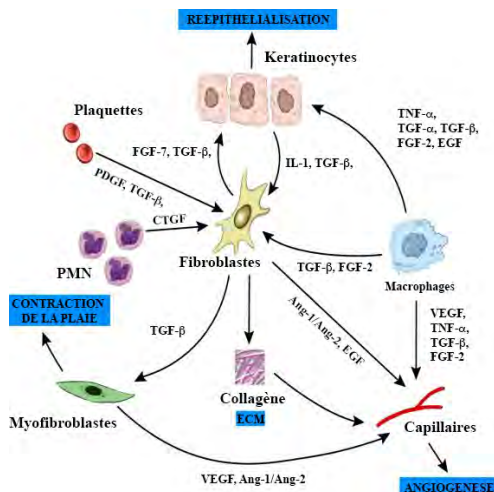


Figure 12 : Interaction entre les fibroblastes et les différentes populations cellulaires. Adaptée de (Greaves et al., 2013).

Au fur et à mesure de la dégradation de la matrice de fibrine, les fibroblastes de la plaie commencent à synthétiser une matrice riche en fibronectine et en collagène III. Il s'agit de la formation du tissu de granulation à l'intérieur du site de la plaie (Greaves et al., 2013). Les fibroblastes se multiplient au niveau de la lésion sous l'influence du PDGF produit par les plaquettes. Durant la phase proliférative, ce sont les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales qui vont à leur tour sécréter des facteurs de croissance (Lobmann et al., 2006). Au fur et à mesure que la nouvelle MEC est synthétisée, les fibroblastes adoptent le phénotype de myofibroblastes caractérisé par leur forme allongée et la présence de paquets de filaments d'actine le long de leur membrane plasmique (Hinz, 2007). Finalement, grâce à des contacts cellules-cellules et cellules-matrice (médiés par la fibronectine) les myofibroblastes se contractent.

Le TGF- β stimule la migration des fibroblastes et la synthèse de la MEC (fibronectine et collagène) par les fibroblastes. Cette cytokine favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Lucas et al., 2010), cellules capables de se contracter (Lobmann et al., 2005). Le TGF- β , par son action stimulatrice sur les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes est lié à la fibrose (Martin and Leibovich, 2005) ainsi qu'à d'autres facteurs tels que le PDGF, l'IL-8, l'IGF-1 et l'epidermal growth factor (EGF) responsables de la stimulation de la prolifération, de la migration, et de la différenciation des cellules endothéliales. En plus de son action sur la synthèse de collagène, le TGF- β inhibe les collagénases et l'action des MMPs, en régulant la synthèse de leurs inhibiteurs : les "tissue inhibitor of metalloproteinase" (TIMPs) (Brew et al., 2000; Gomez et al., 1997; Nagase et al., 2006). En induisant l'augmentation de la synthèse des TIMPs tout en diminuant celle des MMPs, cette cytokine empêche la dégradation totale de la MEC (Edwards et al., 1996; Edwards et al., 1987). La migration des fibroblastes est également liée à de multiples facteurs environnementaux, comme notamment une pression partielle en oxygène réduite (Edwards et al., 1996; Oberringer et al., 2008).

2.2. La réépithélialisation

Cette étape a pour finalité la régénération par les kératinocytes d'un épiderme garant de l'intégrité de la barrière épithéliale (Raja et al., 2007). La restauration épidermique commence par la migration des kératinocytes à partir de la périphérie de la plaie (Krawczyk, 1971; Pang et al., 1978). Parallèlement, suite à la rupture de la membrane basale et à la libération de collagène de type IV, les kératinocytes migrent de manière radiale à partir d'annexes cutanées intactes (Kainulainen et al., 1998). Cette réépithélialisation par foyers multiples se rajoute à celle observée à partir des berges de la plaie.

L'orientation des fibres de collagène jouent un rôle incontestable : il s'agit de l'haptotactisme. Les kératinocytes vont surexprimer et redistribuer à leur surface des intégrines comme l' $\alpha 6 \beta 4$ et l' $\alpha 2 \beta 1$ qui vont faciliter leurs migration (Decline and Rousselle, 2001; Mercurio et al., 2001; Watt, 2002). L' $\alpha 2 \beta 1$ présente une forte affinité pour le collagène de type I et la fibronectine, que l'on retrouve en grande quantité dans le tissu de granulation en cours de formation. Les kératinocytes expriment également des récepteurs aux facteurs de croissance de type EGF, qui ont pour particularité de se lier à l'héparine (HB-EGF) et accélérer la migration des kératinocytes (Chen et al., 1993; Shirakata et al., 2005). Les kératinocytes en migration expriment également des éléments de la matrice provisoire, comme la laminine 5 332 (Amano et al., 2004; Larjava et al., 1993), avec un panel caractéristique de cytokératines (K6, K16 et K17) et d'intégrines de surface. (Leigh et al., 1995; Usui et al., 2005).

Actuellement, deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme de la réépipithélialisation d'une plaie (**Figure 13**). Le premier, est le **modèle de migration « en feuillet » ou par glissement**. Les kératinocytes migrent en un groupe cohésif, jusqu'à ce que la plaie soit complètement recouverte (Buck, 1979; Laplante et al., 2001; Vaughan and Trinkaus, 1966). Le second modèle dit **en « saute-mouton » ou par roulement**, propose une migration des kératinocytes les uns par-dessus les autres, jusqu'à leur ancrage à la MEC où ils deviennent immobiles (Ortonne et al., 1981).

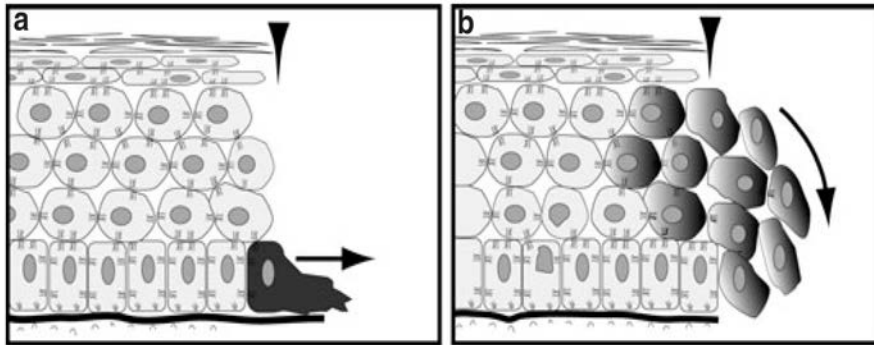


Figure 13 : Représentation schématique des 2 modèles de réépipithélialisation.
 a) Modèle de migration en feuillet. b) Modèle de migration par roulement.
 Extrait de (Usui et al., 2005)

2.3. L'angiogenèse

L'angiogenèse est une composante importante de la phase de prolifération cellulaire (Mahdavian Delavary et al., 2011). Elle soutient l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules en multiplication au niveau de la plaie en cours de réparation (Whalen, 1992). Cette néovascolarisation est directement enclenchée dès l'arrivée des plaquettes et se poursuit jusqu'à la guérison de la plaie (**Figure 14**). Elle est principalement régulée par les macrophages, les cellules endothéliales et les kératinocytes (Mirza et al., 2009) par l'intermédiaire de différents facteurs sécrétés comme le vascular endothelial growth factor (VEGF) ainsi que le FGF, l'EGF et le TGF- β , selon la nature du tissu lésé (Diegelmann and Evans, 2004). Ces facteurs de croissance modulent la prolifération et stimulent les cellules endothéliales afin de générer de nouveaux capillaires sanguins (Li et al., 2007).

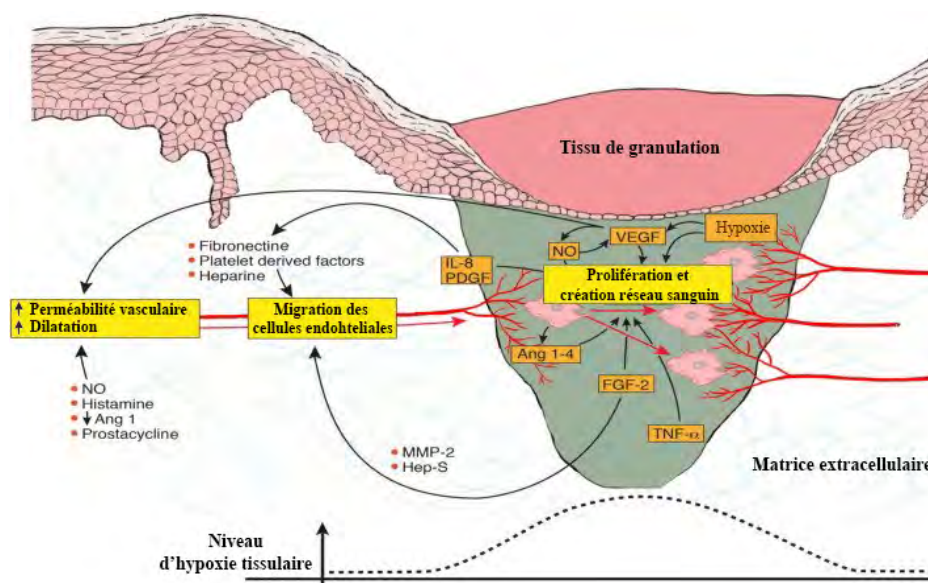


Figure 14 : Facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Suite à une lésion tissulaire, un gradient d'hypoxie se forme. Sous l'influence de médiateur à potentialité pro-inflammatoire (TNF- α , IL-8, héparine, NO, histamine prostaglandines, VEGF, PDGF, FGF-2...) une dilatation des capillaires existants s'opère. Les cellules endothéliales présentes vont être à l'origine de la formation de nouveau vaisseaux sanguins afin de permettre la restauration de l'intégrité du système vasculaire et l'expansion du tissu de granulation (Greaves et al., 2013).

Au cours de l'angiogenèse, la MEC et la membrane basale sont dégradées par des MMPs (produites en particulier par les macrophages) pour faciliter la migration des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales produisent également des protéases (gélatinases, collagénases, etc.) facilitant d'autant plus leur migration par chimiotactisme et leur différenciation. Parallèlement, d'autres cellules prolifèrent et se différencient pour permettre la formation de nouveaux vaisseaux. Ces mêmes vaisseaux fusionnent et donnent naissance au nouveau réseau capillaire.

La production de tous ces facteurs favorisant l'angiogenèse est déclenchée par le microenvironnement local où le pH, la pression d'oxygène et notamment l'hypoxie (Goodwin and Heppenstall, 1977; Singer and Clark, 1999) ainsi que les cytokines sécrétées par les macrophages, les lymphocytes T et les autres cellules du site de la plaie, jouent un rôle déterminant (Diegelmann and Evans, 2004; Knighton et al., 1983; Mosser and Edwards, 2008; Werner and Grose, 2003).

3. Phase de remodelage

La phase de remodelage tissulaire est la dernière phase, la plus longue, du processus de guérison d'une plaie. Elle se poursuit pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois (12 à 18 mois). Elle est cruciale pour l'obtention d'un tissu cicatriciel le plus proche possible des caractéristiques esthétiques, structurales et fonctionnelles du tissu initial.

Durant les phases précédentes, les fibres de collagène synthétisées ont été orientées de manière aléatoire et de façon totalement désordonnée. Le tissu cicatriciel qui en résulte est de faible résistance. Le collagène de type III présent dans la matrice est remplacé progressivement par du collagène de type I (Page-McCaw et al., 2007; Ramasastry, 2005). Cette nouvelle réorganisation médiée notamment par des MMPs (collagénases) et des serines protéases permet de rendre plus compacte et plus stable le nouveau réseau de fibres ainsi constitué (Armstrong and Jude, 2002; Reinke and Sorg, 2012).

Au cours des phases tardives de cicatrisation, l'élastine est faiblement exprimée. La restauration d'un réseau de fibres élastiques intactes et fonctionnelles est donc essentielle pour retrouver le fonctionnement complet de la peau après une blessure.

Lorsque l'oxygénation du tissu cicatriciel a retrouvé son niveau d'origine, la néovascularisation qui s'était fortement développée n'est plus utile et va donc régresser. Les nombreux vaisseaux générés lors de la formation du tissu de granulation diminuent en nombre mais augmentent en maturité (Diegelmann and Evans, 2004; Hoffman et al., 2006), ce qui a pour conséquence une régression des capillaires nouvellement formés et une atténuation de la rougeur de la cicatrice. Les filets nerveux et les corpuscules sensitifs sont de nouveau générés mais restent encore désordonnés. Ceci explique que la sensibilité ressentie au niveau des cicatrices est inférieure à celle ressentie au niveau de la peau normale. Finalement, le nombre de cellules présent dans le tissu diminue par apoptose (Greenhalgh, 1998). Par l'action des collagénases, l'aspect hypertrophique de certaines plaies, lié à une production de collagène et à des divisions cellulaires excessives, est en partie gommé. Lorsque ce processus est entravé, une cicatrice anormale apparaît et progresse le plus souvent en s'hypertrophiant : cicatrice hypertrophique voir chéloïde chez les personnes prédisposées.

De manière générale, l'ensemble de ces modifications aboutit à une récupération de l'ordre de 80% de la résistance initiale de la peau et à une restauration partielle des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques du tissu originel.

CHAPITRE III

MACROPHAGES ET CICATRISATION

Les études de déplétion des macrophages menées par Leubovich et Ross (Leibovich and Ross, 1975) ont montré que ces cellules du système immunitaire inné jouaient un rôle clé au cours du processus cicatriciel. Des travaux plus récents ont montré que l'absence de macrophages entraînait un retard de réépithélialisation et de néo vascularisation, la formation d'un tissu de granulation aberrant et finalement un retard de la fermeture de la plaie (Lucas et al., 2010; Mirza et al., 2009). Ainsi, ces travaux suggèrent que les macrophages interviennent dans toutes les étapes de la cicatrisation et que ces cellules sont indispensables au bon déroulement du processus cicatriciel.

A travers leur fonction de phagocytose, les macrophages interviennent dans la réponse immunitaire innée ; ils contribuent au maintien de l'homéostasie et ils participent au contrôle de nombreuses pathologies. Au cours de l'infection, la reconnaissance, par les macrophages, de motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMPs) conduit à la production de cytokines et de chimiokines. Ces médiateurs favorisent le recrutement d'autres cellules et déclenchent la réponse inflammatoire. En dégradant les antigènes provenant d'agents pathogènes et en les présentant aux lymphocytes T, les macrophages favorisent et initient l'immunité adaptative (Neeffjes et al., 2011).

Les macrophages sont présents dans tous les tissus. Ils proviennent des monocytes circulants (Gordon and Taylor, 2005). Ces macrophages dits « résidents » jouent le rôle de sentinelle. Selon leur localisation tissulaire, les macrophages présentent différents phénotypes morphologiques et fonctionnels. C'est le cas par exemple des macrophages présents au niveau du foie (cellules de Kupffer), de l'os (ostéoclastes), du cerveau (microglie) et de la peau (histiocytes). Les macrophages résidents qui interviennent dans l'initiation d'une réponse inflammatoire ne participent que faiblement au processus de cicatrisation (MacDonald et al., 2010). Inversement, de par leur plasticité phénotypique et fonctionnelle, les macrophages recrutés au niveau d'une lésion tissulaire vont jouer un rôle déterminant dans le rétablissement de l'homéostasie. Ils contribuent à toutes les étapes du processus cicatriciel.

1. Polarisation des macrophages

De manière générale, les monocytes, les macrophages résidents et recrutés, sont sensibles à une multitude de signaux présents dans leur microenvironnement. Ces signaux vont contribuer à les différencier et à les activer. Ainsi, au cours des deux dernières décennies, plusieurs travaux ont permis d'importantes avancées concernant le concept de polarisation des macrophages. Aujourd'hui, différentes formes d'activation des macrophages sont bien identifiées. Initialement, les macrophages ont été classés en macrophages activés classiquement et en macrophages activés alternativement (Gordon, 2003; Gordon and Martinez, 2010; Stein et al., 1992). Cette dichotomie était basée sur l'influence des cytokines de type I (interféron γ (IFN- γ), TNF- α) et de type II (IL-4, IL-13) sur le développement de sous-ensembles de macrophages ayant des fonctions souvent opposées et complémentaires. Par la suite, les termes macrophages M1 et M2 ont été introduits en référence à l'activation des macrophages parallèlement à la polarisation des lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2 (**Figure 15**).

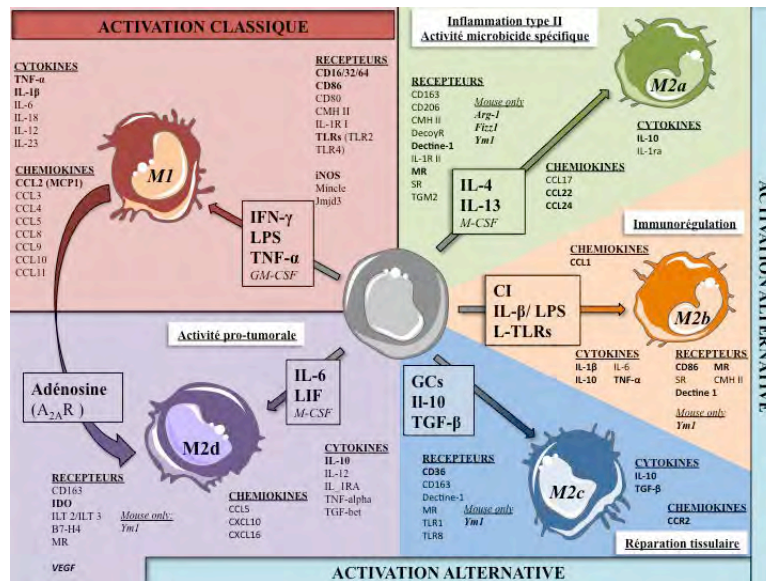


Figure 15 : La polarisation des macrophages

1.1. Les macrophages de type 1 activés classiquement (M1)

Les macrophages activés de façon classique sont retrouvés dans un environnement de cytokines de type I (IFN- γ , TNF- α) et sont absents dans un environnement de cytokines de type II (IL-4, IL-13) (Baetselier et al., 2001; Brombacher et al., 2009; Classen et al., 2009). Ces macrophages ont la particularité de présenter des fonctions anti-tumorales et antimicrobiennes. Ils reconnaissent les agents pathogènes opsonisés via leurs nombreux récepteurs aux opsonines présents sur leur surface. Les voies de signalisation cellulaire déclenchées par ces récepteurs aboutissent à l'activation de nombreux facteurs de transcription, comme STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) (Hardison et al., 2012), NF- κ B et également la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) et des « Interferon Regulatory Factors » (IRFs) (Held et al., 1999; Schroder et al., 2006). Ces voies de signalisation sont à l'origine de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu comme le TNF- α , l'IL1- β , et l'IL-6. Ces macrophages sont aussi capables de produire des molécules cytotoxiques tels que les ROS.

De par leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles bien définies, on considère que ces macrophages M1 sont de type inflammatoire. Ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques (Gordon, 2003) et de nombreuses maladies auto-immunes. Ils sont à l'origine des dommages tissulaires observés dans ces pathologies (Andersson et al., 2004).

1.2. Les macrophages de type 2 activés alternativement (M2)

A l'opposé des macrophages M1, les macrophages activés alternativement (macrophages de type 2) se différencient dans un environnement de cytokines de type II et sont inhibés par les cytokines de type I (Gordon, 2003; Kodolija et al., 1998; Stein et al., 1992; Stumpo et al., 1999). Récemment, le sous-type M2 a été subdivisé en 3 sous-classes : les macrophages M2a, M2b, M2c sur la base de leurs marqueurs membranaires et en fonction de leurs caractéristiques fonctionnelles (profil de production de cytokines et de chimiokines) (Mantovani et al., 2004). D'autres classifications ont aussi été proposées (Mosser and Edwards, 2008) tenant compte plus spécifiquement des fonctionnalités cellulaires qu'exercent ces macrophages. Ces différentes approches ne sont pas opposées et permettent de nos jours d'identifier un grand nombre de nouveaux sous-types : M2a, M2b, M2c et plus récemment les macrophages M2d, M4, Mox, Mhem (Colin et al., 2014; Gleissner, 2012; Naito et al., 2014).

De manière générale, les macrophages M2 expriment un nombre important de récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) reconnaissant directement les PAMPS. Ils sont également caractérisés par leur capacité à produire des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10). Cependant, contrairement aux macrophages M1 exclusivement capable de produire des cytokines pro-inflammatoires, certains sous-types de macrophages M2 peuvent aussi sécréter des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, selon le microenvironnement dans lequel ils se trouvent.

1.2.1 Les macrophages M2a

La polarisation M2a est induite spécifiquement par l'IL-4 et l'IL-13. Ces cytokines Th2 induisent via STAT6 et PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) un panel de récepteurs, tels que DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), le récepteur Mannose (CD206) et le récepteur Dectine-1. Ces derniers récepteurs sont fortement impliqués dans la reconnaissance sans opsonisation et l'élimination de pathogènes qui expriment sur leur paroi des mannanes et des glucanes. Ces macrophages se distinguent des macrophages M1 par leur capacité à reconnaître directement les pathogènes non opsonisés via les PRRs et par leurs fonctions microbicides spécifiques associées. C'est le cas, comme nous l'avons montré au laboratoire, pour *Candida albicans* (Coste et al., 2003; Coste et al., 2008; Gales et al., 2010), *Leishmania infantum* (Lefevre et al., 2013) et pour les helminthes (Barner et al., 1998; Noel et al., 2004). En plus de ces actions microbicides, les macrophages M2a participent au développement de l'inflammation de type allergique et de l'asthme. En effet, les macrophages activés alternativement sécrètent les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL24 agonistes des récepteurs CCR3 et CCR4. L'activation de ces récepteurs participe au recrutement des éosinophiles et des basophiles, cellules impliquées dans ces processus allergiques. Les macrophages M2a surexpriment également les gènes codant pour l'arginase-1, le CD163 (récepteur reconnaissant l'hémoglobine) et la fibronectine-1.

1.2.2 Les macrophages M2b

Les macrophages M2b ou « immunorégulateurs » ont la particularité, à la différence des autres macrophages M2, de produire en plus des cytokines à caractère anti-inflammatoires (par exemple l'IL-10), un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 (Mantovani et al., 2004). Le terme d'immunorégulateur prend tout son sens de par la forte sécrétion d'IL-10 et de certaines chimiokines (CCL1) qui aboutissent au recrutement de LT CD4 $^{+}$ et de LT régulateurs (TREG). Les complexes immuns, les agonistes du récepteur à l'IL-1 et les ligands des TLRs (Toll-Like receptor) sont les principaux agents du microenvironnement cellulaire responsables de l'activation de ces macrophages. Un environnement riche en sucre et en lipide, comme rencontré au cours d'un régime hyperlipidique (HFD) ou durant des pathologies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2, conduit aussi à la genèse de ces macrophages M2b (Lefevre et al., 2010b).

1.2.3 Les macrophages M2c

Les macrophages M2c ou macrophages dit « réparateurs » proviennent d'une polarisation initiée par l'IL-10 et les glucocorticoïdes. Ainsi, ces cellules sont retrouvées principalement dans les phases de résolution de l'inflammation ou de réparation tissulaire, lorsque l'IL-10 et les glucocorticoïdes sont fortement produites. Aucune cytokine pro-inflammatoire n'est produite par ce sous-type de macrophages. En revanche, de grandes quantités d'IL-10 et de TGF- β sont synthétisées et libérées dans l'environnement cellulaire. Ces macrophages produisent des chimiokines particulières (CCL16 et

CXCL13) et surexpriment l'arginase-1, enzyme responsable de la formation d'urée et de L-Ornithine, précurseur de polyamines et de L-proline (Morris, 2004). La production de TGF- β et de L-Ornithine, participe de ce fait activement à la synthèse de collagène et à la prolifération cellulaire notamment des fibroblastes. L'ensemble de ces caractéristiques fait que le macrophage M2c est un élément clef du processus de réparation et du remodelage tissulaire.

Le macrophage M2c a la particularité de présenter à sa surface le récepteur scavenger CD36. Ce récepteur reconnaît les cellules apoptotiques et permet ainsi leur phagocytose. Ce processus, dit « d'efférocytose », est une étape clef de la résolution de l'inflammation. En empêchant les PNNs de rentrer en nécrose, ces macrophages préservent les tissus d'une inflammation intense et incontrôlée. La phagocytose par les macrophages M2c des cellules apoptotiques induit l'activation des voies de signalisation à l'origine de la synthèse de nombreux médiateurs anti-inflammatoires cytokiniques (TGF- β) et lipidiques (prostaglandine D₂ (PGD₂), lipoxines (LXA₄)). Ainsi, son rôle dans l'arrêt de l'inflammation et sa participation dans les phases plus tardive de réparation et de remodelage tissulaire, font de ce macrophage M2c un acteur majeur du processus cicatriciel.

1.2.4 Les macrophages M2d

Les macrophages M2d ont été récemment définis comme étant les macrophages associés aux tumeurs ou TAMs (Tumor Associated Macrophages) avec des propriétés immunosuppressives et pro-tumorales. De nombreux facteurs sont à l'origine de cette polarisation particulière : le LIF (Leukemia Inhibitory factor), l'IL-6 et le M-CSF (Macrophages Colony-Stimulating Factor) (Duluc et al., 2007). De plus, il a été montré que la PGE₂ était aussi impliquée dans la polarisation M2d, puisqu'elle joue un rôle essentiel dans l'expression de l'IL-6 et d'une enzyme immunosuppressive, IDO-2 (Basu et al., 2006; Wang et al., 2010). Les macrophages M2d présentent des propriétés pro-tumorales en produisant du VEGF et de la métalloprotéase MMP-9 qui favorisent l'angiogenèse, la croissance cellulaire et donc l'installation d'une tumeur. Ces macrophages sont aussi capables de sécréter de l'IL-10 et du TGF- β . Ils pourraient ainsi contribuer au processus de réparation tissulaire (Ferrante and Leibovich, 2012).

1.2.5 Les autres phénotypes de macrophages

Une multitude de macrophages avec différents phénotypes coexistent dans différents tissus normaux ou lésionnels. Ces macrophages adaptent leur phénotype à leur microenvironnement. C'est le cas des macrophages présents au niveau de la plaque d'athérome qui sont dans un environnement riche en lipides et lipoprotéines modifiés par oxydation et de cristaux de cholestérol. Ainsi, il a été reporté récemment qu'au contact des phospholipides oxydés les macrophages se différencient en un phénotype particulier appelé Mox. Cette polarisation particulière est médiée par le facteur de transcription Nrf2 (nuclear erythroid-2 related factor) (Kadl et al., 2010). Les macrophages Mox présentent une morphologie et des fonctions différentes des macrophages M1 et M2. En effet, ils présentent de faibles capacités chimiotactiques et phagocytaires. Les marqueurs spécifiques de ces macrophages sont des gènes impliqués dans l'équilibre redox dépendant de Nrf2, tels que l'hème oxygénase-1 (HMOX-1), la sulfiredoxine-1 (SRX1), la thioredoxine réductase 1 (Txnrd1) et la glutathione réductase-1 (GSR1). Cependant, certains gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et COX - 2, sont induits par l'intermédiaire du TLR-2 dans les macrophages Mox.

Différentes sous-populations de macrophages ont été identifiées dans des zones hémorragiques, notamment au niveau des plaques d'athérome chez l'homme. Ces macrophages stimulés par

l'hémoglobine sont dénommés M(Hb) ou Mhem (Finn et al., 2012; Naito et al., 2014). Ces macrophages sont caractérisés par des niveaux élevés de CD206 et CD163, un récepteur piègeur du complexe hémoglobine/haptoglobine (Hb/Hp) impliqué dans la clairance de l'hémoglobine. La stimulation de monocytes humains par le complexe Hb/Hp augmente l'expression du CD206 et du CD163, et induit via le CD163 la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. De plus, les macrophages M(Hb) présentent une amélioration de leur capacité d'efflux du cholestérol par l'intermédiaire d'une activité accrue du récepteur nucléaire LXR (liver X receptor) réduisant ainsi la formation de cellules spumeuses.

Contrairement à la polarisation M1 induite par les cytokines Th1 et le GM-CSF et la polarisation M2 induite par les cytokines Th2 et le M-CSF qui sont des processus réversibles, un nouveau phénotype de macrophages humains induit par la chimiokine CXCL4 dérivée des plaquettes a été rapporté comme étant irréversible (Gleissner, 2012; Gleissner et al., 2010). Ce macrophage différencié par CXCL4 appelé M4, présente des caractéristiques phénotypiques spécifiques, avec comme marqueur la métalloprotéinase 7 (MMP-7) et la protéine de fixation du calcium S100A8. En outre, ces macrophages n'expriment pas le CD163 et HMOX1, même après exposition au complexe Hb/Hp (Gleissner et al., 2010). Ainsi il semble aujourd'hui que les macrophages Mhem et M4 pourraient exercer des effets opposés au niveau de la plaque d'athérome. Les macrophages M4 seraient pro-athérogènes, alors que les macrophages Mhem CD163⁺ seraient athéroprotecteurs.

En conclusion, il est clair aujourd'hui que la remarquable plasticité des macrophages est un facteur essentiel au retour à l'homéostasie dans la plupart des pathologies notamment inflammatoires, infectieuses et tumorales. Une polarisation appropriée des macrophages en fonction de leur environnement est un élément clé des processus physiologiques au cours de l'inflammation, de la cicatrisation des plaies et de la régénération tissulaire. Ainsi, les macrophages ont la propriété d'engager un processus séquentiel de polarisation en fonction du contexte physiopathologique dans lequel ils se trouvent. Selon leur profil approprié ou non, ce processus de polarisation sera susceptible d'affecter de manière favorable ou défavorable la pathogénèse de maladies et la cicatrisation des tissus après une blessure.

2. Les macrophages dans les différentes étapes de la cicatrisation.

De par leur plasticité fonctionnelle et leur capacité de différenciation, les macrophages sont considérés comme les cellules qui orchestrent le processus de cicatrisation (Lucas et al., 2010). Les macrophages sont les acteurs principaux du déclenchement à la fois de l'inflammation au cours d'une lésion, de sa résolution et de la restauration de l'homéostasie tissulaire. A chacune de ces phases, les macrophages présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles bien précises, qui leur permettent successivement, d'initier le processus inflammatoire (macrophages M1), de déclencher la résolution de l'inflammation et de participer à la réparation tissulaire (macrophages M2). Ainsi, la polarisation des macrophages et plus particulièrement la commutation phénotypique des macrophages M1 vers un phénotype M2 est essentielle dans la cicatrisation (Mahdavian Delavary et al., 2011).

Les macrophages des plaies proviennent principalement des monocytes circulants du sang périphérique et des macrophages résidents situés à proximité de la lésion. Chez la souris, les monocytes circulants présentent deux phénotypes distincts, (i) les monocytes $Ly6C^{high} / CCR2^{high}$ ($GR1^{+}$, $CD62L^{+}$), rapidement mobilisés au cours de la phase initiale inflammatoire, via $CCL2$; (ii) et les monocytes $Ly6C^{low} / CCR2^{low}$ ($CCR5^{+}$, $CD11c^{+}$) qui présentent une forte expression du récepteur à $CX3CR1$ (Yang et al., 2014). Ces monocytes sont recrutés via cette chimiokine dans les phases plus tardives de l'inflammation et de la cicatrisation. En effet, l'absence de $CCL2$ ne perturbe pas la fermeture totale de la plaie contrairement à la suppression de $CX3CL1$ qui diminue le recrutement des macrophages et des myofibroblastes (Ishida et al., 2008).

Chez l'homme, le sous type de monocytes $CD16^{-}$ (dits inflammatoires) présente une expression forte de $CCR2$ et une faible expression de $CXCR1$ ($CD14^{+}$, $CCR2^{+}$, $CD62^{+}$, $FC\gamma RI^{+}$) comparable à la population de monocytes murins $LY6C^{high}/CCR2^{high}$. Ils sont rapidement recrutés au niveau d'une lésion par $CCL2$ (Aguilar-Ruiz et al., 2011; Geissmann et al., 2003). A l'inverse, les monocytes $CD16^{+}$ présentent une forte expression de $CX3CR1$ ($CD14^{+}$, $CD16^{+}$, $CCR2^{+}$, $Tie2^{+}$, $CMH II CD15^{+}$) et ils sont similaires aux monocytes murins $Ly6C^{low} CX3CR1^{high}$. Leur cinétique d'infiltration au niveau d'une lésion tissulaire ainsi que leur différenciation en macrophages sont des phénomènes encore mal compris.

2.1. La phase inflammatoire

En plus de leur rôle dans l'hémostase et la formation d'une matrice provisoire, les plaquettes libèrent des facteurs de croissance ($PDGF$, $TGF-\beta$), des cytokines ($IL-1\beta$) et des chimiokines ($CCL2$, $CCL3$, $CCL5$, $CXCL4$) qui contribuent au recrutement des monocytes, PNNs et fibroblastes, ainsi qu'à la polarisation et à l'activation des macrophages résidents (Barrientos et al., 2008; Behm et al., 2012). La chimiokine $CCL5$ est l'agent chimioattractant le plus important pour les monocytes et les cellules $Th1$ (Mahdavian Delavary et al., 2011). Les chimiokines $CCL2/MCP-1$ (Monocyte chemoattractant protein1) et $CCL3/MIP-1\alpha$ sont aussi impliquées dans le recrutement de monocytes au niveau de la plaie.

L'utilisation de modèles expérimentaux de lésions cutanées chez la souris a permis d'établir que la phase inflammatoire consécutive à une lésion est caractérisée par l'afflux, dès les premières minutes, de PNNs. Leur nombre atteint un maximum 1 jour après la lésion et diminue progressivement jusqu'au 5^{ème} jour (Figure 16). L'afflux des PNNs dès les premières minutes de la lésion a pour rôle d'éliminer d'une part les microbes et particules susceptibles d'envahir le lit de la plaie et d'autre part les débris cellulaires et de la MEC.

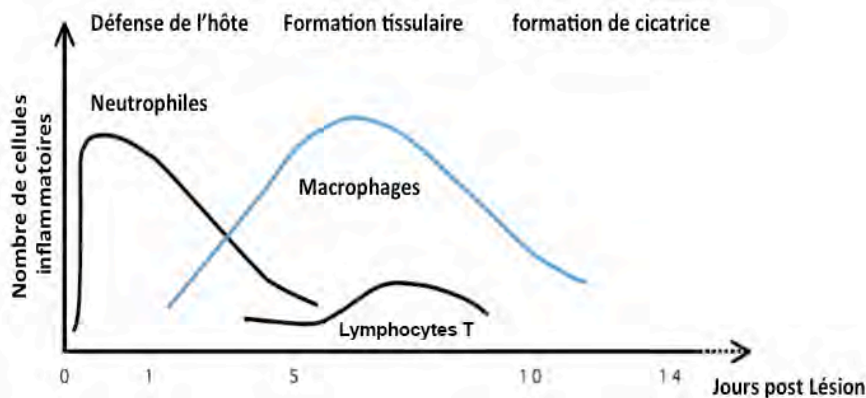


Figure 16 : Dynamique de la réponse inflammatoire durant la cicatrisation d'une plaie cutanée. Adaptée de (Willenborg and Eming, 2014).

Quelques heures après la lésion, les macrophages commencent à affluer dans le lit de la plaie (Adamson, 2009). Les macrophages atteignent un maximum entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jours puis diminuent de façon significative entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jours. Les macrophages qui s'accumulent au niveau de la plaie semblent provenir principalement des monocytes circulants. Cependant, l'éventuelle prolifération des macrophages résidents pourrait aussi participer à cette accumulation cellulaire (Novak and Koh, 2013b).

L'environnement riche en IL-6, IFN- γ , IL-1 β et TNF- α va contribuer à induire l'activation classique des monocytes recrutés et des macrophages résidents, qui vont acquérir le phénotype et les fonctionnalités propres aux macrophages M1. A leur tour, ces macrophages à forte potentialité inflammatoire vont produire un large panel de médiateurs : cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) (Barrientos et al., 2008; Diegelmann and Evans, 2004) et chimiokines qui vont permettre le recrutement de nouveaux leucocytes au site de la lésion (DiPietro, 1995) (**Figure 17**). Des médiateurs lipidiques seront également produits. C'est le cas du leucotriène B4 (LTB₄) qui est un puissant chimioattractant pour les PNNs (Afonso et al., 2012) (Lammermann et al., 2013; Ley et al., 2007; Nathan, 2002).

Plusieurs études sur des modèles murins montrent clairement que la présence précoce de macrophages inflammatoires au niveau d'une plaie a un impact majeur sur le processus de cicatrisation. En effet, la déplétion des macrophages au cours de la première phase de réparation tissulaire entraîne une réduction significative de la formation de tissu cicatriciel (Duffield et al., 2005; Lucas et al., 2010) (Goren et al., 2009; Mirza et al., 2009).

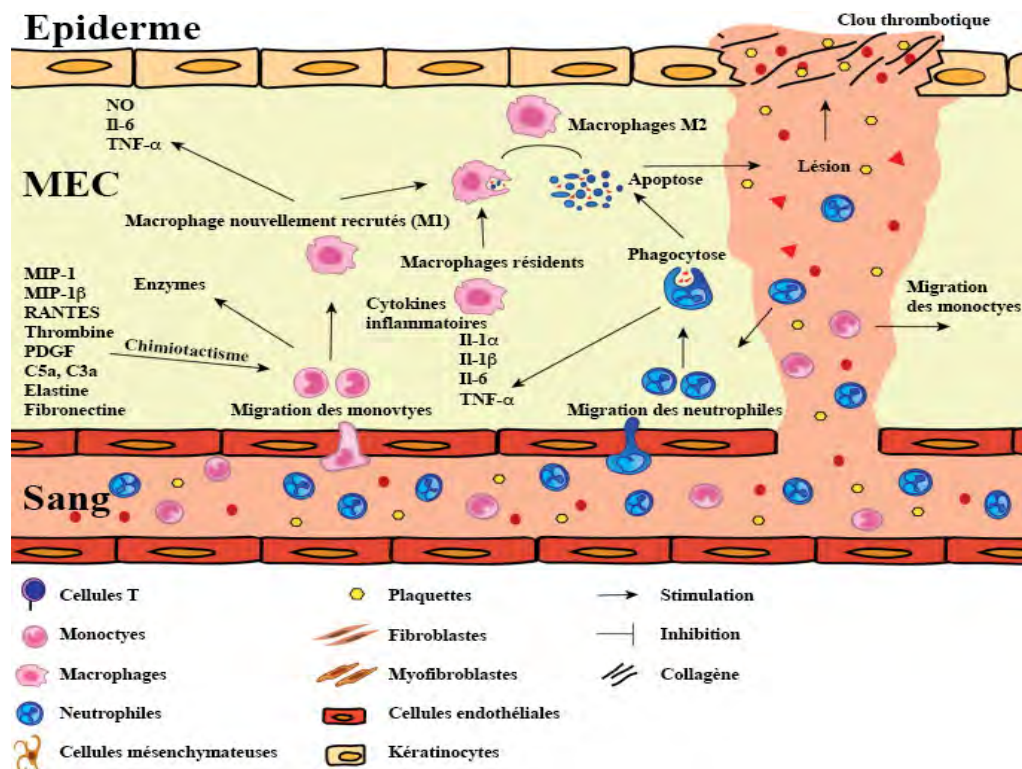


Figure 17 : Les macrophages au cours de la phase inflammatoire du processus cicatriciel. Les monocytes arrivés sur le site de la lésion se différencient en macrophage de type I et présentent un phénotype pro-inflammatoire. Ils vont assurer avec les neutrophiles la phase de détersion et assainir la plaie de tous agents pathogènes. Adaptée de (Mahdavian Delavary et al., 2011).

2.2. La résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation est un processus actif, étroitement régulé, qui implique la reconnaissance par des macrophages de cellules inflammatoires apoptotiques, essentiellement des PNNs (efférocytose). Cette phagocytose via des récepteurs spécifiques (notamment les récepteurs scavenger) amplifie la polarisation des macrophages vers un phénotype M2. Ce phénotype contribue à la résolution de la phase inflammatoire de la cicatrisation (Ariel and Serhan, 2012; Erwig and Henson, 2007; Fadeel et al., 2010; Tabas, 2010).

Ainsi, le type de reconnaissance et les récepteurs engagés dans la phagocytose vont déterminer les fonctions effectrices déclenchées par les macrophages, qui s'étendent (i) de la réponse pro-inflammatoire déclenchée les cellules nécrotiques ou les facteurs produits par la pyroptose des cellules inflammatoires, (ii) à la résolution de l'inflammation après captation des cellules apoptotiques, (iii) à la réparation tissulaire et (iv) à la présentation de l'antigène. Aujourd'hui, bien qu'il soit clairement admis que les macrophages de type 2 contribuent à la résolution de l'inflammation, il n'a pas encore été établi que ces macrophages proviennent de monocytes nouvellement recrutés ou de macrophages résidents qui ont proliféré *in situ* (Jenkins et al., 2011; Liddiard et al., 2011).

Outre l'apoptose des cellules inflammatoires, l'arrêt de l'afflux de PNNs et de monocytes inflammatoires est une condition préalable à la résolution de l'inflammation. Des mécanismes tels que le clivage par protéolyse de chimiokines et leur séquestration sont nécessaires pour atteindre un environnement permettant la résolution de l'inflammation. Par exemple, la métalloprotéase MMP-12 spécifique des macrophages clive les chimiokines de la famille CXC dans le motif ELR qui est crucial pour la liaison au récepteur des cellules inflammatoires. Ces chimiokines sont alors incapables de recruter les PNNs et les monocytes inflammatoires (Dean et al., 2008). Le clivage, par d'autres MMPs (MMP-1, MMP-3), des CC-chimiokines qui attirent préférentiellement les monocytes inhibe aussi l'afflux des monocytes inflammatoires et réduit l'inflammation (Ortega-Gomez et al., 2013; Soehnlein and Lindbom, 2010). Bien que l'inhibition du recrutement des PNNs soit interrompue, l'une des étapes nécessaires pour reconstituer l'homéostasie tissulaire est la clairance des cellules inflammatoires.

Au cours du processus inflammatoire, la durée de vie des PNNs va conditionner le début de la phase de résolution. Celle-ci peut être modifiée par l'environnement inflammatoire (Fox et al., 2010; Geering and Simon, 2011). Par exemple, les macrophages sécrètent des ligands des récepteurs de mort comme Fas et TNF- α qui selon leur concentration favorisent la survie des PNNs (faibles concentrations) ou leur mort (fortes concentrations). Dans ce processus de déclenchement de l'apoptose, la production des espèces réactives de l'oxygène via la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) joue un rôle clé (Geering et al., 2011). D'autres facteurs favorisent l'apoptose ou la survie des PNNs. On pourra citer l'annexine A1 qui favorise l'apoptose des PNNs et leur efférocytose par les macrophages (Perretti and Solito, 2004; Scannell et al., 2007) et les facteurs induits par le niveau d'hypoxie de la lésion inflammatoire (Ortega-Gomez et al., 2013).

Les PNNs rentrent en apoptose après élimination des agents pathogènes (Savill, 2000). Ceci, contribuant au déclenchement de la résolution de l'inflammation. En effet, les PNNs apoptotiques séquestrent les cytokines inflammatoires et les alarmines en particulier HMGB1 (High Mobility Group Box 1) (Sims et al., 2010). De plus, les PNNs morts sécrètent des médiateurs qui inhibent le recrutement ultérieur de PNNs. C'est le cas de l'annexine A1 qui inhibe l'adhésion des leucocytes et leur migration via les récepteurs aux peptides N-formylés (FPR2/ALX) (Dalli et al., 2012).

La reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes constitue un important signal de résolution de l'inflammation (Lawrence et al., 2002; Savill et al., 2002). Cette phagocytose implique *i)* des signaux produits par les cellules apoptotiques qui attirent les phagocytes « find me signals » (Ortega-Gomez et al., 2013), *ii)* les ligands associés aux cellules apoptotiques « eat me signals » qui les différencient des cellules vivantes, *iii)* et des récepteurs sur les phagocytes (Scannell and Maderna, 2006). La phosphatidylsérine (PS) exprimée sur la membrane externe des cellules apoptotiques est le signal le plus connu présent sur les cellules apoptotiques. La reconnaissance directe de la PS par les phagocytes implique plusieurs types de récepteurs, notamment TIM4, BAI1, stabiline-2 et le récepteur des produits avancés de glycation (RAGE) (de Freitas et al., 2012; Ferracini et al., 2013; Ortega-Gomez et al., 2013; Thorp et al., 2008). Les récepteurs scavenger exprimés sur les macrophages de type 2 ont également été identifiés comme participant à la reconnaissance et à l'efférocytose des cellules apoptotiques (Fadok et al., 1998b; Ren et al., 1995; Geske et al., 2002; Platt et al., 1996; Wermeling et al., 2007).

L'efférocytose par les macrophages est une fonction fondamentale des macrophages impliquée dans la résolution de l'inflammation (Bystrom et al., 2008; Martin et al., 2014). Durant la phase de résolution, les macrophages produisent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra, le récepteur « leurre » IL-1RII) qui font partie du répertoire des macrophages de type 2 (Biswas and Mantovani, 2012)(Stables et al., 2011). Ils produisent aussi des médiateurs lipidiques impliqués dans la résolution de l'inflammation (Serhan and Savill, 2005; Titos et al., 2011; Uderhardt et al., 2012). La phagocytose des cellules apoptotiques inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (Fadok et al., 1998a). Ces mécanismes contribuent à une résolution rapide de l'inflammation (Savill et al., 2002; Serhan, 2011; Spite and Serhan, 2010; Stables et al., 2011) et initie la phase de reconstruction tissulaire via notamment le TGF- β (Xiong et al., 2013)

Finalement, au cours des différentes phases de la cicatrisation des lésions tissulaires, les macrophages subissent des changements phénotypiques et fonctionnels qui sont la conséquence de leur forte plasticité. Le changement phénotypique d'une polarisation M1 vers une polarisation M2 est un élément clé de la réparation tissulaire (Ferrante and Leibovich, 2012; Mahdavian Delavary et al., 2011; Mantovani et al., 2013; Novak and Koh, 2013a; Rigamonti et al., 2014; Willenborg and Eming, 2014). Les macrophages polarisés M1 initient la réponse inflammatoire (Biswas and Mantovani, 2010; Gordon and Martinez, 2010), puis progressivement, les macrophages infiltrés au niveau de la plaie acquièrent un phénotype M2a puis M2c et contribuent ainsi à éliminer les cellules inflammatoires apoptotiques et à favoriser l'afflux des fibroblastes (**Figure 18**).

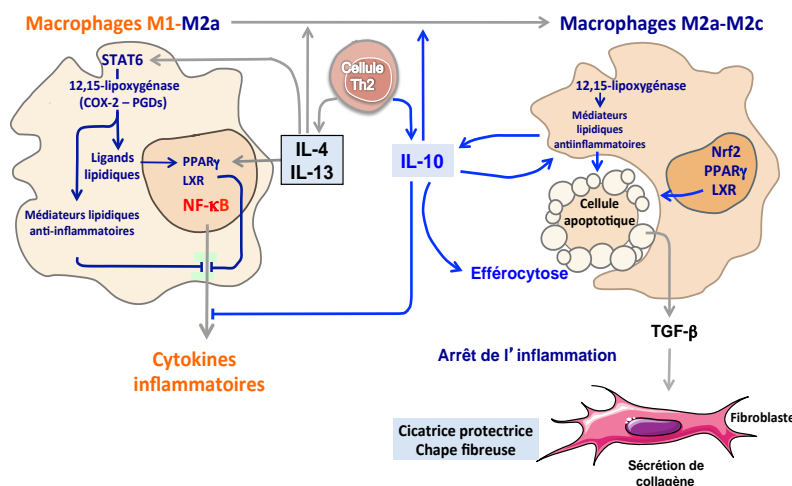


Figure 18 : Polarisation M2s des macrophages et efférocytose. Adapté de (Tabas, 2010).

L'acquisition de la polarisation M2 des macrophages implique l'activation de facteurs de transcription via différents agonistes. Ainsi, la polarisation M2a par l'IL-4 ou l'IL-13 implique l'activation de STAT-6 qui via l'induction de la 12/15-lipoxygénase et d'autres enzymes impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique, contribue à produire des ligands lipidiques capables d'activer des facteurs de transcription comme PPAR γ , récepteur nucléaire clef de la différenciation M2 des macrophages. Ces médiateurs et ces facteurs de transcription vont contribuer à inhiber la production de cytokines inflammatoires et à induire la production de l'IL-10. Les macrophages polarisés M2a vont exprimer des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. L'efférocytose des cellules inflammatoires apoptotiques initiée par les macrophages M2a va amplifier le processus de résolution de l'inflammation par la production de médiateurs lipidiques et de cytokines anti-inflammatoires. Ce mécanisme favorise la polarisation M2c des macrophages via la production de l'IL-10 et de TGF- β . Ces macrophages vont contribuer à l'activation des fibroblastes et à la formation d'une cicatrice protectrice. La déplétion de ces macrophages M2a et M2c a pour conséquence l'inhibition de la formation du tissu de granulation vascularisé et du tissu cicatriciel.

2.3. La phase de prolifération et de granulation

Au cours de la phase de prolifération de la cicatrization (phase de granulation), les macrophages M2a (profibrotiques) et M2c réparateurs (et régulateurs selon Mosser and Edwards) (Mosser and Edwards, 2008) stimulent les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales pour induire la formation de tissu fibreux, la régénération épidermique, la contraction de la plaie et la néo-vascularisation. Le passage des macrophages M1 aux macrophages M2 joue un rôle pivot dans la transition de la phase inflammatoire à la phase proliférative (Khallou-Laschet et al., 2010; Mahdavian Delavary et al., 2011). Les macrophages M2s infiltrant la plaie favorisent l'angiogenèse, le remodelage et la réparation tissulaire. Ils favorisent une réponse Th2 impliquée dans la fibrogénèse (Wynn, 2008). Les macrophages M2c expriment des niveaux élevés de facteurs de croissance (VEGF α et TGF- β) qui favorisent la prolifération des fibroblastes.

L'angiogenèse est principalement régulée par les macrophages, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Au cours de cette phase, la MEC et la membrane basale sont dégradées par des métalloprotéases produites en particulier par les macrophages pour faciliter la migration des cellules endothéliales. La migration des cellules endothéliales et leur différenciation sont stimulées par différents facteurs notamment le VEGF, le FGF et le TGF- β selon la nature du tissu lésé (Diegelmann and Evans, 2004). La déplétion des macrophages impacte directement sur la sécrétion de ces facteurs (Mirza et al., 2009). La production de ces facteurs est déclenchée par le microenvironnement local dont le pH, la pression d'oxygène et les cytokines sécrétées par les macrophages, les LTs et les autres cellules du site de la plaie (Diegelmann and Evans, 2004; Knighton et al., 1983; Werner and Grose, 2003).

2.4. Le remodelage tissulaire

Au cours de la phase de remodelage tissulaire, les macrophages de type 2 vont sécréter des métalloprotéases (plus particulièrement MMP-2, MMP-12 et MMP-19) qui vont hydrolyser les protéines de la matrice (principalement les collagènes de type I et III) en fragments. En parallèle, les macrophages contribuent à la formation de la MEC et par conséquent au remodelage du tissu directement en sécrétant de la fibronectine et du collagène de type VIII. Indirectement les macrophages induisent la prolifération et la différenciation des fibroblastes et régulent leur capacité à synthétiser des composants de la matrice (Gratchev et al., 2001; Weitkamp et al., 1999). Au cours de

la phase de remodelage tissulaire, la plupart des cellules endothéliales et des myofibroblastes rentrent en apoptose ou sont éliminés de la plaie (Gurtner et al., 2008; Mahdavian Delavary et al., 2011). Par ailleurs, les macrophages qui sont à « satiété », perdent progressivement leur capacité d'efférocytose, quittent la plaie et migrent dans la circulation lymphatique. Ces macrophages dénommés récemment Mres (pour macrophages de résolution) ont un fort potentiel de production de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires et anti-fibrotiques ; ils font le lien entre l'immunité innée et adaptative (Ariel and Serhan, 2012).

En résumé, les macrophages à travers leur polarisation bien coordonnée (**Figure 19**), régulent toutes les phases de la cicatrisation : de l'inflammation à la formation du tissu de granulation et au dépôt de la matrice extracellulaire, avec comme résultat final la réparation du tissu lésé. La création d'une lésion tissulaire conduit au développement d'un microenvironnement nécrotique, via la libération de signaux de dangers DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern Molecules) et de PAMPs qui favorisent l'apparition de macrophages M1. Ces macrophages produisent alors des cytokines et des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, des chimiokines, des protéases et des ROS qui participent avec les neutrophiles infiltrés dans la lésion à la phase inflammatoire du processus cicatriciel. Progressivement, les PNNs et les autres cellules inflammatoires vont entrer en apoptose et signer le début de la résolution de l'inflammation, phase déterminante du devenir de la cicatrisation. L'efférocytose des cellules apoptotiques, la production d'IL-10 par les lymphocytes et les macrophages M2a, conditionnent la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire et réparateur M2c. Ces macrophages sécrètent des cytokines (IL-10) et des médiateurs lipidiques (lipoxines) anti-inflammatoires, des facteurs de croissance (TGF-β) et vont contribuer à la formation de la matrice extra- cellulaire.

Progressivement, ces macrophages perdent leur capacité d'efférocytose et vont se différencier en phénotype Mres. Ces macrophages expriment la 12/15-LOX et produisent des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires et anti-fibrotiques. Ils délivrent des signaux régulateurs aux cellules présentatrices de l'antigène et aux lymphocytes et ils vont migrer du tissu cicatriciel vers le système lymphatique.

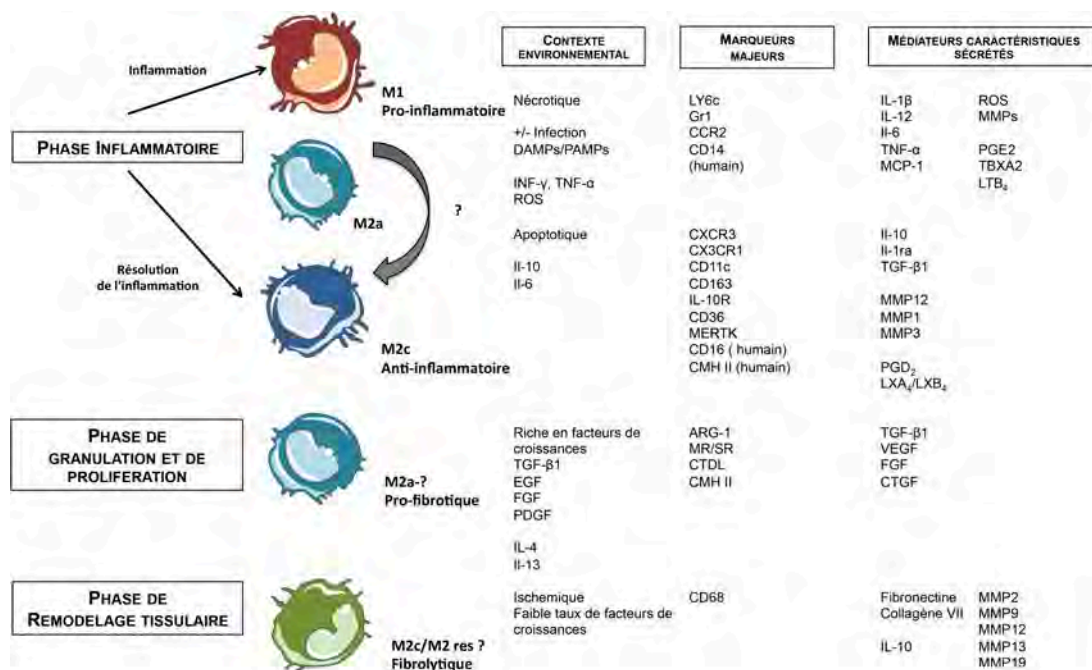


Figure 19 : Les différents phénotypes de macrophages impliqués dans les différentes phases du processus cicatriciel.

CHAPITRE IV

DIABETE ET PROCESSUS CICATRICIEL

1. Le diabète

Le diabète est un problème majeur de santé publique touchant plus de 300 millions de personnes dans le monde. Ce nombre est en constante augmentation (Danaei et al., 2011). En 2011, la France comptait 3 millions de diabétiques (soit environ 6% de la population) dont 500 000 à 800 000 ignorants l'être, dû au caractère silencieux de la maladie (International Diabetes Federation, 2012). Il existe une grande disparité de la prévalence de la maladie selon les différentes régions (**Figure 20**). Cela est imputé aux conditions environnementales et aux habitudes alimentaires.

L'état diabétique se caractérise par une glycémie supérieure ou égale à 1,26 g/L à jeun (2g/L au cours de la journée), à l'opposé des 0,70 et 1,10 g/L à jeun pour les individus sains. Cette maladie silencieuse et non transmissible, est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit » (OMS, 2013).

Tous les diabétiques, insulino-dépendants ou non insulino-dépendants, sont exposés à des complications qui sont bien souvent responsables de la morbidité et de la mortalité. En pratique, on distingue des atteintes du système nerveux, le développement de maladies cardio-vasculaires, des troubles rénaux et de multiples dysfonctionnements cellulaires et tissulaires. Parmi ces complications, les défauts de cicatrisation des plaies tiennent une place importante (Falanga, 2005). Chez les patients diabétiques, le développement préférentiel d'ulcération du pied (15% en présenteront au cours de leurs vie) (Boulton et al., 2005) associé à des infections accrues aboutit à une amputation pour 20 % des cas. Les troubles de la microcirculation locale associés à un défaut de l'inflammation et de sa résolution sont pour la majorité des cas à l'origine du développement et de l'extension de ces pathologies. Ainsi, la régénération des tissus dermiques et la cicatrisation des plaies chroniques des sujets diabétiques restent de nos jours, un défi clinique majeur.

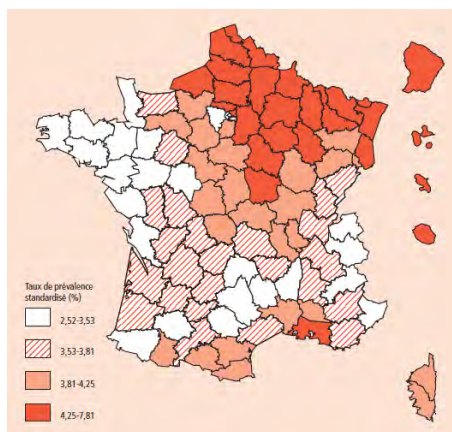


Figure 20 : Prévalence du diabète en France en 2007 : taux standardisé. Extrait de (Kusnik-Joinville et al., 2008).

Plusieurs types de diabète sont décrits et caractérisés :

Le diabète gestationnel ou diabète de grossesse : La grossesse est par nature diabéto-gène (Kapoor et al., 2007b). Il se développe en général à un stade avancé de la grossesse (préférentiellement durant le 2^{ème} ou le 3^{ème} trimestre), pour disparaître naturellement dès la naissance de l'enfant. Deux populations sont identifiées : les femmes qui ont un diabète méconnu et que la

grossesse va révéler et les femmes qui développent un diabète uniquement à l'occasion de la grossesse. Du côté du fœtus, le sucre passe librement la barrière placentaire mais pas l'insuline maternelle. Ce surplus de sucre est alors compensé par une production accrue d'insuline fœtale

Le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant (DID), diagnostiqué chez l'enfant ou le jeune adulte, est provoqué dans 90% des cas par une réaction auto-immune (10% idiopathique) (Thivolet, 1992). Cette pathologie se déroule à bas bruit pendant plusieurs années avec destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans via une infiltration des LT auxiliaires CD4 et des LT cytotoxiques CD8 (Phillips et al., 2009). Il en découle une insulino-pénie progressive, aggravée par l'hyperglycémie (seuil de 10 à 20% des cellules β restantes). Au cours du diabète de type 1, la production d'insuline est donc absente ou insuffisante.

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) résulte de la conjonction de plusieurs facteurs d'origine génétique et environnementale. Les gènes qui prennent part à cette pathologie sont difficiles à identifier du fait du poly- et du multigénisme (Fery and Paquot, 2005; Guillausseau and Laloi-Michelin, 2003). Les facteurs environnementaux seraient, quant à eux responsables de 90% des cas de diabètes de type 2, liés principalement à la sédentarité et à une alimentation riche en sucres et en graisses saturées.

2. La physiopathologie de la plaie du diabétique

Les pieds du patient diabétique s'avèrent extrêmement vulnérables aux traumatismes extérieurs et peu enclins à cicatriser. Ainsi, les plaies chroniques du pied et les amputations sont les deux principales complications rencontrées chez le diabétique avec une mortalité secondaire et des récurrences élevées. Les plaies chroniques du pied diabétique résultent d'une combinaison de plusieurs composantes : neurologiques, vasculaires et immuno-inflammatoires avec le plus souvent des complications infectieuses (Bertin E, 1999; Ha Van G, 1997).

2.1. La neuropathie diabétique périphérique

La neuropathie diabétique (sensitive, végétative, motrice) regroupe l'atteinte des nerfs périphériques et du système nerveux autonome. Elle constitue la plus importante cause des plaies du pied diabétique. De multiples études épidémiologiques basées notamment sur les rapports de l'« International Working Group on the Diabetic Foot » (IWGDF, 2012), font état d'une neuropathie pour 89% des patients ayant une plaie chronique (55% de plaies neuropathiques et 34% de plaies neuro-ischémiques) contre 10% de plaies ischémiques pures.

L'atteinte sensitive se traduit par des troubles de la sensibilité superficielle et profonde, une anesthésie à la douleur, des troubles de la perception thermique, et une perte du sens proprioceptif (Vinik et al., 2003). Ces atteintes conduisent à des déformations de type pied creux et à une augmentation de la pression aux points d'appuis. La neuropathie autonome (ou végétative) est responsable également (Chen et al., 2008) :

- d'une hyperpulsatilité artérielle
- de l'ouverture de shunts artérioveineux
- de la diminution voir l'absence de sudation des pieds conduisant à l'assèchement de la peau et à des fissurations secondaires.

Les microtraumatismes répétés dus à la marche ne sont pas ressentis ou sont mal perçus, et entraînent la formation d'une hyperkératose localisée (souvent sous la forme de durillon ou de callosité). Ces agressions répétées finissent par provoquer l'ouverture d'une plaie et l'apparition d'ulcères comme le mal perforant plantaire (MPP) (El Fekih et al., 2006).

Le MPP est une ulcération à fond atone, le plus souvent indolore entouré d'un halo d'hyperkératose au niveau des points d'appuis. Son apparition, insidieuse faute de douleur est le plus souvent négligée et découverte avec retard favorisant la constitution progressive d'une ulcération en profondeur jusqu'à l'apparition de fissures et de crevasses, véritables portes d'entrée pour des microorganismes potentiellement infectieux (**Figure 21**). L'extension de cette lésion plantaire peut être rapide et grave via une surinfection des tissus en situation hypoxique. On assiste alors au développement de phénomènes inflammatoires locaux (rougeur, œdème, lymphangite) qui aboutissent dans certains cas à une gangrène massive.

Actuellement il n'existe aucun traitement pharmacologique ayant des effets bénéfiques sur la neuropathie diabétique périphérique.

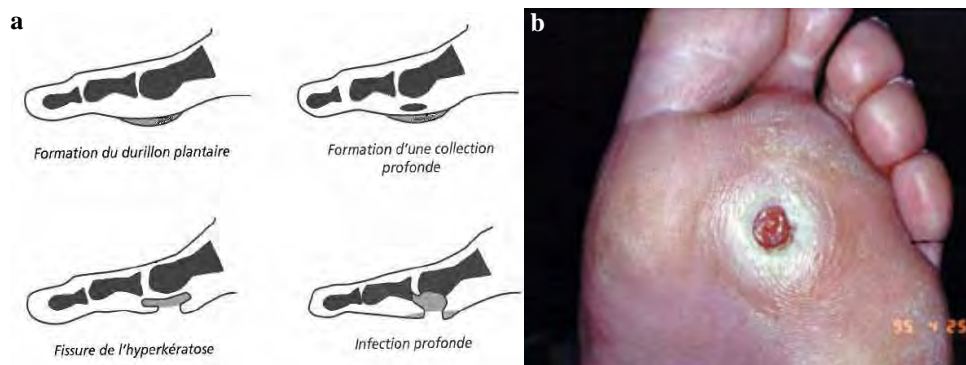


Figure 21 : Le mal perforant plantaire (Bellaye et al., 2014).

2.2. L'artériopathie des membres inférieurs chez le sujet diabétique

La pathologie artérielle périphérique provoquant une insuffisance artérielle est également à l'origine des retards de cicatrisation des membres inférieurs du diabétique (Schaper and Havekes, 2012). Les diabétiques développent trois types de lésions périphériques vasculaires : la micro-angiopathie, l'athérosclérose et l'artériosclérose (Birrner, 2001; Huysman and Mathieu, 2009).

La micro-angiopathie, causée par l'hyperglycémie joue un rôle majeur dans la survenue des nécroses ischémiques. Cependant, on sait aujourd'hui qu'elle ne joue pas un rôle essentiel dans la survenue des pathologies des plaies mais elle est un facteur aggravant. Par ailleurs les échanges gazeux ne semblent pas être plus difficiles chez le diabétique par rapport aux non diabétiques dans un contexte d'artérite de même sévérité.

Le diabète favorise la formation de lésions artérielles par dépôt de plaques d'athérome (athérosclérose) pouvant aboutir à des phénomènes ischémiques. Il est responsable de lésions des capillaires dermiques diabétiques, par épaississement des membranes basales et hyalinose des vaisseaux. Ce phénomène altère les capacités de diffusion de l'oxygène vers les tissus. Le flux sanguin est diminué et la réponse hyperhémique à l'ischémie est réduite.

Le durcissement et l'épaississement des parois des artères sans dépôt de graisses (artériosclérose) peuvent provoquer également une ischémie par un rétrécissement artériel et le blocage du flux sanguin. La peau supporte relativement bien une ischémie modérée mais une ulcération d'origine extérieure se pérennisera probablement en raison de l'impossibilité de fournir le supplément de perfusion nécessaire à la cicatrisation de la plaie

Le traitement de l'ischémie fait partie intégrante des moyens mis en œuvre afin de favoriser la cicatrisation chez le diabétique. Une revascularisation rapide du tissu permet de sortir de ce cercle vicieux et d'éviter les amputations (Probst et al., 2001; Schirmer et al., 2013). Les traitements médicaux antiagrégants et vasoactifs sont utilisés dans la plupart des cas mais s'avèrent souvent insuffisants. Les approches chirurgicales sont pratiquement systématiques et passent par l'utilisation massive de pontages distaux réalisés préférentiellement en veine saphène et d'angioplasties. Dans de nombreux cas, les procédures endovasculaires comme la dilatation par ballonnet sont appliquées avec de bons résultats en termes de sauvetage de membre et de perméabilité (Apelqvist and Lepantalo, 2012).

2.3. Les composantes infectieuses

L'infection est la complication la plus fréquente rencontrée chez le diabétique (Perschel et al., 1995) et nécessite dans la majeure partie des cas une hospitalisation du patient (Lavery et al., 2006). Elle n'est rarement la cause directe de la plaie mais augmente le risque d'amputation (Edmonds, 2013). La présence de bactéries en faible concentration au niveau des plaies stimule l'activité des polynucléaires PNNs. Cependant, la colonisation de la plaie par un trop grand nombre de microorganisme entraîne une compétition pour la consommation d'oxygène entre les cellules du tissu cicatriciel et les pathogènes. Cela provoque une forte hypoxie locale délétère pour la cicatrisation.

La fréquence et la gravité des infections cutanées (d'origine le plus souvent bactériennes et fongiques) sont sévères chez le diabétique et sont souvent associées à de multiples surinfections. Les nombreuses atteintes neuropathiques et vasculaires rendent le pied du diabétique plus vulnérable à l'entrée d'éventuels pathogènes. Quant aux facteurs plus généraux comme l'hyperglycémie (environnement favorable au développement fongique et bactérien) et l'insuffisance vasculaire (qui empêche un apport correct d'oxygène, de nutriments et d'antibiotiques à la zone infectée), ils favorisent l'extension de ce processus infectieux. De plus, les colonisations par des pathogènes augmentent les phénomènes locaux inflammatoires (thromboses des capillaires, collections de débris et de pus) et entravent l'extension du tissu de granulation.

Bien que des infections mono-microbiennes soient rencontrées, dans la plus part des cas, il s'agit d'infections pluri-microbiennes (Chellan et al., 2010; Viswanathan et al., 2002). L'éradication (ou le contrôle) de l'infection est indispensable au bon déroulement de la cicatrisation (Lipsky, 2004). Dans les cas les plus graves, une intervention chirurgicale est inévitable afin d'assurer un drainage adéquat et la suppression des tissus dévitalisés. Après détermination des souches colonisant la plaie, les infections sont prises en charge par antibiothérapie orale ou topique (Peters et al., 2012). L'association d'interventions chirurgicales et d'antibiothérapies réduit significativement le risque d'amputation majeure (Dalla Paola and Faglia, 2006; Faglia et al., 2006). Néanmoins, l'application topique d'agents antimicrobiens (gentamycine, néomycine ou bacitracine) pose de sérieux problèmes de résistances. Cet inconvénient peut être détourné par l'emploi de sels d'argent à fort pouvoir antimicrobien (Griffis et al., 2009). Dans les cas les plus extrêmes l'amputation (majeure ou mineure) peut s'avérer indispensable.

2.4. Les thérapies existantes

Dans le diabète, la cicatrisation des plaies passe par une approche multifactorielle prenant en compte : des stratégies globales qui visent à améliorer l'état général du patient et donc de rétablir des conditions physiologiques favorables. Depuis peu, les soins pour pieds diabétiques sont soumis à des prises en charges bien précises comme le protocole MIDAS pour :

- **M pour Métabolique** : l'objectif est la restauration de l'homéostasie du métabolisme glucidique via l'adaptation d'un régime alimentaire équilibré, une pratique physique adéquate et la limitation des facteurs de risques (tabac par exemple). Le recours à l'insulinothérapie voir des antidiabétiques oraux peut être également envisagé.
- **I pour Infection** avec la prodigation de soins anti-infectieux et l'utilisation d'antibiotiques.
- **D pour Décharge** des points de pression sur le pied malade.
- **A pour Artériopathie**. Cet aspect nécessite une prise en charge rigoureuse de l'angiopathie et des troubles artériolaires qui lui sont associés. L'utilisation d'antiagrégants et le recours à la chirurgie sont très souvent employés.
- **S pour Soins** de déterision avec un nettoyage fréquent de la plaie.

En plus de ces traitements des solutions plus centrées sur la lésion elle-même permettent d'envisager des stratégies plus ciblées et plus spécifiques répondant aux différents problèmes cicatriciels qui peuvent être rencontrés.

De nos jours, les pansements font partie des outils les plus connus, les plus utilisés et les plus variés (Dumville et al., 2011a, 2012a; Dumville et al., 2011b, 2012b). Que les pansements soient primaires (en contact direct avec la plaie) ou secondaires (en association avec un pansement primaire), ils ont pour but premier de préserver l'environnement de la plaie d'une éventuelle contamination (par des bactéries, particules extérieures), de l'eau, ou éventuels chocs qui pourraient aggraver la lésion. Selon l'objectif et la physiologie de la plaie, un grand nombre de solutions techniques peuvent être employés (Figure 22).

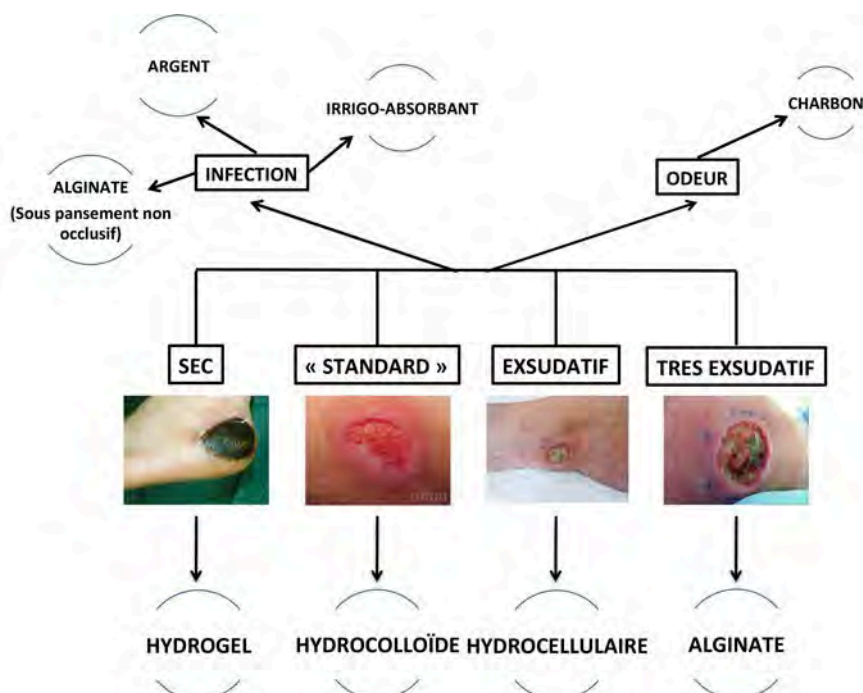


Figure 22 : Technologies des pansements et physiologie de la plaie.

Les pansements traditionnels « secs » et « pansements américains » qu'ils soient en gaze ou en compresse servent principalement à nettoyer, à protéger et à absorber l'exsudat produit afin d'éviter la macération du lit de la plaie. Ces pansements couvrant, sont constitués d'un support (tissé ou non, plastique, polyéthylène, polyuréthane), d'une compresse (plus ou moins absorbante) et d'une masse adhésive (acrylique, Hot Melt...).

D'autres types de pansements plus évolués ont été développés, en vue de faciliter la cicatrisation des plaies et notamment des plaies chroniques.

Les films de polyuréthanes, transparents, facilitent le contrôle des plaies. Ils sont semi-perméables (échanges gazeux préservés mais imperméables à l'eau et aux bactéries). Ils sont employés comme pansement primaire sur des plaies peu ou pas exsudatives non infectées.

Les interfaces notamment les matrices souples issues de la Technologie Lipido-Colloïde ou **TLC®** (composé de polymère hydrophobe, intégrant des particules hydrophiles et de carboxyméthylcellulose ou CMC). Ces pansements développés par les laboratoires URGO, présentent une avancée majeure dans les traitements des plaies. Ces pansements via un processus de gélification forment un film lipidocolloïde qui crée un milieu humide et favorise ainsi la cicatrisation. Cette interface est non adhérente, atraumatique lors de son retrait, ce qui permet de respecter le tissu nouvellement formé.

Les hydrocellulaires sont constitués de polymères sous forme de mousse de polyuréthane absorbante. L'absorption des exsudats est faite au sein de la structure et permet le maintien d'un environnement humide et les échanges gazeux. Il est imperméable aux bactéries. Parmi les pansements humides, certains ont été développés selon le principe d'irrigation-absorption. Ils garantissent un maintien de la plaie dans un milieu humide tout en nettoyant la plaie grâce aux particules de polyacrylate absorbantes qui par un phénomène de rétention piègent les résidus de l'exsudat.

Les hydrogels comportent une forte composante liquide qui sera relarguée progressivement dans le lit de la plaie. Ceci permet l'hydratation des tissus nécrotiques secs. L'ajout de CMC et d'adjuvants potentialise l'absorption des exsudats et la viscosité du gel ainsi créé. Dans le cadre de plaies fortement exsudatives, les compresses ou mèches en **alginates** (polysaccharides naturel à haute capacité d'absorption) limitent la macération de la plaie et permettent de contrôler la contamination bactérienne.

Les pansements au **charbon** (activé) absorbent, en plus des exsudats, les odeurs. Enfin **les argentiques**, aux propriétés antibactériennes (large spectre d'action de l'ion argent) évitent l'apparition de résistances.

Des approches mécaniques comme la détersion, aide à la création d'un tissu de granulation sain et au développement d'un environnement favorable pour la guérison. Elle consiste à éliminer les tissus nécrotiques qui sont un frein majeur à la cicatrisation. Plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre : débridement chirurgical, mécanique, chimique, autolytique et même la larvothérapie (Caputo et al., 2008; Paul et al., 2009).

Des méthodes plus récentes, comme la thérapie par pression négative (TPN), sont de plus en plus employées (**Figure 23**). Le but de cette technique n'est pas la fermeture totale de plaie mais d'en accélérer ses premières étapes (Guffanti, 2014). La pression négative favorise la néo-angiogenèse et la formation d'un tissu de granulation de qualité (Greene et al., 2006; Morykwas et al., 2001; Saxena et al., 2004).



Figure 23 :
La thérapie par pression négative (TPN) (Schweiger, 2014).

Ces techniques sont accompagnées d'approches pharmacologiques. Les progrès technologiques permettent de créer des substituts de peau : Ce sont des matrices le plus souvent acellulaires ou comprenant des fibroblastes avec des kératinocytes (Petrova and Edmonds, 2006; Shen and Falanga, 2003). L'application de protéines extracellulaires comme l'acide hyaluronique estérifié ou bien des matrices de collagène porcine (BIOSTED[™] : Smith & Nephew Wound Management) améliore la cicatrisation des ulcères de pieds diabétique non infectés (Holmes et al., 2013).

Des modulateurs biochimiques, visant à diminuer la teneur en métalloprotéases sont utilisés comme le Promogran®. Cette matrice aux propriétés anti-protéases diminue les activités élastases et métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9), via la formation d'un complexe MMP-Promogran® (Cullen et al., 2002; Veves et al., 2002).

De nouvelles voies d'études sont également explorées comme l'emploi de thérapies à base de facteurs de croissance topiques autologues et recombinants. Les premiers sont dérivés du sang et appliqués en solution topique, alors que les seconds sont directement issus du génie biochimique (Koria, 2012). Le PDGF joue un rôle dans la réparation tissulaire et a fait l'objet de nombreuses études sur les plaies ulcérées du diabétique. Il en ressort une amélioration du processus cicatriciel (Bhansali et al., 2009; Landsman et al., 2010; LeGrand, 1998; Papanas and Maltezos, 2008; Steed, 2006; Wieman, 1998). D'autres facteurs de croissance comme l'EGF ainsi que le β FGF recombinant (REGEN-D®) sont à l'étude (essais clinique en phase III et IV) avec des premiers retours positifs (Fernandez-Montequin et al., 2009a; Fernandez-Montequin et al., 2007; Fernandez-Montequin et al., 2009b). Néanmoins, ce type d'approche est en voie d'arrêt suite à la découverte de nombreux cas de cancer après traitement des plaies. Ainsi, l'exploitation du Regranex® (becaplermin) a base de PDGF-BB a été arrêté par l'Afssaps en Juin 2011.

Enfin, des études expérimentales de thérapie cellulaire montrent que l'apport de fibroblastes, de plaquettes ou même de kératinocytes autologues aide à promouvoir la cicatrisation des patients diabétiques (Moustafa et al., 2007).

3. La physiopathologie de la cicatrisation chez le diabétique.

3.1. L'hyperglycémie

L'état d'hyperglycémie chronique du diabète sucré, conduit de manière systématique au développement d'un stress oxydant (Giugliano et al., 1996; Mizuta, 2005), délétère pour la cicatrisation (Giacco and Brownlee, 2010). Ce phénomène est médié par une augmentation de la production des radicaux libres et une diminution des défenses antioxydantes (Betteridge, 2000; Laight et al., 2000a; Laight et al., 2000b; Lerverve, 2003).

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la genèse de ce stress oxydant (**Figure 24**) :

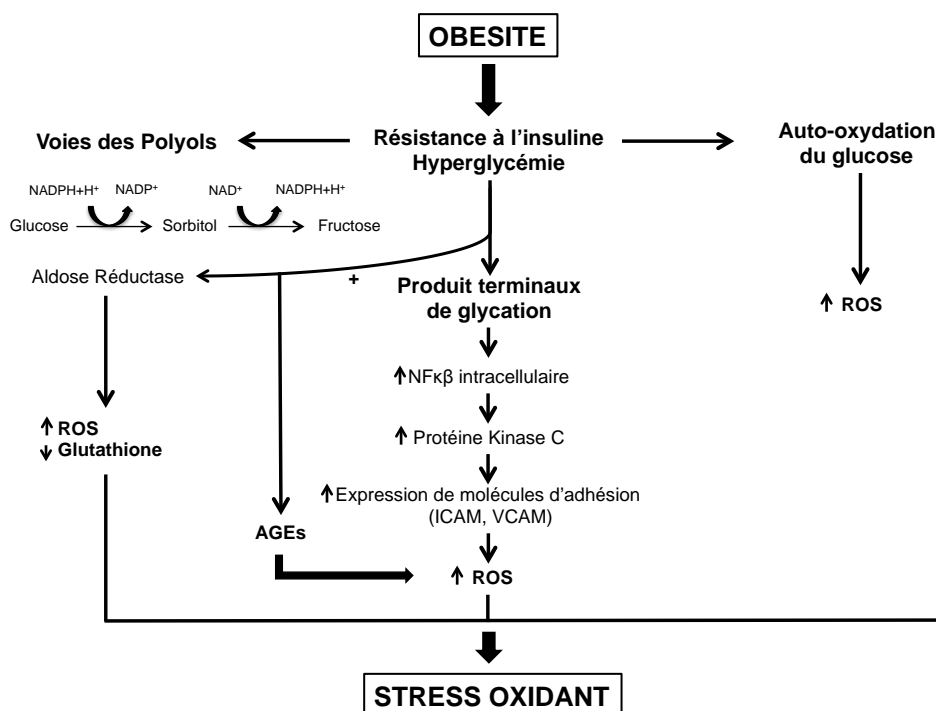


Figure 24 : Implication du diabète dans la génération d'un stress oxydatif. Adaptée de (Vincent and Taylor, 2006) Une glycémie élevée entraîne la genèse de ROS via différents processus plus ou moins directs : implication des voies d'auto-oxydation du glucose, des polyols et des produits terminaux de glycation.

L'auto-oxydation du glucose à l'origine de la génération d'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle (Hunt et al., 1988; Hunt et al., 1990).

La voie des polyols : qui vient supplanter la voie traditionnelle de la glycolyse. Cette voie métabolique entraîne une déplétion intracellulaire de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate-oxidase) (Dunlop, 2000), cofacteur et substrat indispensable au bon fonctionnement d'enzymes antioxydantes (glutathion réductase et l'ascorbate réductase)

La glycation (Gillery et al., 1988; Sakurai and Tsuchiya, 1988). La liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose, des acides nucléiques, des lipides et des fonctions amines libres des protéines se traduit par la formation de la base de Schiff et un réarrangement dits d' « Amadori ». Ces produits sont ensuite dégradés en α -ceto-aldéhyde pour servir de substrat à la synthèse de produits de Maillard puis en produit de glycation avancés, connu sous le nom d'AGEs (Advanced Glycation End Product). Ils participent au développement du stress oxydant.

La voie PKC (Protein kinase C). L'hyperglycémie induit la synthèse accrue de diacylglycerol (DAG), cofacteur des différentes isoformes de la PKC. La PKC est à l'origine de l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs (endotheline 1), de la baisse de NO, de l'expression de gènes à caractères pro-inflammatoires, ainsi que de la production de ROS (Brownlee, 2005; Ganz and Seftel, 2000).

Les cellules β du pancréas, à l'origine de la production d'insuline, ont des mécanismes de défense limités face au stress oxydant (Bashan et al., 2009; Rigalleau V, 2007). Les ROS conduisent à l'apoptose de ces cellules (Evans et al., 2003) et participent ainsi à la diminution de leur nombre observé dans le diabète de type II. De plus, des études démontrent que les radicaux libres produits de manière excessive (ou insuffisamment dégradés) inactivent les voies de signalisation de la cascade de signalisation de l'insuline. (Goldstein et al., 2005; Nishikawa et al., 2007; Olivares-Corichi et al., 2005).

Le stress oxydant via la formation des AGEs, est une source majeure de complications lors de la cicatrisation chez les patients diabétiques (Bonfont-Rousselot et al., 2000; Wrobel and Najafi, 2010). Les AGEs à travers les récepteurs RAGEs, AGER1 et AGER3 (Coughlan et al., 2009; Sugimoto et al., 2008; Thallas-Bonke et al., 2008; Valko et al., 2007) participent au maintien d'un environnement inflammatoire (Goh and Cooper, 2008) via la production de cytokines, de métalloprotéases (Yan et al., 2003) et l'expression de molécules d'adhésions leucocytaires (Toure et al., 2008) (**Figure 25**). Les récepteurs aux AGEs sont présents sur les macrophages, les cellules endothéliales, les fibres musculaires lisses et les fibroblastes.

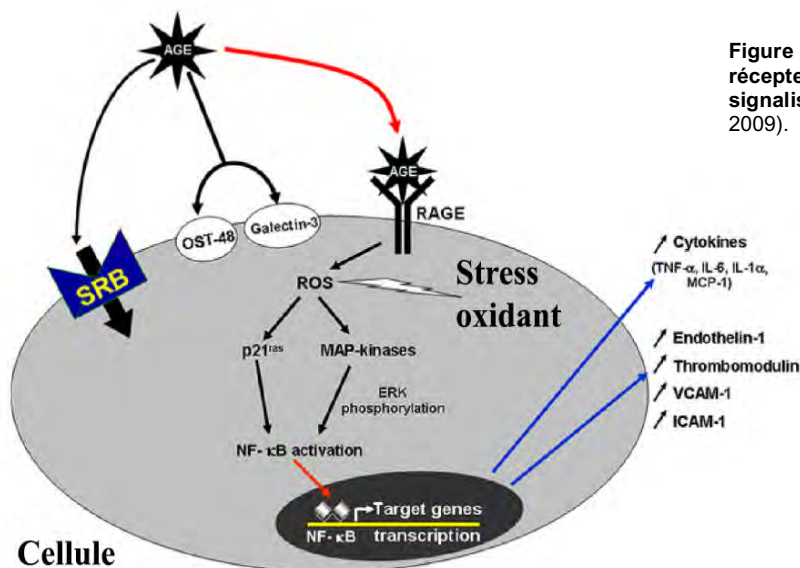


Figure 25 : Activation des récepteurs RAGEs et cascade de signalisation. Extrait de (Rondeau, 2009).

La phase de prolifération cellulaire est fortement impactée par les AGEs. La glycation modifie les propriétés du réseau collagénique (et des fibres élastiques), les rendant plus rigides, moins solubles et donc plus résistantes à la protéolyse (Dunn et al., 1989; McCance et al., 1993; Monnier et al., 1986). Ces glycosylations non-enzymatiques aboutissent à des modifications de l'équilibre « production-dégradation » de ces fibres de collagène et empêchent ainsi le remodelage du tissu cicatriciel nouvellement synthétisé. La présence des AGEs en quantité importante entraîne la modification de protéines impliquées dans l'apparition des neuropathies (Meerwaldt et al., 2005; Sugimoto et al., 2008; Thornalley, 2002). En effet, lors de la neuropathie diabétique, le cytosquelette axonal (tubuline, neurofilaments et l'actine) perd ses fonctions conduisant ainsi à une atrophie et une dégénérescence des axones pour aboutir à une diminution des facultés de régénération.

D'autres populations cellulaires comme les kératinocytes se retrouvent impactées par ce contexte d'hyperglycémie, qui se traduit par une nette diminution de leur prolifération et de leur différenciation (Spravchikov et al., 2001). Enfin les AGEs favorise l'apoptose des fibroblastes et diminue leur prolifération, un effet qui est au moins partiellement RAGE-dépendant et en corrélation avec l'activation de NFκB et les caspases (Alikhani et al., 2005). Enfin il a été montré *in vitro* que les AGEs sont capables d'induire une sénescence précoce dans les fibroblastes dermiques humains et des kératinocytes humains normaux (Berge et al., 2007; Sejersen and Rattan, 2009).

3.2. Un environnement cicatriciel délétère

Des avancées majeures ont été réalisées ces dernières années dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogenèse du diabète de type 2. Parmi ces mécanismes, l'obésité associée à une inflammation chronique à bas bruit et de manière plus générale à un dysfonctionnement du système immunitaire semble jouer un rôle central (Donath and Shoelson, 2011). Des études transversales et prospectives ont permis d'établir chez des patients atteints de diabète de type 2, des taux sanguins élevés de protéines de la phase aiguë, telles que la protéine C réactive (CRP), l'haptoglobine, le fibrinogène et l'amyloïde A sérique. Il est également retrouvé chez ces patients des concentrations de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) et de chimiokines (CCL2, CCL3, CXCL8) élevées (Donath and Shoelson, 2011; Pickup et al., 1997; Pradhan et al., 2001; Spranger et al., 2003). Par conséquent, des niveaux sériques élevés d'IL-1 β , d'IL-6 et de CRP sont souvent prédictifs d'un état diabétique de type 2.

L'inflammation à bas bruit chez le diabétique est caractérisée par une infiltration importante au niveau du tissu adipeux de macrophages qui produisent des cytokines inflammatoires (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Il a été montré sur des modèles murins que les macrophages recrutés au niveau du tissu adipeux de souris obèses présentent un phénotype d'activation classique pro-inflammatoire (Macrophages de type M1) ou mixte (M1/M2b). A l'inverse, les macrophages présents dans le tissu adipeux des souris non diabétiques présentent un phénotype activé alternativement de type M2a (Eguchi et al., 2013; Lumeng et al., 2007; Orr et al., 2014). Cette inflammation associée au diabète est multifactorielle. L'inflammation retrouvée au niveau des îlots du pancréas serait due à l'excès de glucose et d'acides gras responsables de la production d'IL-1 β . Au niveau du tissu adipeux, l'excès de stockage des graisses entrainerait une anoxie à l'origine d'une inflammation. Un autre facteur important impliqué dans l'inflammation à bas bruit du diabétique serait un défaut de différenciation du macrophage vers un macrophage résolutif.

La cicatrisation des plaies du diabétique se caractérise par un processus inflammatoire perturbé avec une accumulation de cytokines pro-inflammatoires (Dinh et al., 2012; Ochoa et al., 2007), de protéases (Lobmann et al., 2002; Yager et al., 1996) mais également une baisse de certains facteurs de croissances (Blakytyny and Jude, 2006; Goren et al., 2003; Greenhalgh et al., 1990) qui interfèrent avec le processus de cicatrisation. Les facteurs de croissance et cytokines contrôlent la prolifération, la différenciation, la migration et le métabolisme cellulaire durant les différentes phases de la cicatrisation (Brem and Tomic-Canic, 2007). Il a été montré que le tissu des plaies chroniques de diabétiques ainsi que l'exsudat contenaient moins de PDGF, de FGF- β , d'EGF (Falanga, 1993) et de TGF- β (Cooper et al., 1994). Les forts taux plasmatiques des métalloprotéases (MMP-2, MMP-8 MMP-9) et les faibles taux de TIMP1/TIMP2 (Lobmann et al., 2002; Lobmann et al., 2005; Menghini et al., 2013) combinés à de fortes sécrétions d'élastase et de Cathepsines (D et G), entraînent une dégradation anormale des protéines de la MEC;(Ahmad et al., 2012).

Dans le contexte de diabète les kératinocytes prolifèrent mais présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles anormales (Usui et al., 2008). Les cytokératines K2, K6 et K10 sont des facteurs exprimés par les kératinocytes durant la différenciation épidermique. Le diabète induit à la fois une

diminution de ces facteurs (Stojadinovic et al., 2005; Usui et al., 2008) et une augmentation du TGF- β 3, qui bloque la migration des cellules dermiques (Bandyopadhyay et al., 2006; Jude et al., 2002). La diapédèse est fortement diminuée, ce qui entraîne une baisse d'activité de ces cellules sur la zone à cicatrifier. D'autres facteurs qui stimulent l'activité des cellules épithéliales durant la phase de réépithélialisation (IL-8, IL-10, IL-15, TGF- β , IGF-1, PDGF, NGF) sont également sous-exprimés dans les plaies du pied diabétiques (Barrientos et al., 2008; Guvakova, 2007).

3.3. Un environnement hypoxique

Les artériopathies et athéroscléroses, fréquentes dans le cadre du diabète, limitent les apports d'oxygènes et sont à l'origine d'hypoxies voire d'anoxie tissulaire.

La plupart des processus engagés dans les phases de la cicatrisation requièrent la présence d'oxygène (Bishop, 2008; Rodriguez et al., 2008) pour la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes, la différenciation de ces cellules et synthèse de collagène (Michiels et al., 2000; Tandara and Mustoe, 2004). Seule la prolifération des cellules endothéliales peut se faire en condition hypoxique (Tong et al., 2006). En condition normale, un état d'hypoxie induit l'expression du facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia inductible factor) qui combiné à HIF β permet l'expression de nombreux facteurs angiogéniques comme le VEGF (Fong, 2008; Hickey and Simon, 2006). De nombreuses cytokines (TNF- α , TGF- β) mais également des facteurs de croissances comme le PDGF, l'endothelin-1 et d'autres médiateurs impliqués dans la prolifération cellulaires sont également synthétisés via ce facteur de transcription (Rodriguez et al., 2008).

L'hyperglycémie entraîne une anomalie de la transactivation de HIF1 α et le maintien d'un environnement hypoxique délétère (Thangarajah et al., 2010; Thangarajah et al., 2009). La glycation induit une néo-vascularisation altérée et la formation de lésions athéromateuse induites par une hyperagrégabilité plaquettaire (Peppas and Raptis, 2008; Peppas and Vlassara, 2005). De plus, l'hyperglycémie et l'inflammation chronique rencontrées dans le diabète sont les causes principales des dysfonctions fonctionnelles des progéniteurs des cellules endothéliales (EPC) ainsi que de leur recrutement (Drela et al., 2012; Fadini et al., 2007). La glycation non-enzymatique des membranes basales vasculaires serait à l'origine du défaut d'« homing » de ces cellules et retarderait de ce fait la régénération vasculaire du site lésionnel (Kim et al., 2012).

Actuellement, l'oxygène hyperbare est une thérapie qui peut être utilisée en complément des autres traitements. De nombreuses études rapportent les effets bénéfiques de caisson hyperbare. Ainsi, on note une surexpression de VEGF, de PDGF et de son récepteur, une l'augmentation de l'angiogenèse, de l'oxyde nitrique, de la prolifération des fibroblastes, de la production de collagène et de la diminution des œdèmes et de l'inflammation (Chen et al., 2010; Tiaka et al., 2012).

4. Macrophages et inflammation au cours de la cicatrisation de plaies chez le diabétique

Le terrain inflammatoire chronique chez le diabétique est un élément majeur dans la pathogenèse des complications qui sont associées au diabète. Ainsi, Goren et al, ont montré que l'administration systémique chez des souris diabétiques *ob/ob*, à la fin de la phase inflammatoire de cicatrisation d'une plaie aiguë d'anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre le TNF- α , améliore la vitesse de cicatrisation de la plaie sans modifier le phénotype diabétique des souris (Goren et al., 2007).

D'autres études ont montré que les macrophages isolés de plaies de patients diabétiques ou de modèles murins diabétiques présentaient un phénotype M1 pro-inflammatoire, caractérisé par une forte sécrétion d'IL-1 β . Un anticorps neutralisant l'IL-1 β a aussi permis d'établir que cette cytokine contribuait au maintien de l'état inflammatoire de la plaie. L'anticorps neutralisant induit un changement de phénotype des macrophages inflammatoires M1 vers un macrophage M2 associé à la cicatrisation de la plaie (Mirza et al., 2013).

D'autres études ont confirmé sur des modèles murins, que l'environnement diabétique induit des changements intrinsèques stables des cellules hématopoïétiques notamment des macrophages (Bannon et al., 2013). Ces changements conduisent à des phénotypes de macrophages hyper-réactifs au niveau des plaies cutanées. Au cours de la phase inflammatoire du processus cicatriciel, les macrophages de souris diabétiques montrent une hyperpolarisation M1 et M2. Au stade tardif de la cicatrisation, alors que les macrophages non diabétiques expriment un phénotype réparateur M2, les macrophages des plaies diabétiques continuent à présenter un phénotype inflammatoire M1 (Bannon et al., 2013). Fait intéressant, ces auteurs montrent que ce phénomène de changement de polarisation de M1 vers M2 est pertinent chez l'homme dans le cas d'ulcères d'origine diabétique. Dans ce cas la polarisation M2 entraîne une évolution favorable de la cicatrisation.

Si les macrophages inflammatoires polarisés M1 ou M2b peuvent retarder la cicatrisation, il a été montré que la suppression des macrophages durant le processus de cicatrisation ne modifie pas la genèse de la phase inflammatoire caractérisée par l'afflux des neutrophiles. Par contre, la suppression des macrophages entraîne un retard de cicatrisation (Mirza et al., 2009). Ce retard est caractérisé par un défaut de réépithélialisation de la plaie, une inhibition de l'angiogenèse et une diminution de la prolifération cellulaire. Ces changements ont été associés à une augmentation du taux du TNF- α et à une diminution du niveau des facteurs de croissance TGF- β 1 et VEGF au niveau de la plaie (Mirza et al., 2009). D'autres études réalisées par ces auteurs montrent que les macrophages isolés de plaies de souris diabétiques présentent un phénotype pro-inflammatoire qui persiste au-delà de la phase inflammatoire des souris non diabétiques et durant la phase tardive de réparation tissulaire. Ainsi, les macrophages des souris diabétiques présentent une expression réduite des marqueurs d'activation alternative CD206 et CD36 associée à un défaut de production des facteurs de croissance IGF-1, TGF- β 1, VEGF (Mirza and Koh, 2011).

Plusieurs études montrent que les macrophages M2 de sujets diabétiques expriment des marqueurs d'activation alternative CD206 et CD36 associés à des marqueurs M1. Cette polarisation mixte appelée M2b (Anderson et al., 2002; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008) se retrouve au niveau des macrophages résidents du péritoine (Lefevre et al., 2010a), du tissu adipeux (Fuentes et al., 2011; Orr et al., 2014) et des plaies cutanées de souris diabétiques (Ferrante and Leibovich, 2012). L'ensemble de ces résultats, obtenus pour la plupart sur des modèles murins génétiquement diabétiques, suggèrent que dans un environnement diabétique, les monocytes/macrophages présentent une déficience de leur capacité à passer d'un phénotype inflammatoire M1 ou M2b vers un phénotype réparateur/régulateur M2a/M2c favorisant la résolution de l'inflammation et la cicatrisation des plaies. Cette altération du potentiel de polarisation des macrophages contribuerait à une mauvaise cicatrisation des plaies des sujets diabétiques. Les macrophages inflammatoires de type M1/M2b présents au début de l'inflammation persistent et retardent l'arrivée des macrophages M2s anti-inflammatoires et réparateurs. Ainsi le ratio entre ces différents phénotypes serait un bon indicateur d'une inflammation chronique chez les sujets diabétiques (Pradhan Nabzdyk et al., 2013).

Il est admis aujourd'hui que les macrophages M2a/M2c jouent un rôle clé dans la résolution de l'inflammation, notamment à travers leurs propriétés à éliminer les cellules inflammatoires apoptotiques du site lésionnel et à sécréter des médiateurs lipidiques et des cytokines anti-inflammatoires. Des études

menées chez des souris diabétiques montrent une augmentation du nombre de cellules inflammatoires apoptotiques sur le site lésionnel des animaux diabétiques par rapport aux animaux non diabétiques (Khanna et al., 2010). Les cellules apoptotiques résiduelles vont progressivement entrer en nécrose et entretenir un environnement inflammatoire au niveau du lit de la plaie, ceci contribuant au retard de la cicatrisation (Szondy et al., 2014). Inversement, une neutropénie diminue l'intensité de l'inflammation et favorise la cicatrisation (Dovi et al., 2003).

L'origine de l'augmentation du nombre des cellules apoptotiques au niveau de la plaie chez le diabétique résulterait de l'infiltration importante des cellules inflammatoires, de la diminution de leur capacité de survie et surtout du défaut d'élimination (efférocytose) des cellules apoptotiques. En effet, il a été établi que la génération d'un stress oxydant, à l'origine de la production d'AGEs et de l'activation de la PKC, favoriserait l'apoptose des cellules inflammatoires (Brownlee, 2001). Par ailleurs, Khana *et al.*, ont démontré que des macrophages isolés de plaies de souris diabétiques présentaient une altération de leur capacité d'efférocytose vis-à-vis de cellules apoptotiques. Ce défaut d'efférocytose est associé à une charge plus élevée de cellules apoptotiques au niveau de la plaie, à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et à une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires. Ces observations ont été validées dans le tissu de la plaie des patients diabétiques (Khanna et al., 2010). La phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages M2a/M2c est due à la présence sur ces cellules de récepteurs « scavenger » notamment CD36 et Mertk. Ainsi, le défaut d'expression de ces récepteurs sur les macrophages au cours du diabète de type 2 pourrait être la cause du défaut de résolution de l'inflammation et du retard de cicatrisation caractéristique des sujets diabétiques.

Les macrophages polarisés M2a et M2c, sont capables de produire des médiateurs lipidiques (lipoxines, neuroprotectine et protectine D1, marésine, résolvines) impliqués dans la résolution de l'inflammation. Ces médiateurs provenant du métabolisme des acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 via les 5- et 12/15-lipoxygénases et les cytochromes P450, contrôlent l'infiltration des leucocytes inflammatoires, augmentent la capacité d'efférocytose des macrophages et favorisent la migration des macrophages après efférocytose du site de l'inflammation vers le système lymphatique. Des études récentes viennent d'établir un défaut de production de neuroprotectine D1 (provenant de l'acide docosahexaénoïque-DHA) au niveau des plaies de souris diabétiques *db/db* (Hong et al., 2014b). Ces auteurs ont aussi montré que l'administration de neuroprotectine D1 au niveau de la plaie augmente le niveau d'IL-10, atténue l'inflammation et le stress oxydant et accélère la cicatrisation des plaies des souris diabétiques *db/db*. Ce médiateur lipidique favorise aussi la réépithélialisation et la formation du tissu de granulation. Ces auteurs ont aussi montré que le traitement par la marésine, produite aussi par les macrophages et par les plaquettes à partir d'acide docosahexaénoïque (DHA), supprime les capacités inflammatoires des macrophages diabétiques et améliore leurs fonctions réparatrices (Hong et al., 2014a). Enfin, ces médiateurs lipidiques impliqués dans la résolution de l'inflammation (lipoxines, résolvines, protectines) atténuent les pathologies reliées au diabète, notamment les pathologies rénales et l'inflammation du tissu adipeux (Borgeson and Godson, 2012; Titos and Claria, 2013; Titos et al., 2011).

L'ensemble de ces données montrent clairement que les macrophages à travers leur polarisation et leur capacité à participer à la résolution de l'inflammation sont des cellules cibles permettant de favoriser la cicatrisation de sujets diabétiques.

CHAPITRE V

LE METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE ET SON IMPLICATION DANS LA CICATRISATION

Chacune des étapes du processus cicatriciel est contrôlée par une multitude de médiateurs qui les orchestrent et les coordonnent (Stadelmann et al., 1998). Parmi ces médiateurs, les lipides bioactifs jouent un rôle essentiel (Kalish et al., 2013).

Les lipides bioactifs proviennent des acides gras polyinsaturés (AGPI) libérés des phospholipides membranaires dès l'installation de la lésion. Cette hydrolyse implique l'activation de phospholipases A₂ (PLA₂) puis l'expression et l'activation de plusieurs enzymes qui successivement contrôlent la synthèse de médiateurs aux propriétés souvent opposées. Le classement des différents médiateurs provenant des AGPI provient de l'origine de leur production : (i) par oxydation enzymatique via des cyclooxygénases (COXs), des lipoxygénases (LOXs) et des cytochromes P450 ; (ii) par oxydation non-enzymatique (**Figure 26**).

L'acide arachidonique (AA) (C20:4, n-6) est un constituant important des phosphoglycérides (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine) de la membrane cellulaire. Ils représentent un pourcentage élevé des AGPI en position sn-2 de ces phospholipides. Ces acides gras dont le taux peut varier en fonction de la richesse de la ration alimentaire en acide linoléique (C18:2 n-6), en acide α-linolénique (C18:3, n-3), en acide eicosapentaénoïque ou EPA (C20:5, n-3) et en acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, n-3), sont des substrats pour la synthèse des eicosanoïdes bioactifs (structure à 20 atomes de carbone) incluant notamment les prostaglandines (PGs), les thromboxanes (TXc), les leucotriènes (LTs) et les lipoxines (LXs).

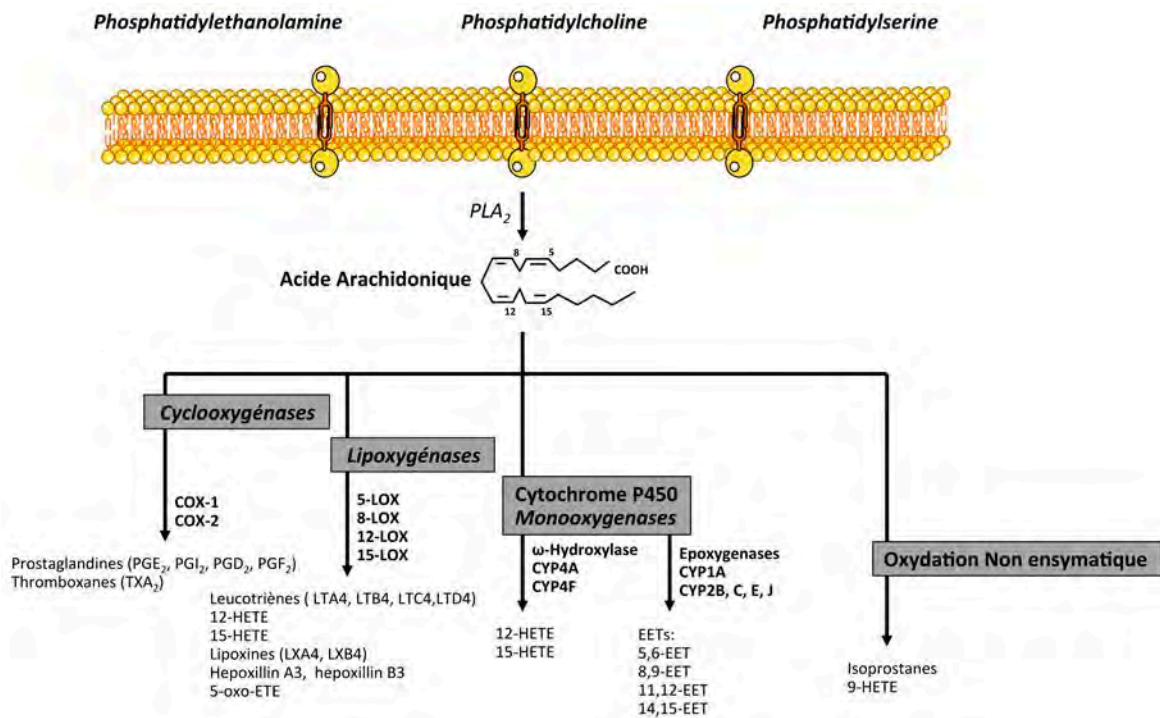


Figure 26 : Voies de formation des métabolites de l'acide arachidonique

1. Les phospholipases A₂, enzymes clefs du métabolisme des acides gras polyinsaturés

Les PLA₂ à travers leurs activités enzymatiques jouent un rôle déterminant dans la signalisation cellulaire. La superfamille des PLA₂ catalyse la libération des acides gras en position sn-2 du glycérol. Aujourd'hui, cette superfamille est subdivisée en 6 sous-types (**Tableau 27**): les sPLA₂, cPLA₂, iPLA₂, PAF-AH, LPLA₂, AdPLA (Dennis et al., 2011).

Les PLA₂ sécrétées ou sPLA₂ sont subdivisées en 10 groupes. Ce sont des enzymes généralement de faible poids moléculaire qui sont calcium (Ca²⁺) dépendantes. Il a été identifié 18 formes de sPLA₂ chez les mammifères, les insectes, les mollusques, les reptiles, les plantes, les bactéries et les virus. Ces enzymes sont présentes dans différents venins (par exemple les sPLA₂ des groupes IA, IIB, III et IX). D'autres sont sécrétées par différents tissus des mammifères (par exemple par le pancréas, IB, IID) et par les macrophages (groupe V). Les sPLA₂ sont impliquées dans de nombreux processus, notamment dans la lyse cellulaire, la synthèse des eicosanoïdes, l'inflammation et les défenses immunitaires (Dennis, 2000; Dennis et al., 2011).

Les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂, du groupe IV) comprennent 6 sous-groupes. L'activation des cPLA₂ est également Ca²⁺ dépendante. Elle fait intervenir la phosphorylation d'un ou plusieurs sites (Ser-505, Ser-727, Ser-515) et la fixation du Ca²⁺ sur un domaine « calcium-dependent lipid binding » (Campbell et al., 2007). La cPLA₂ du sous-groupe IVA a été identifiée dans les plaquettes, les PNNs et les macrophages. L'activation de cette enzyme implique la PKC et les MAP Kinases, les médiateurs lipidiques céramide-1-phosphate, ainsi que le phosphatidylinositol 4,5-bi phosphate (PIP2) (Lin et al., 1993; Mosior et al., 1998; Nakamura et al., 2006). Pour que l'enzyme soit active elle doit être séquestrée à l'interface des phospholipides membranaires. La liaison de la cPLA₂ IVA à la membrane est contrôlée par trois mécanismes: la translocation à la membrane via le Ca²⁺, la liaison de messagers lipidiques secondaires et la phosphorylation. Chacun de ces mécanismes augmente l'efficacité catalytique de cette PLA₂ (Dennis et al., 2011). Les fonctions biologiques de la cPLA₂ IVA est spécifiquement dépendante de l'hydrolyse des phospholipides membranaires en position sn-2 des acides gras polyinsaturés (Ghosh et al., 2006; Uozumi and Shimizu, 2002). De ce fait, en réponse à des stimuli, l'AA pourra servir de substrat et être métabolisé par la voie des COXs, la voie des LOXs ou du cytochrome P-450.

La phospholipase A₂ du groupe VI (iPLA₂) est caractérisée par son activité indépendante du Ca²⁺ (Winstead et al., 2000). D'autres PLA₂ sont aussi actives en absence de calcium. Il s'agit des PLA₂ IVC, VII, VIII et des PLA₂ lysosomiales. Le premier membre de cette famille, a été purifié et caractérisé dans les macrophages. A ce jour, le groupe VI de iPLA₂ comprend 6 membres différents notés de A à F (Schaloske and Dennis, 2006). Ces iPLA₂ sont principalement impliquées dans le remodelage des phospholipides membranaires ; elles participent à l'homéostasie cellulaire en maintenant un niveau constant de lyso-phospholipides, notamment de lyso-phosphatidylcholine (Balsinde et al., 1995). Elles jouent également un rôle dans la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la formation osseuse, la sécrétion d'insuline et le recrutement des monocytes (Dennis et al., 2011). La iPLA₂ VIA a aussi été associée au diabète de type 1 et 2 en raison de sa participation dans l'apoptose des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas et dans la production de superoxydes (Xie et al., 2010).

Les PLA₂ des groupes VII et VIII catalysent l'hydrolyse du groupement acétyle en position sn-2 du facteur d'activation plaquettaire (ou PAF-acéther) et ainsi inhibe ses effets pharmacologiques. Outre l'activation des plaquettes, le PAF-acéther est un puissant médiateur de nombreuses fonctions des leucocytes, tenant un rôle important en tant que médiateur de inflammation (Prescott et al., 2000).

La PLA₂ lysosomiale (LPLA₂ du groupe XV) joue un rôle important dans la dégradation des phospholipides des lysosomes, en particulier de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine.

L'AdPLA₂ du groupe XVI s'exprime chez l'Homme et la souris dans le tissu adipeux. Identifiée plus récemment, l'AdPLA₂ présente une activité phospholipase A₁ et A₂ indépendante du Ca²⁺. L'AdPLA₂ est impliquée dans la production des eicosanoïdes dans le tissu adipeux. Des études à l'aide de souris dont le gène de cette PLA₂ est invalidé montre une réduction de la masse adipeuse des tissus, une diminution de la teneur en triglycérides et du taux de PGE₂. Ces changements s'accompagnent d'une lipolyse et d'une augmentation de l'oxydation des acides gras dans les adipocytes. Ainsi, cette AdPLA₂ serait un régulateur majeur de la lipolyse des adipocytes et serait cruciale pour le développement de l'obésité et l'inflammation à bas bruit qui l'accompagne (Jaworski et al., 2009).

TYPES	GROUPES	SOUS-GROUPES	SOURCES
sPLA ₂ <i>Secreted Phospholipase A2</i>	I II III V IX X XI XII XIII XIV	A,B A,B,C,D,E,F A,B A,B	Serpents (A) - Pancréas humains/porcins (B) Serpents (A,B) / synovies humaines (A) - Testicules murins/ rats (C) - Pancreas/rates (D), cerveau, cœur, uterus (E), testicules/embryon (F) humains/murins Lezards, abeilles, humains, murins Cœurs, poumons, macrophages humains/murins Escargots (conodipine-M) Rates/thymus/leucocytes humains Pousses de riz vert (PLA ₂ -I, PLA ₂ -II) Humai, murin Parvovirus Champignons/bactérie symbiotique
cPLA ₂ <i>Cytosolic Phospholipase A₂</i>	IV	A _(α) , B _(β) , C _(γ) , D _(δ) , E _(ε) , F _(f)	Ubiquitaire: cellules de type macrophages humains U937, plaquettes, RAW 264.7, reins de rats (A) - Ubiquitaire:pancreas, foies, cœurs, cerveaux humains (B) - Cœurs, muscles squelettiques humains (C) - Placentas humains (D) - Cœurs, muscles squelettiques, testicules, thyroïdes murines (E) - Thyroïdes, estomacs murins (F)
iPLA ₂ <i>Calcium Independent Phospholipase A₂</i>	VI	A _(β) , B _(γ) , C _(δ) , D _(f) , E _(g) , F _(h)	Humains/murins (A, B, C) - Humains (D,E,F)
PAF-AH <i>(PAF acetylhydrolases)</i>	VII VIII	A(Lp-PLA ₂), B(PAF-AH II) A _(α1) , B _(α2) , β	Humains, murins, porcins, bovins (A) - Humain, Bovin (B) Humains
LPLA ₂ <i>Lysosomal Phospholipase A₂</i>	XV		Humains, murins, bovins
AdPLA ₂	XVI		Humains, murins

Tableau 27 : Superfamille des Phospholipase A₂. Adapté de (Dennis et al., 2011).

2. Les cyclooxygénases ou prostaglandine H₂ synthétases

Les COXs ou Prostaglandine H₂ synthétases sont les enzymes qui catalysent les deux premières étapes de la biosynthèse des prostaglandines (PGs) à partir de l'AA (Smith et al., 2011). Deux isoformes des COXs (COX-1 et COX-2) codés par des gènes distincts ont été identifiés (Smith et al., 2000).

COX-1 est codée par un gène du chromosome IX. Du fait de l'absence de TATA box sur son promoteur cette enzyme s'exprime de manière constitutive. COX-1 se retrouve hautement exprimée dans la plupart des tissus et est nécessaire pour la production des prostanoïdes impliqués dans différentes fonctions. C'est le cas au niveau des plaquettes sanguines (Chiang et al., 1999), des cellules endothéliales vasculaires (Korchak et al., 1982) ainsi qu'au niveau de l'estomac (Smith et al., 1994) et des reins (Seibert et al., 1994).

COX-2 est exprimée de manière constitutive dans le cerveau et le rein et est inductible dans de nombreuses cellules en réponse à des stimuli souvent associés à l'inflammation. Par exemple COX-2 est induite par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α , des endotoxines et des agents mitogènes. Inversement, les corticoïdes et l'IL-10 inhibent son expression.

COX-1 et COX-2 ont une homologie de structure proche, près de 60%. Ces enzymes existent sous forme d'homodimère ayant une masse moléculaire d'environ 70 kDa par monomère (Kurumbail et al., 2001; Smith et al., 2000). Les structures tertiaires et quaternaires de ces deux enzymes sont pratiquement identiques. La structure tridimensionnelle de COX-1 est composée de trois domaines distincts (**Figure 28**). Un domaine EGF-like formé de 2 doubles feuilletts β . Un domaine catalytique constitué de deux sites : un site actif cyclooxygénase et un site peroxydase. Le domaine de liaison à la membrane est composé de quatre hélices α qui délimitent l'entrée d'un tunnel hydrophobe. Le site actif cyclooxygénase et le site actif peroxydase de COX-1 et COX-2 sont hautement conservés. Ces sites sont localisés dans le domaine catalytique qui représente environ 80% de la protéine. Le domaine catalytique est hautement homologue de celui des peroxydases de mammifères comme la myéloperoxydase (Picot et al., 1994). Le site actif cyclooxygénase est situé à l'extrémité d'une longue chaîne hydrophobe près du domaine de fixation à la membrane. Le site peroxydase se trouve à la surface de la protéine à proximité du cofacteur hème.

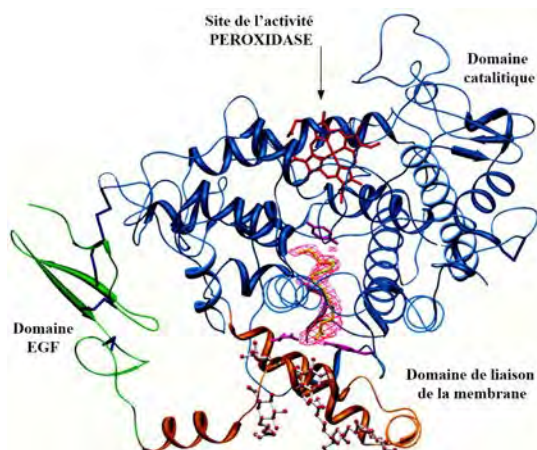


Figure 28 : Structure tridimensionnelle et domaines enzymatiques de COX-1.

COX-1 et COX-2 catalysent deux réactions chimiques séquentielles dans deux sites actifs spatialement distincts mais mécanistiquement couplés (**Figure 29**). Les COXs génèrent de la PGH₂ à partir de l'AA via 2 réactions chimiques séquentielles. La première, comprend l'addition de deux moles d'oxygène via l'activité cyclooxygénase (notée COX sur la **Figure 29**) afin de générer un intermédiaire instable : la PGG₂ un endoperoxyde cyclique. Sous l'action de l'activité peroxydase (PEROX sur la **Figure 29**), la PGG₂ est réduite en PGH₂ (Serhan et al., 2003). Ces deux réactions chimiques sont produites par deux sites actifs distincts (Smith et al., 1996)

Bien que, les deux enzymes aient des paramètres cinétiques comparables (V_{max} et K_M) pour l'oxygénation de l'AA, le volume du site actif de COX-2 est d'environ 20% supérieur à celui du site actif

de COX-1. Cette différence de taille du site catalytique s'explique par la présence d'acides aminés de tailles différentes en position 523 (valine pour COX-2 et isoleucine pour COX-1).

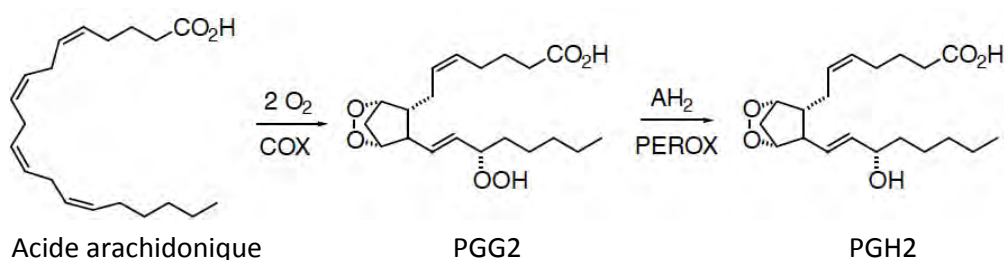


Figure 29 : Métabolisme de l'AA par COX-1 et COX-2.

Cette différence peut expliquer la capacité de COX-2 à métaboliser d'autres acides gras que l'AA (C20:4 n-6) notamment l'EPA et le DHA. Les différences au niveau des sites catalytiques de COX-1 et COX-2 permettent d'expliquer l'action spécifique de certains anti-inflammatoires sélectifs de COX-2 et de l'aspirine (Kurumbail et al., 2001). En effet, l'acétylation par l'aspirine de la sérine en position 530 du site catalytique cyclooxygénase de COX-1 abolit complètement l'activité de l'enzyme, alors que l'acétylation du même site sur COX-2 déplace le profil de production des métabolites de l'AA de PGH₂ exclusivement vers la synthèse d'un métabolite de l'AA monooxygéné, l'acide 15-(R)-hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) (Lecomte et al., 1994; Mancini et al., 1997; Rowlinson et al., 2000).

Finalement, il semble aujourd'hui, que les gènes distincts de COX-1 et COX-2 puissent coder un certain nombre de protéines COX constitutives et inductibles avec des fonctions qui se chevauchent (**Tableau 30**). Ainsi, il a été montré que le gène COX-1 code pour un variant d'épissage dans le cortex canin nommé COX-3 qui serait "tissu spécifique" (Chandrasekharan et al., 2002; Warner and Mitchell, 2004). Toutefois, l'existence et le rôle physiologique de cette isoforme dans l'inflammation et la fièvre restent à confirmer (Kis et al., 2005).

	COX-1	COX2
Régulation	Constitutive	Inductible: caractéristique d'une réponse inflammatoire
Taille de la protéine	576 acides aminés, site actif de faible taille (Isoleucine)	587 acides aminés, site actif large (Valine)
Taille du gène	25 kb avec 11 exons	8 kb avec 1à exons
Chromosome humain	9	1
Taille de l'ARN messenger	2,7 kb	4,5 kb
Localisation	Réticulum endoplasmique, enveloppe nucléaire	Réticulum endoplasmique, enveloppe nucléaire
Expression cellulaire et tissulaire	Plaquettes, cellules endothéliales, estomac, duodenum, jéjunum, côlon, reins, poumons, muscle lisse	Cerveau, follicules, monocytes / macrophages activés, synoviocytes, reins,
Rôle	Protection de la muqueuse gastrique, rôle dans agrégation plaquettaire et le débit sanguin.	Rôle dans le développement rénal, la reproduction, le métabolisme osseux la cicatrisation (ulcer, ischémie), inflammation, douleur, fièvre, rôle dans la progression tumorale (cellules épithéliales malignes...)

Tableau 30 : Tableau comparatif de COX-1 et de COX-2.

Au niveau de la peau COX-1 est impliquée dans l'homéostasie, tandis que COX-2 est induite lors d'un stress oxydant sous l'effet de rayons ultraviolets ou lors d'une blessure (Chun and Langenbach, 2007; Elmets et al., 2014; Muller-Decker et al., 2002). L'expression de COX-2 est détectée dans les kératinocytes au cours de la cicatrisation (Leong et al., 1996; Rys-Sikora et al., 2000). Après blessure cutanée par excision chez le rat, COX-2 (protéine et ARNm) s'exprime principalement au niveau de la lésion dans la couche basale de l'épiderme et au niveau des cellules inflammatoires (Futagami et al.,

2002; Hamamoto et al., 2009). L'administration d'inhibiteurs de COX-2 a pour conséquence un retard de la réépithélialisation au cours de la phase initiale de cicatrisation et une inhibition de l'angiogenèse (Futagami et al., 2002). D'autres études sur un modèle de plaie par excision chez la souris montrent que les inhibiteurs spécifiques ou non spécifiques de COX-2 ont peu ou pas d'effet sur la vitesse de cicatrisation des plaies (Blomme et al., 2003; Muller-Decker et al., 2002). Kampfer *et al* ont suggéré un rôle critique de COX-1, plutôt que de COX-2, dans la réparation des plaies cutanées (Kampfer et al., 2003). Ils ont observé que l'expression de COX-1 diminue transitoirement après une blessure puis augmente dans le tissu nouvellement formé (Lee et al., 2003). En effet, des souris traitées avec un inhibiteur de COX-1 ou des souris dont le gène de COX-1 est invalidé montrent une diminution de PGE₂ et PGD₂ au niveau du site de la plaie et une altération du processus cicatriciel. Ces effets sont réversés par un traitement avec de la PGE₂ exogène. En outre, bien que l'expression de COX-2 soit présente dans le tissu de granulation induit au cours de la lésion, cet isoforme ne semble pas être responsable des niveaux élevés de PGE₂ et de PGD₂ au niveau de la blessure.

3. Voies métaboliques des cyclooxygénases

3.1. Les prostanoides synthétases

La prostaglandine H₂ produite par COX-1 et/ou COX-2 à partir de l'AA est isomérisée en prostanoides : PGs des séries D, E et F, en prostacycline (PGI₂) ou en thromboxane (TXA₂) selon la prévalence des prostanoides synthétases correspondantes. Les prostanoides synthétases sont à l'origine de 3 séries de prostanoides en fonction de l'acide gras polyinsaturé de départ comportant 20 atomes de carbone à 3, 4 ou 5 doubles liaisons *cis* (eicosanoïdes).

Les prostanoides de la série 1 sont issus de l'acide dihomogamma-linolénique (DGLA ; C20:3 *cis*-Δ^{8,11,14}), dérivé de l'acide gamma-linolénique (GLA ; C18:3 ω-6) qui résulte lui même de l'acide linoléique (18:2 ω-6).

Les prostanoides de la série 2 sont issues de l'AA ou acide 5, 8, 11, 14 eicosatétraénoïque (AA ; C20:4 ω-6.) Cet acide gras est prépondérant au niveau des membranes cellulaires.

Les prostanoides de la série 3 sont issus de l'EPA ; *cis*-Δ^{5,8,11,14,17} 20:5 ω-3), dérivé de l'acide alpha-linolénique (C18 :3 ω-3).

Ainsi, le profil de production de prostanoides par un type cellulaire donné est dépendant d'une part, du niveau de mobilisation et du type d'AGPI mobilisé (DGLA, AA, EPA) et du niveau d'expression et d'activation des différentes synthétases (**Figure 31**). Ainsi, alors que le TXA₂ produit via la TX synthétase est le métabolite principal de la voie de la COX dans les plaquettes, la PGE₂ est synthétisée via les PGE synthétases dans de nombreux types cellulaires. La PGI₂, est synthétisée par la PGI synthétase principalement dans les cellules endothéliales vasculaire. La PGD₂ qui est un des métabolites majeurs de la voie des COXs est produite dans divers types cellulaires, notamment les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes.

3.2. Les prostaglandines de la série E

La PGE₂ est un des principal eicosanoïdes produit au niveau de la peau par les kératinocytes de l'épiderme et les fibroblastes du derme. Elle présente de puissantes propriétés pro-inflammatoires et vasodilatatrices, elle favorise la prolifération cellulaire et module la réponse immune. Les effets de PGE₂ sont fonction du type de récepteur stimulé et de son couplage aux protéines G. Dans le cas des cellules cutanées 4 types de récepteurs sont retrouvés (EP1, EP2, EP3, EP4), plus ou moins

exprimés en fonction des conditions environnementales, notamment inflammatoires (Rundhaug et al., 2011).

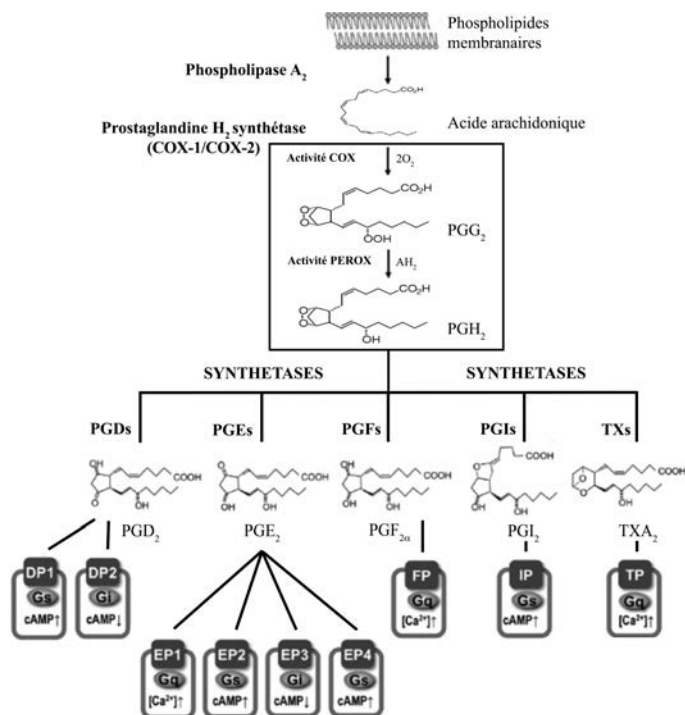


Figure 31 : Biosynthèse des prostanoides. L'acide arachidonique est métabolisé par la cyclooxygénase-1 ou -2 en PGH2 un endopéroxyde instable. PGH2 est le précurseur commun pour les 5 principales voies de synthèse des prostanoides. Le thromboxane (Tx)A2, prostaglandines (PG)D2, PGE2, PGI2 (prostacycline), and PGF2 α sont générés à partir de synthétases (TxA synthétase, TxAS, PGD synthétase (PGDS), PGES, PGIS, and PGFS). Les effets biologiques de ces lipides bioactifs sont sous le contrôle de récepteurs présents à la surface de cellules cibles. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G (Hata and Breyer, 2004).

PGE₂ peut être produit par trois types de PGE synthétases, l'une est cytosolique (cPGES) et les deux autres sont associées à la membrane microsomale (mPGES-1 et -2). La mPGES-1 est induite par les mêmes stimuli que COX-2. Ainsi, l'induction combinée de COX-2 et mPGES-1 explique la forte production de PGE₂ dans la phase d'initiation de la réponse inflammatoire. La cPGES est exprimée de manière constitutive dans le cytosol et son activité est couplée à celle de COX-1 dans des conditions basales (Tanioka et al., 2000). La mPGES-2 est aussi exprimée de manière constitutive dans diverses cellules et tissus, et son activité est couplée à celles de COX-1 et COX-2 (Murakami et al., 2003).

Les effets de PGE₂ sont multiples et sont fonction du type de récepteur activé. Par exemple, PGE₂ favorise la transcription du gène de l'IL-10 des macrophages stimulés par les lipopolysaccharides ou le zymosan via les récepteurs EP2 et EP4 (Rodriguez et al., 2014). EP1 module quant à lui la prolifération des fibroblastes (Watanabe et al., 1996).

Au cours d'une lésion cutanée, COX-2 est induite et a une activité importante au cours de la phase de réparation. La PGE2 est un des métabolites de l'AA produit au cours de cette phase. Cette PG module à la fois l'inflammation et la fibrose. Elle inhibe la migration des fibroblastes via la voie EP2/EP4 - AMP cyclique - protéine kinase A et elle diminue la contraction du collagène. Ce sont deux composantes essentielles à la fibrose dans la réparation des plaies cutanées (Sandulache et al., 2006).

D'autres études montrent également que la PGE₂ est une PG essentielle à la réparation tissulaire (Kampfer et al., 2003) et que son niveau est corrélé à la vitesse de cicatrisation. En effet, une forte diminution de la production de PGE₂, PGD₂, et de prostacycline au niveau de la plaie de souris diabétiques *ob/ob* a été observée. Cette diminution est associée à une réduction du nombre de kératinocytes dans l'épithélium néoformé (Kampfer et al., 2005). Ces données suggèrent qu'une dérégulation de la production des PGs pourrait contribuer au défaut de cicatrisation de sujets

diabétiques. Cependant, ces résultats ne sont pas discriminants quant aux effets propres des différentes PGs. La baisse du niveau de PGE_2 de souris diabétiques pourrait être liée non seulement à un défaut de production mais aussi à une accélération de sa dégradation qui est sous le contrôle des transporteurs de PG (PGT). Il a été établi que PGT est induit par l'hyperglycémie au cours du diabète, ce qui a pour conséquence une diminution du taux de PGE_2 au niveau des plaies des sujets diabétiques (Syeda et al., 2012). La diminution de PGE_2 provoquerait une diminution de la réponse angiogénique au niveau du tissu cicatriciel (Zhang and Daaka, 2011). Ce défaut pouvant être restauré par l'inhibition pharmacologique de PGT (Syeda et al., 2012). Ces données indiquent que l'équilibre entre synthèse et dégradation des prostanoïdes est un mécanisme qui joue un rôle clé dans le contrôle de la vitesse de cicatrisation.

3.3. Les prostaglandines de la série D

La PGDS est la synthétase terminale impliquée dans la transformation de PGH_2 en PGD_2 . 2 formes de PGDS ont été clonées et caractérisées (Kanaoka et al., 1997; Urade et al., 1985). La L-PGDS (de type lipocalin) est principalement produite dans le système nerveux central, dans les oligodendrocytes, où elle participe à l'induction du sommeil, à la régulation de la température corporelle et à la perception de la douleur tactile. L'expression de la L-PGDS dans les neurones en cours de dégénérescence dans l'encéphalopathie anoxique-ischémique suggère que la L-PGDS serait une protéine de stress précoce qui serait induite pour protéger les neurones de la mort (Taniguchi et al., 2007). Cette hypothèse est soutenue par le fait que les souris twitcher déficientes en L-PGDS présentent une forte mort neuronale. Elle est aussi surexprimée dans le cerveau des patients atteints de sclérose en plaques. La signification de cette induction fait débat. La PGD synthétase hématopoïétique (H-PGDS) est largement distribuée dans les tissus périphériques où elle est l'enzyme clé pour la production de PGD_2 .

Comme la PGE_2 , la PGD_2 serait impliquée dans l'initiation et la progression de l'inflammation. Ainsi, l'injection de PGD_2 sous la peau provoque un érythème avec infiltration des leucocytes. PGD_2 peut activer trois types de récepteurs couplés à des protéines G, DP1, DP2 et CRTH2. Le récepteur DP1 est impliqué dans la vasodilatation. Il s'exprime dans certaines populations de leucocytes où il joue un rôle central dans l'apparition de l'inflammation aiguë mais aussi dans sa résolution. Il contrôle l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Levy et al., 2001). L'axe DP1/ PGD_2 contribue à la maturation des mastocytes et serait impliqué dans la dermatite allergique et les maladies auto-immunes (Hohjoh et al., 2014)

Le récepteur CRTH2 dont la structure ne s'apparente pas au récepteur DP1 s'exprime sur les lymphocytes Th2 et fait partie de la famille des récepteurs aux chimiokines. Cependant, la classification systématique des récepteurs aux PGs recommande l'utilisation du terme DP2 pour décrire aussi ce récepteur (Woodward et al., 2011). L'activation de CRTH2/DP2 par PGD_2 joue un rôle important dans l'inflammation allergique via le recrutement de lymphocytes Th2 (Hirai et al., 2001) et de manière importante en entraînant la production des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (Xue et al., 2005; Xue et al., 2014).

Kapoor *et al.*, ont montré sur un modèle de plaie cutanée par excision chez la souris, un changement du métabolisme de l'AA vers PGE₂ et vers PGD₂ au cours des phases inflammatoires et de la phase de réparation. L'augmentation de PGE₂ durant la phase inflammatoire et sa diminution au cours de la phase de réparation seraient liées à des changements temporels de l'expression de la mPGES-1 (Kapoor *et al.*, 2007a). La mPGES-1 est augmentée pendant la phase inflammatoire aiguë et sa disparition coïncide avec l'augmentation de PGD₂ via la H-PGDS. Dans cette étude, ces auteurs montrent de manière intéressante que PPAR_γ est induit au cours de la phase de réparation de la plaie de manière concomitante à l'augmentation de la production de PGD₂. Cette induction de PPAR_γ pourrait être un élément déterminant dans le mécanisme d'action de PGD₂ au cours de la phase de résolution de l'inflammation et des phases plus tardive de la cicatrisation. Les résultats obtenus par ces auteurs vont dans le sens de plusieurs autres études qui montrent l'effet anti-inflammatoire de PGD₂ et son implication dans la résolution de l'inflammation via PPAR_γ (Gilroy *et al.*, 1999; Rajakariar *et al.*, 2007).

La H-PGDS contrôlerait la résolution de l'inflammation aiguë via la PGD₂ mais aussi via un de ses métabolites la 15-déoxy Δ^{12-14} PGJ₂ (15d-PGJ₂). La 15d-PGJ₂ qui provient de la déshydratation de la PGD₂ est activement incorporée dans les cellules et s'accumule dans le noyau où elle forme des adduits avec diverses protéines et des facteurs de transcription. Cette PG ayant un motif cyclopenténone a des effets anti-inflammatoires et cytoprotecteurs. La 15d-PGJ₂ peut agir comme un accepteur de Michael qui interagit avec des nucléophiles cellulaires, tels que le groupe thiol de la cystéine dans les protéines. La plupart des effets biologiques induits par la 15d-PGJ₂ impliquent son interaction avec des facteurs de transcription. Ainsi, la 15d-PGJ₂ inhibe les effets de NF- κ B et AP-1 alors qu'il active le facteur de transcription Nrf2 et le récepteur nucléaire PPAR_γ (Kim and Surh, 2006). L'activation de PPAR_γ par la 15d-PGJ₂ a des effets cytoprotecteurs, anti-inflammatoires et anti-angiogéniques et cette activation favorise l'apoptose des cellules inflammatoires. L'activation de Nrf2 par la 15d-PGJ₂ déclenche l'induction d'enzymes aux fonctions antioxydantes (par exemple, hémoxigénase, peroxyredoxine, NAD(P)H déhydrogénase quinone-1). Ainsi, la 15d-PGJ₂ exerce des effets anti-inflammatoires et favorise la résolution de l'inflammation par des voies de signalisation dépendantes ou indépendantes de PPAR_γ. PPAR_γ et Nrf2 peuvent être activés par d'autres molécules électrophiles résultant du métabolisme d'autres PGs. C'est le cas des cyclopenténones provenant du métabolisme de PGE₂. Ainsi, la cyclopenténone PGA₂ qui provient de la déshydratation de la PGE₂ ainsi que la 15-céto-PGE₂ qui résulte de la biotransformation de la PGE₂ par la 15-hydroxy déshydrogénase sont des ligands de PPAR_γ dont les effets sont encore peu explorés (Chou *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2013).

L'activation de PPAR_γ par la 15d-PGJ₂ (ou d'autres ligands endogènes comme les HETEs) contribue à polariser les macrophages en phénotype M2a (Coste *et al.*, 2003; Coste *et al.*, 2008). Ces macrophages qui expriment des récepteurs scavenger (Berry *et al.*, 2007) notamment le récepteur CD36, sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules apoptotiques. Les Lipoxines et les résolvines produites par les macrophages M2 par l'action de la 12,15-LOX (ou de COX-2 acétylée) favorisent l'apoptose des cellules inflammatoires. L'expression du récepteur CD36 qui est un élément clé de l'efférocytose peut aussi être induite par la 15d-PGJ₂ ou par d'autres molécules électrophiles (la curcumine ou le sulforaphane) via le facteur de transcription Nrf2 (Olagnier *et al.*, 2011a; Olagnier *et al.*, 2011b). Une autre famille de facteurs de transcription tels que les récepteurs hépatiques X (LXRs) induisent également l'expression du CD36 et de ce fait sont impliqués dans la résolution de l'inflammation via la polarisation des macrophages, la suppression de la production de cytokines inflammatoires et l'amélioration de l'efférocytose des cellules apoptotiques (Korns *et al.*, 2011).

Finalement, PGD_2 comme PGE_2 peuvent contribuer à la résolution de l'inflammation par l'induction de l'expression de la 15-lipoxygénase dans des PNNs humains. Ceci provoquant une reprogrammation de ces cellules et participe ainsi à la production de LXA_4 anti-inflammatoire au dépend du LTB_4 pro-inflammatoire (Levy et al., 2001). Ce dernier point illustre l'interconnexion des voies métaboliques des COXs et des lipoxygénases dans la régulation de la réponse inflammatoire.

3.4. La prostacycline

La prostacycline (ou PGI_2) est synthétisée par les cellules endothéliales vasculaires à partir de PGH_2 par la prostacycline synthétase (PGIS). Ce médiateur lipidique est un puissant vasodilatateur (Feigen et al., 1980; Nagaya, 2010) et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Vane and Corin, 2003). Au cours des dernières années, il a été montré que la PGI_2 favorisait la différenciation et inhibait la prolifération des cellules musculaires lisses. La durée de vie de PGI_2 est très courte ; sa demi-vie est inférieure à 2 min et son produit d'hydratation, la 6-céto-prostaglandine $F1\alpha$ (6-céto- $PGF1\alpha$) est très rapidement formé dans les liquides biologiques.

Le récepteur à PGI_2 , dénommé IP, est un récepteur essentiellement couplé à une protéine Gs dont la signalisation intracellulaire se fait via l'adénylate cyclase par l'AMP cyclique. Toutefois ce récepteur peut également être couplé à des protéines Gq et Gi (Majed and Khalil, 2012). La PGI_2 pourrait aussi agir via le récepteur nucléaire PPAR δ (Katusic et al., 2012; Lim and Dey, 2000).

En plus de ses rôles homéostatiques dans le système cardio-vasculaire, la PGI_2 joue un rôle important en tant que médiateur de l'inflammation. Dans certaines situations la PGI_2 est pro-inflammatoire. Par exemple, elle participe à la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde où elle favorise la progression de la maladie. Dans d'autres situations, elle est anti-inflammatoire, inhibe la progression de la maladie et joue un rôle protecteur. C'est le cas de l'hypertension pulmonaire dans les désordres fibro-prolifératifs pulmonaires et l'athérosclérose (Stitham et al., 2011).

Quelques études suggèrent que la prostacycline serait un médiateur impliqué dans la cicatrisation des plaies en favorisant le remodelage tissulaire au cours du processus de réépithélialisation (Hatane et al., 1998). L'application topique d'un analogue stable de PGI_2 (SM-10902) sur une plaie excisionnelle sur des souris diabétiques *db/db* montre une réduction significative du temps de cicatrisation par rapport au groupe de référence. Le SM-10902 favorise l'angiogenèse au cours de la phase précoce du processus cicatriciel, améliore la circulation sanguine au niveau de la néo vascularisation et favorise la formation du tissu de granulation et la réépithélialisation (Yamamoto et al., 1996).

3.5. Les thromboxanes

Le TXA_2 est le métabolite biologiquement actif de l'acide arachidonique (AA) formé par l'action de la thromboxane A synthétase (TXAS) sur PGH_2 (Wang and Kulmacz, 2002). Le TXA_2 est très instable, il s'hydrolyse spontanément en TXB_2 biologiquement inactif avec une demi-vie de 30 s. En raison de sa courte demi-vie, le TXA_2 fonctionne principalement comme un médiateur autocrine ou paracrine à proximité de son site de production. Le TXA_2 est responsable de plusieurs processus biologiques via son récepteur (TP) à la surface des cellules (Huang et al., 2004).

Il est bien établi que le maintien d'un équilibre dynamique entre prostacycline et thromboxane est crucial dans l'homéostasie du système cardiovasculaire (Bunting et al., 1983). Le TXA_2 joue un rôle très important dans la pathogenèse de maladies cardiovasculaires via principalement sa puissante fonction vasoconstrictrice et sa capacité à induire l'agrégation et l'activation des plaquettes. Des

études récentes suggèrent aussi que le TXA₂ pourrait jouer un rôle dans la progression du cancer et les métastases (Ekambaram et al., 2011).

De par ses propriétés vasoconstrictrices et d'agrégation des plaquettes, le TXA₂ joue un rôle déterminant dans la première étape de cicatrisation des plaies en activant la coagulation du sang. Le TXA₂ pourrait aussi avoir un rôle dans les étapes ultérieures de cicatrisation en favorisant la contraction des fibroblastes (Nobe et al., 2003). Inversement, des niveaux élevés de TXA₂ sont associés aux ulcères cutanés et sont à l'origine de la formation d'escarre (Kempainen et al., 2004; Vaughn et al., 1989; Wang et al., 2004).

4. Voies métaboliques des lipoxygénases

Les LOXs constituent une famille hétérogène d'enzymes à fer non-hémique capables d'entraîner la peroxydation lipidique. Elles assurent l'oxygénation des acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes correspondants. Chez les mammifères, les LOXs sont classées en 5, 8, 12, et 15-LOX. Les numéros de préfixe se réfèrent à la position d'insertion de l'oxygène avec comme acide gras polyinsaturé de référence l'AA. Des 6 différentes LOXs du génome humain la plus connue est la 5-LOX des leucocytes à l'origine des leucotriènes. Deux autres LOXs sont identifiées dans les plaquettes (12S-LOX) et dans les réticulocytes, la 15-LOX de type 1 (15S-LOX-1) qui se retrouve aussi dans les éosinophiles. Trois autres LOXs sont spécifiques des cellules épithéliales. Deux de ces 3 lipoxygénases, la 15-LOX de type 2 (15-LOX-2) et la 12R-LOX ont été découvertes dans la peau humaine. La troisième LOX épidermique a été initialement clonée à partir de la peau de souris, elle est appelée eLOX3. Contrairement aux autres membres de la famille, eLOX3 est incapable de former des hydroperoxydes d'acides gras et par conséquent n'a pas de préfixe 5-, 12- ou 15- pour désigner son nom. Toutefois, eLOX3 qui n'oxyde pas les acides gras polyinsaturés exerce une activité hydroperoxyde isomérase. La 12R-LOX et la eLOX3 agissent de manière séquentielle dans la voie métabolique LOX-hépoxyline dans l'épiderme, avec pour fonction importante la formation de la barrière épidermique (Munoz-Garcia et al., 2014).

Le gène *ALOX5* codant pour la 5-LOX est sur le chromosome 10, alors que les autres gènes des LOX humaines sont regroupés sur le chromosome 17.

La 12-LOX des leucocytes mise en évidence chez la souris, le rat, le cochon est fonctionnellement équivalente dans ces espèces à la 15-LOX-1 de type réticulocytes. Aussi, ces enzymes sont désignées 12/15-LOX.

4.1. Voies métaboliques de la 5-lipoxygénase

La 5-LOX s'exprime dans les PNNs, les éosinophiles, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et les lymphocytes B.

La 5-LOX a deux fonctions catalytiques vis-à-vis du métabolisme des acides gras polyinsaturés et en particulier vis-à-vis de l'AA. Elle a une activité dioxygénase et une activité LTA₄ synthétase. Outre l'AA, d'autres AGPI en C20 sont de bons substrats pour l'activité dioxygénase de la 5-LOX, c'est le cas de l'EPA, de l'acide 5,8,11-eicosatriénoïque et de l'acide 5,8-eicosadiénoïque. C'est le cas aussi du 12- et du 15- hydroperoxyeicosatétraénoïque (12-/15-HPETE) (Radmark, 2002).

L'activité dioxygénase de la 5-LOX insère de l'oxygène moléculaire sur le carbone 5 de l'AA (synthèse de 5(S)-HPETE) et l'activité LTA₄ synthétase catalyse la formation d'un époxyde instable, le LTA₄. Le

rapport entre le LTA₄ et l'acide 5 (S)-HPETE dépend de la présence dans la cellule de différents co-facteurs et d'enzymes. Une concentration élevée de substrat conduit à une production élevée d'acide 5 (S)-HPETE. La formation de LTA₄ est favorisée par la translocation de la 5-LOX à la membrane nucléaire.

Dans la cellule au repos, la 5-LOX est localisée dans le cytosol ou à l'intérieur du noyau. Lors de l'activation, la 5-LOX migre vers l'enveloppe nucléaire, où sont localisées la protéine activant la 5-LOX, la 5-Lipoxygénase Activating Protein (FLAP) et la cPLA₂. La translocation de la 5-LOX à la membrane implique la phosphorylation de résidus sérine, Ser271 et Ser663 et la fixation de la 5-LOX à la FLAP via le Ca²⁺ (Radmark et al., 2007). La cPLA₂ localisée à la membrane libère l'AA à partir des phospholipides. La FLAP liée à la membrane facilite le transfert de l'AA à la 5-LO. Une autre protéine, la Coactosin-like protein (CLP) participe à l'assemblage de la protéine à la membrane nucléaire et favorise la synthèse de LTA₄ (Rakonjac et al., 2006). La CLP se fixerait via le Ca²⁺ à la 5-LOX dans le cytosol (Basavarajappa et al., 2014). Les stimuli qui déclenchent la biosynthèse des leucotriènes activent des MAP kinases (phosphorylation des Ser271 et Ser663) et augmentent le taux de calcium cytosolique (influx ou mobilisation des pools intracellulaires). Une augmentation du taux d'AMP cyclique active la protéine kinase A (PKA), qui réprime à son tour l'activité de la 5-LOX par phosphorylation de la Ser523 (Radmark et al., 2007).

4.1.1 Métabolisme du 5(S)-HPETE

Le 5(S)-HPETE produit par la 5-LOX peut-être réduit en acide 5- hydroxyeicosatetraénoïque ou 5-HETE via la glutathione peroxydase puis oxydé en acide 5-Oxo-ETE par la 5-hydroxyeicosanoïde déhydrogénase (5-HEDH) (Grant et al., 2009). Le 5-oxo-ETE est un puissant agent chimio-attractif pour les éosinophiles, les PNNs et dans une moindre mesure pour les basophiles et les monocytes. Il agit via un récepteur spécifique OXE couplé à une protéine Gi/o (identifiés indépendamment par 3 groupes et appelés TG1019, R527 et GPCR48). Bien que le rôle physiopathologique du 5-oxo-ETE n'est pas bien compris, il jouerait un rôle important dans l'asthme et les maladies allergiques, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Powell and Rokach, 2013). Il est important de souligner que la 15-LOX des éosinophiles peut catalyser la conversion de 5(S)-HPETE en LTA₄ (MacMillan et al., 1994).

L'hydrolyse enzymatique du LTA₄ catalysée par la LTA₄ hydrolase (LTA₄h) conduit à la synthèse de LTB₄ alors que la conjugaison du LTA₄ avec le glutathion via la LTC₄ synthétase (glutathion S transférase II) conduit à la synthèse du LTC₄ (**Figure 31**). L'expression de ces deux enzymes conditionne la synthèse de ces médiateurs. Comme nous le verrons plus loin, le LTA₄ peut être également métabolisé par la 15-LOX et par la 12-LOX pour produire des lipoxines anti-inflammatoires (Levy et al., 2012; Serhan, 2007).

4.1.2 Métabolisme du LTA₄ : la voie de la LTA₄ hydrolase

La LTA₄ hydrolase est une enzyme monomérique soluble dont la distribution est ubiquitaire. Elle est présente dans le cytosol et le noyau. Cette enzyme possède deux activités catalytiques: une activité époxyde hydrolase dépendante du zinc, qui est hautement spécifique pour le LTA₄ et une activité aminopeptidase. Cette activité interviendrait dans le clivage de peptides impliqués dans le chimiotactisme des cellules inflammatoires, notamment les PNNs.

Le LTB₄ qui résulte de l'hydrolyse du LTA₄ par la LTA₄h est une molécule pro-inflammatoire ayant de puissantes propriétés chimiotactiques pour les PNNs et à une moindre mesure pour les éosinophiles, les monocytes et les macrophages. Le LTB₄ favorise l'adhésion des granulocytes sur les cellules

endothéliales ainsi que la survie cellulaire. Ce lipide stimule également la dégranulation des enzymes lysosomiales, la libération massive de radicaux libres oxygénés et la phagocytose d'agents pathogènes. Le LTB₄ agit via deux récepteurs couplés aux protéines G : BLT₁R et BLT₂R (**Tableau 32**).

	BLT ₁ R (BLTR, LTB ₄ R1, P2Y7)	BLT ₂ R (BLT ₂ , JULF2, NOP9)
Gène	LTB ₄ R (souris: Ltb ₄ r1)	LTB ₄ R2, (souris: Ltb ₄ r2)
Localisation génomique	14q11.2-q12	14q12
Taille de la protéine	352 acides aminés	389 acides aminés
Affinité	LTB ₄ >>>20(OH)-LTB ₄ >>12(R)-HETE	LTB ₄ >12(S)-HETE>12(S)-HPETE >15(S)-HETE>20(OH)-LTB ₄
Couplage	Gi, Gq-like, Gz	Gi, Gq-like, Gz
Expression	HUMAIN Leucocytes >>rate>thymus	Rate>leucocytes, foie, ovaire, pancreas>cœur, prostate, testicules, intestins, reins,poumons, colon, thymus, muscle, placenta
	MURIN Souris: Leucocytes>>poumons, rate, ganglions lymphatiques	Pas d'expression dans les leucocytes, poumon, rate, ganglions lymphatiques

Tableau 32 : Caractéristiques des récepteurs aux LTB₄. Adapté de (Tager and Luster, 2003)

BLT₁R est un récepteur à protéine G de haute affinité pour le LTB₄. Il joue un rôle clé dans le chimiotactisme des PNNs, une des fonctions principales du LTB₄. A ce titre ce récepteur est impliqué dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire chronique. Le LTB₄ via ce récepteur favorise la survie des PNNs et déclenche la libération massive de radicaux libres oxygénés. L'effet stimulant du LTB₄ sur la diapédèse des PNNs s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et facilite la formation d'œdème. Des données récentes suggèrent que BLT₁R qui s'exprime sur les cellules effectrices et sur les lymphocytes T suppresseurs du système immunitaire pourrait être impliqué dans la progression et la régression des tumeurs (pour une revue voir (Back et al., 2014).

BLT₂R est un récepteur couplé à une protéine G de faible affinité pour LTB₄ qui reconnaît également des acides gras hydroxylés notamment le 12-épi LTB₄, le 12S-HETE, le 15S-HETE ainsi que le 12-HHT (acide 12 (S)-hydroxyheptadécatriénoïque). Il s'exprime de manière ubiquitaire dans l'épithélium digestif, les poumons, l'endothélium vasculaire, le foie, la rate, les ovaires et les cellules musculaires lisses. Des données récentes suggèrent un rôle protecteur du BLT₂R dans l'inflammation intestinale et des voies respiratoires (Mathis et al., 2010; Matsunaga et al., 2013). D'autres études suggèrent aussi que BLT₂R serait impliqué dans la croissance tumorale et la formation de métastases. Alors que le rôle pro-inflammatoire de BTL₁ est bien compris le rôle de BTL₂ au cours de l'inflammation n'est pas clair. Récemment, Liu *et al*, ont montré sur un modèle de cicatrisation cutanée chez la souris que le 12-HHT favoriserait la cicatrisation épidermique en accélérant la migration des kératinocytes via le récepteur BLT₂ (Liu et al., 2014).

La baisse du niveau d'expression de la LTA₄h ou de son activité époxyde hydrolase a pour conséquence une diminution de la synthèse de LTB₄ sans pour autant altérer les autres voies métaboliques du LTA₄ (voie de production du LTC₄ et de ses métabolites LTD₄ et LTE₄) ainsi que la voie de production des LXs. Ainsi, les inhibiteurs spécifiques de l'activité époxyde hydrolase de la LTA₄h inhibent l'effet du LTB₄ sans inhiber la production des LXs, à l'inverse des inhibiteurs de la 5-LOX ou de la FLAP (Rao et al., 2007).

Etant donné les deux fonctions catalytiques opposées de la LTA₄h, l'inhibition non spécifique de ces deux activités enzymatiques peut avoir des répercussions opposées à prendre en compte : inhibition de la production de LTB₄ qui peut favoriser d'une part la production de lipoxines et/ou l'augmentation de la production de LTC₄ et d'autre part la suppression de la dégradation de peptides chimiotactiques pro-inflammatoires (Caliskan and Banoglu, 2013) (**Figure 33**).

Au cours d'un processus inflammatoire, la demi vie du LTB_4 est conditionnée d'une part via l'expression de la 5-LOX et de la LTA_4h pour sa synthèse, et d'autre part via son catabolisme. En effet, l'inactivation du LTB_4 est assurée par sa conversion en 20-OH- LTB_4 sous l'action d'une LTB_4 -20-hydroxylase localisée exclusivement dans les microsomes des polynucléaires PNNs, puis en 20-CHO- LTB_4 et enfin en 20-COOH LTB_4 .

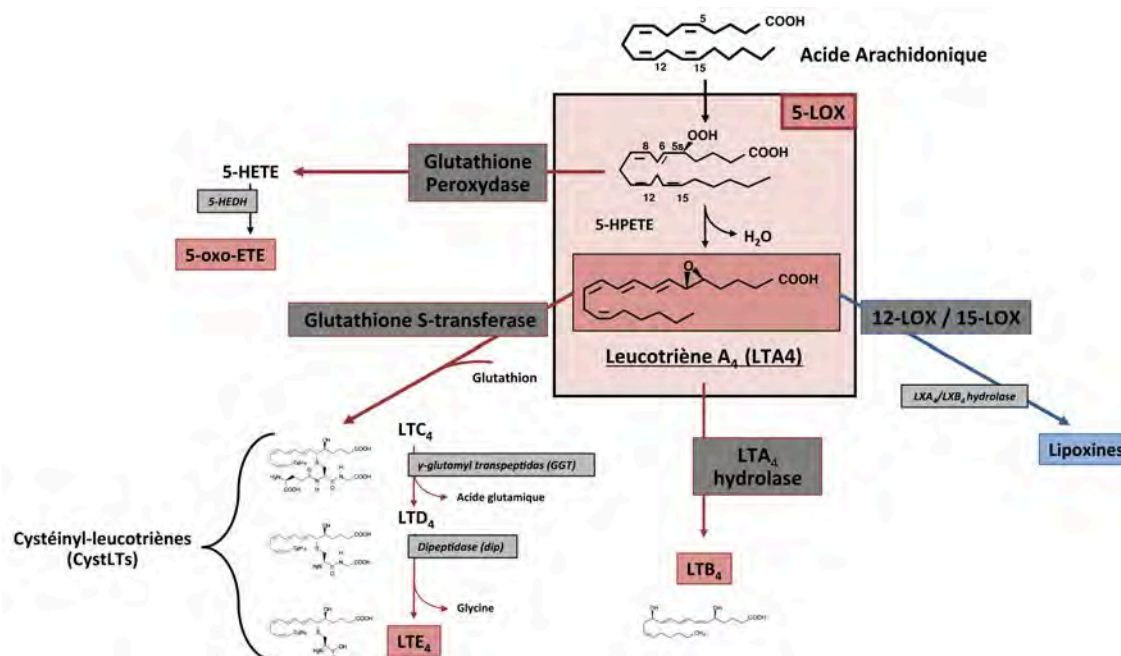


Figure 33 : Métabolisme de la 5-LOX et voies de signalisation.

4.1.3 Métabolisme du LTA_4 : la voie de la LTC_4 synthétase (Glutathion-S-transférase)

La LTC_4 synthétase est une enzyme de 18 kDa de la famille des glutathion-S-transférases. Elle est responsable de la conjugaison du glutathion réduit (GSH) à l'époxyde LTA_4 pour former le LTC_4 , tête de file des cystéinyl-leucotriènes (CysLT) (Penrose, 1999; Rinaldo-Matthis and Haeggstrom, 2010). Cette enzyme est localisée, au niveau de la membrane péri-nucléaire et sur le réticulum endoplasmique situé à sa proximité. Elle s'exprime dans les cellules hématopoïétiques (éosinophiles, basophiles, monocytes/ macrophages et plaquettes) ainsi que dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales.

Sous l'action d'une γ -glutamyl-transpeptidase, le LTC_4 est métabolisé en LTD_4 puis le LTD_4 est dégradé en LTE_4 par une dipeptidase (Figure 33). Ces CysLTs exercent leurs effets biologiques par l'activation de deux récepteurs spécifiques appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéiques G, à savoir CysLT_1R et CysLT_2R (Tableau 34). Récemment, deux sous-types supplémentaires (GPR17/ CysLT_3R , GPR99) qui reconnaissent des CysLTs et des nucléotides ont été proposés (Back et al., 2014).

Le récepteur CysLT_1R s'exprime sur les cellules endothéliales, sur les cellules épithéliales des voies aériennes, sur les fibroblastes et sur plusieurs types de cellules inflammatoires comme notamment les mastocytes, les monocytes/macrophages. L'expression de ces récepteurs augmente au cours de la différenciation des cellules Th2. Ils interviennent dans la bronchoconstriction, le chimiotactisme et l'augmentation de la perméabilité vasculaire

	CystLT ₁ R	CystLT ₂ R	GPR17(CystLT ₃ R)
Gène	CYSLTR1	CYSLTR2	GPR17
Localisation génomique	Xq13-Xq21	13q14.2	2q21
Taille de la protéine	337 acides aminés	346 acides aminés	339 acides aminés
Affinité	LTD ₄ > LTC ₄ >> LTE ₄	LTD ₄ = LTC ₄ >> LTE ₄	LTC ₄ = LTD ₄
Couplage	Gq/11	Gq/11	Gi
Expression	Leucocytes, rate, muscle lisse (poumon, intestin)	Leucocytes, rate, cœur médullosurrénale cerveau	Cerveau, cœur, rein

Tableau 34 : Caractéristiques des récepteurs aux CystLTs. Adapté de (Rovati and Capra, 2007)

Le récepteur CysLT₂R est fortement exprimé sur les cellules endothéliales et est impliqué dans plusieurs fonctions cardio-vasculaires. Il s'exprime fortement au niveau du cœur, dans plusieurs régions du cerveau, dans les poumons et de manière générale sur les cellules inflammatoires, notamment les éosinophiles, les basophiles et les macrophages. L'expression membranaire du CysLT₂R est augmentée par l'IL-4, qui provoque une production d'IL-8, puissant facteur chimiotactique des polynucléaires PNNs.

Le LTD₄ est le ligand préférentiel de CysLT₁R alors que le LTC₄ et le LTE₄ ont des affinités bien moindre avec ce récepteur. A l'opposé, CysLT₂ présente une affinité semblable aussi bien pour le LTC₄ que pour le LTD₄ contrairement au LTE₄.

Les LTC₄, LTD₄ et LTE₄ sont fortement sécrétés par les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles lors d'une réaction inflammatoire/allergique. Ces 3 molécules associées ont été initialement identifiées comme le SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis) provoquant une bronchoconstriction et impliqué dans l'asthme. Ces médiateurs provoquent aussi la contraction des muscles lisses digestifs. Ils sont pro-inflammatoires, jouent un rôle anti-infectieux et participent aux réactions d'hypersensibilité (allergie). Le LTC₄ et le LTD₄ induisent une diminution de la pression artérielle dont la cause principale est une réduction du volume sanguin par exsudation plasmatique. Le LTE₄ est le plus stable des 3 CysLTs produits et de ce fait le plus abondant *in vivo*. En particulier le niveau de LTE₄ augmente de manière importante dans les urines de patients atteints de maladies inflammatoires cutanées, notamment la dermatite atopique. Si le LTE₄ n'est qu'un agoniste partiel et de faible affinité pour les récepteurs CysLT₁ et CysLT₂, il serait un ligand avec une affinité de l'ordre du nano molaire pour le récepteur GPR99 (Back et al., 2014).

4.2. Voies métaboliques de la 12/15-lipoxygénase

La 12-LOX est une enzyme à fer non hémique présente chez l'homme dans l'épiderme, les leucocytes et les plaquettes. La 12-LOX catalyse la dioxygénation de l'AA en 12-HPETE qui est transformée en acide gras 12-époxy hépoxiline (agent pro-inflammatoire).

La 15-LOX-1 des réticulocytes présente une large spécificité de substrat pour les acides gras et leurs dérivés. L'enzyme oxyde efficacement tous les principaux acides gras polyinsaturés naturels tels que l'AA, l'acide linoléique (LA), l'acide α -linoléique (ALA), et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). La 15-LOX est impliquée dans la différenciation cellulaire et l'inflammation (Kuhn et al., 2002).

L'activité de la 15-LOX est finement régulée tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que post-traductionnel. Chez l'homme la 15-LOX est faiblement exprimée dans la plupart des cellules en

condition basale. Un élément important de la régulation transcriptionnelle de la 15-LOX (mais aussi de la 12/15-LOX murine) est leur induction par les cytokines. Dans les monocytes de sang périphérique, les macrophages, les cellules épithéliales trachéo-bronchiques, l'expression de la 15-LOX est induite par l'IL-4 ou l'IL-13 (Kuhn et al., 2002). Ce point est particulièrement important dans le concept d'activation alternative des macrophages (M2a) et leur rôle dans la résolution de l'inflammation. Les macrophages alvéolaires humains et les macrophages péritonéaux murins expriment constitutivement la 12/15-LOX. L'IL-4 et l'IL-13 induisent fortement l'expression de cette enzyme. La cascade de transduction du signal déclenchée par l'IL-4 et l'IL-13 implique la chaîne alpha du récepteur à l'IL-4 et le facteur de transcription STAT6. D'autres cytokines comme l'IFN γ , l'IL-6, l'IL-10 et le GM-CSF ne présentent pas cet effet inducteur.

L'oxygénation des acides gras polyinsaturés par la 12/15-LOX entraîne la production d'hydroperoxydes de ces acides gras, qui à leur tour sont réduits par la glutathion peroxydase en acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (13-HODE) lorsque l'acide gras est l'acide linoléique. Les 12-, et 15-LOXs convertissent l'AA en acides 12-, et 15-hydroperoxyeicosatétra-énoïques (HPETEs), qui sont réduits respectivement en 12/15-HETE) (Joo and Oh, 2012). Le métabolite prédominant chez la souris est le 12-HETE, et le 15-HETE chez l'homme (15-LOX-1 est l'équivalent de la 12/15-LOX murine).

L'exposition des cellules à des médiateurs lipidiques produits par la 12/15-LOX module l'activité de différentes voies de signalisation impliquant la protéine kinase C, les MAP kinases et NF- κ B (Uderhardt and Kronke, 2012). De plus, le 15-HETE et le 13-HODE participent à l'activation des récepteurs nucléaires PPAR γ (Huang et al., 1999). PPAR γ est un facteur de transcription central contrôlant le métabolisme des lipides et du glucose. PPAR γ a été identifié comme un régulateur négatif de la réponse inflammatoire et il contribue avec STAT6 à la polarisation M2a des macrophages.

Les propriétés biologiques de la 12/15-LOX sont multiples et pour certaines d'entre-elles encore mal comprises. Il a été montré que la 12/15-LOX pouvait être impliquée dans la pathogénie de diverses maladies à composante inflammatoire, telles que l'athérosclérose, l'allergie, l'ostéoporose, la maladie d'Alzheimer, le diabète et les maladies myéloprolifératives (Uderhardt and Kronke, 2012). Les résultats obtenus dans ces domaines sont souvent contradictoires. Ces contradictions, souvent liées à des différences de modèles expérimentaux, montrent que le rôle de la 12/15-LOX lors de l'inflammation est étroitement tributaire du spectre de substrats disponibles pour l'enzyme. Ainsi, un changement dans le spectre d'acides gras saturés ou insaturés (n-6 et n-3), de cholestérol, par exemple apporté par un régime alimentaire non équilibré, peut déclencher un changement du profil de lipides oxydés produits par la 12/15-LOX. Ces changements auraient pour conséquence une production prédominante de médiateurs pro- ou anti-inflammatoires selon la nature du lipide métabolisé par cette enzyme. Ainsi, la 12/15-LOX joue un rôle déterminant (i) dans la régulation de la réponse inflammatoire et sa résolution, (ii) dans la régulation de la réponse immune adaptative, et (iii) dans le maintien de la tolérance immune.

4.2.1 *La résolution de l'inflammation par les lipoxines*

Le fait le plus marquant concernant les propriétés biologiques de la 12/15-LOX est son implication dans la production de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires, tels que les lipoxines et les ligands (12/15-HETE et 13-HODE) pour les récepteurs nucléaires comme PPAR γ .

La synthèse des lipoxines implique une action concertée entre plusieurs lipoxygénases (**Figure 35**). Le LTA $_4$ produit par la 5-LOX des leucocytes ou par la 15-LOX-1 des éosinophiles (MacMillan et al., 1994) peut-être métabolisé par la 12/15-LOX des leucocytes ou par la 12-LOX des plaquettes en 5(6)-époxytétraène. Le 5(6)-époxytétraène produit au cours de ce métabolisme transcellulaire de l'AA peut ensuite être métabolisé en lipoxine A $_4$ (LXA $_4$) ou en lipoxine B $_4$ (LXB $_4$) (Serhan, 1994, 2002) en fonction des lipoxines hydrolases (LXA $_4$ H ou LXB $_4$ H) présentes dans les cellules. Ainsi, la synthèse des lipoxines implique un métabolisme trans-cellulaire de l'acide arachidonique mettant en jeu plusieurs types cellulaires (cellules endothéliales ou épithéliales, plaquettes et leucocytes) qui vont exprimer à un moment bien défini les enzymes nécessaires à la synthèse de ces médiateurs.

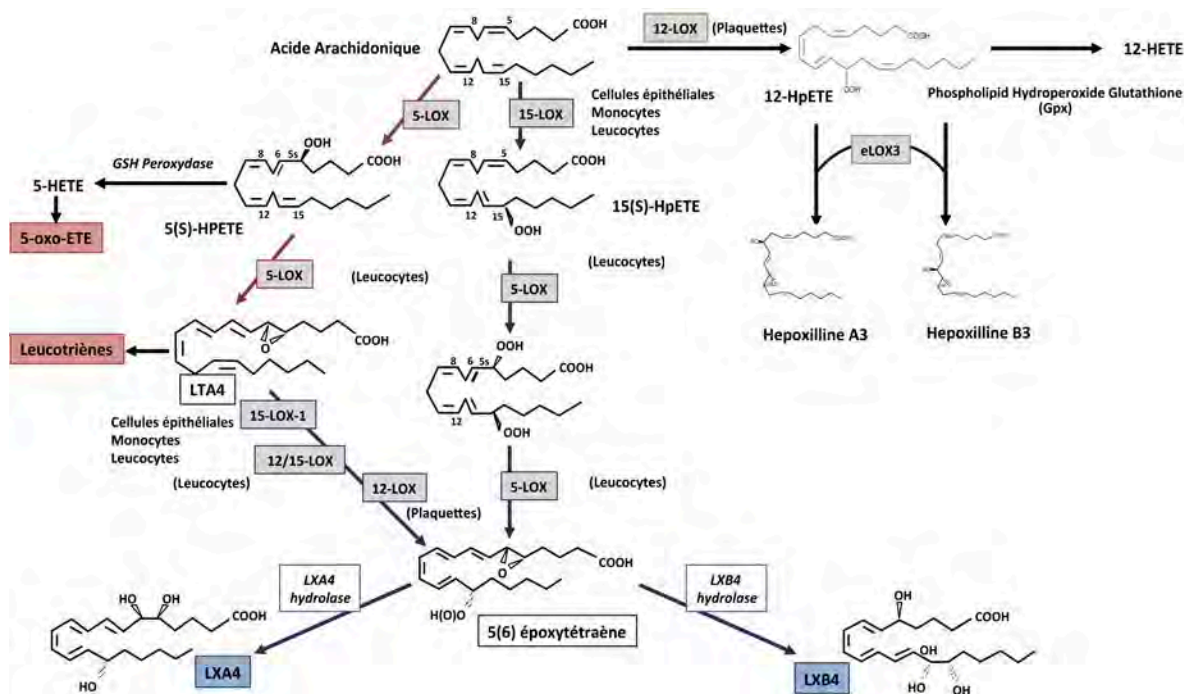


Figure 35 : Métabolisme de la voie des lipoxygénases.

L'orientation du métabolisme de l'acide arachidonique vers les lipoxines se fait au dépend des leucotriènes. Il implique d'une part l'induction de la 12/15-LOX, par exemple par les cytokines IL-4 et IL-13 et la répression (ou l'inactivation) de la LTA $_4$ hydrolase et de la LTC $_4$ synthétase pour la voie de synthèse des leucotriènes cystéinées. Des analyses de transcriptomique des sous-populations de macrophages au cours de l'évolution d'une péritonite au zymosan ont permis de démontrer que les macrophages M2 de la phase de résolution de l'inflammation présentent une fort niveau d'expression de la 12/15-LOX à la différence des macrophages M1 de la phase inflammatoire (Stables et al., 2011). Finalement, les données actuelles de la littérature indiquent de manière claire un rôle central de la 12/15-LOX et des médiateurs lipidiques produits par cette enzyme dans l'arrêt d'une réponse inflammatoire.

Les lipoxines exercent des effets anti-inflammatoires multiples sur différentes cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ces médiateurs lipidiques sont considérés comme les acteurs clés de la résolution d'une réaction inflammatoire. Alors que les lipoxines inhibent l'afflux des cellules inflammatoires en particulier des PNNs, ils induisent la transmigration des macrophages M2a, favorisant ainsi la phagocytose non-phlogistique des cellules apoptotiques (Godson et al., 2000; Maddox and Serhan, 1996; Serhan et al., 2008). Le rôle de la 12/15-LOX dans l'arrêt de la réponse inflammatoire n'est pas seulement dévolu aux lipoxines, il est aussi dû aux phospholipides oxydés produits par la 12/15-LOX. Ceux-ci contribuent à bloquer sélectivement la phagocytose des cellules apoptotiques par les monocytes, les macrophages inflammatoires et par les cellules présentatrices de l'antigène. L'inhibition de la captation de cellules apoptotiques par les cellules inflammatoires inhibe la production de médiateurs inflammatoires et la formation d'auto-antigènes par ces cellules. Parallèlement, les lipoxines produites par la 12/15-LOX favorisent l'efférocytose des cellules apoptotiques par les macrophages M2a exprimant des récepteurs scavenger. L'ensemble de ces effets favorisent la résolution de l'inflammation et contribuent à la tolérance immune (Uderhardt et al., 2012).

4.2.2 Synthèse des épi-lipoxines

Parallèlement à la formation des lipoxines par les voies des 5-LOX et 12/15-LOX dans les tissus ou des 5-LOX et 12-LOX dans les vaisseaux, des voies de synthèse distinctes existent. Elles produisent des analogues des lipoxines, les 15-épi-Lipoxines. Une des voies de production des 15-épi-Lipoxines implique COX-2 dans les cellules épithéliales ou endothéliales et la 5-LOX dans les leucocytes (Serhan, 2005).

Dans ce cas, COX-2 acétylée par l'aspirine, catalyse la formation, à partir de l'AA, de 15R-HETE qui par la suite sera converti par la 5-LOX des leucocytes en 15-épi-LXs. La formation de ces classes distinctes d'eicosanoïdes (épi-LXs et LXs) est strictement régulée. Il est nécessaire que l'expression de COX-2 soit induite et que cette enzyme soit acétylée par l'aspirine. Parallèlement l'activité de la 5-LOX doit être présente. Les épi-lipoxines et les lipoxines contribuent à la résolution de l'inflammation (Serhan, 2002).

L'aspirine (acide acétylsalicylique) inhibe par acétylation le site catalytique cyclooxygénase de COX-2 sans altérer le site peroxydase de l'enzyme (**Figure 36**). Inversement, l'aspirine inhibe à la fois l'activité cyclooxygénase et l'activité peroxydase de COX-1. Il en résulte l'inhibition de la production des prostanoïdes (produits par COX-1 et COX-2 à partir de l'AA) et la synthèse, à partir de l'AA, de 15R-HETE via COX-2-acétylée. L'acide 15R-HETE est ensuite métabolisé en 15-épi-LXs via la 5-LOX. L'acide 15R-HETE à l'origine des épi-LXs peut aussi être produit à partir de l'AA via des cytochromes P450 notamment CYP2C9 (Bylund et al., 1998). Il a aussi été montré que les statines initient la biosynthèse de la 15-épi-LXs lors de l'interaction *in vitro* des PNNs avec des cellules épithéliales et *in vivo* au cours de l'inflammation de la muqueuse des voies aériennes. Les statines (atorvastatine, lovastatine) favorisent la synthèse de 15-épi-LXA₄ via l'inhibition de l'époxide hydrolase soluble (Levy, 2006; Planaguma et al., 2010). Finalement, la connexion complexe entre toutes ces enzymes (COXs, LOXs, cytochrome P450 époxydases et hydroxylases) contrôle l'oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 comme l'AA et n-3 comme l'EPA et le DHA et ainsi génère successivement des lipides bioactifs pro-inflammatoires puis anti-inflammatoires. Parmi ces derniers ceux générés à partir de l'AA, (Lipoxines, acides époxyeicosatriénoïques, épi-lipoxines) ou générés à partir de l'EPA (Resolvin E1) ou du DHA (Resolvin D1, RvD2, RvD5, Maresin 1, protectins) jouent des rôles clés dans l'arrêt de l'inflammation (Buckley et al., 2014; Serhan et al., 2014; Serhan and Petasis, 2011) et la réparation tissulaire (Biteman et al., 2007; Gronert, 2005).

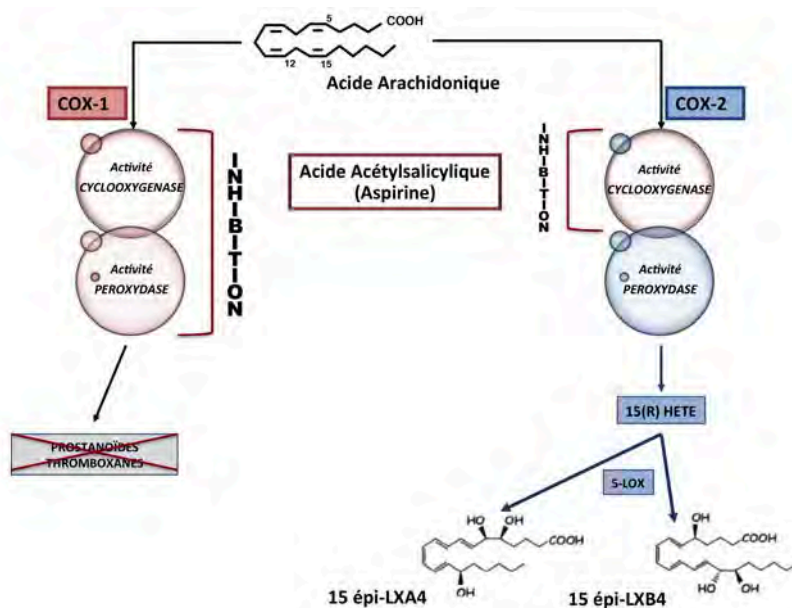


Figure 36 : Aspirine et métabolisme de l'AA

4.2.3 Mécanisme de résolution de l'inflammation par les lipoxines et les épi-lipoxines

La LXA₄ et la 15-épi-LXA₄ interagissent avec le récepteur ALX aussi appelé ALX/FPR2 (lipoxin A₄ receptor ou formyl peptide receptor 2) (Serhan, 2005). Ce récepteur couplé aux G protéines est largement exprimé dans plusieurs types de cellules humaines et de rongeurs, plus particulièrement des cellules impliquées dans l'inflammation et qui jouent un rôle dans la défense de l'hôte (par exemples, monocytes, macrophages, PNNs, cellules épithéliales). La régulation transcriptionnelle de l'expression de ce récepteur est encore mal comprise. Cependant plusieurs études ont permis de montrer que des cytokines aussi différentes que l'IFN- γ et l'IL-4 et l'IL-13 peuvent induire l'expression de ce récepteur.

Ce récepteur a la propriété de reconnaître deux types de ligands, des ligands protéiques (par exemple le fMLP, Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine) et des ligands lipidiques (LXA₄). Ainsi, il est capable d'intégrer des signaux opposés pour déterminer le cours de l'inflammation et déclencher des réponses biologiques adaptées (Chiang et al., 2006; Ye et al., 2009).

Les trois récepteurs FPRs (FPR1, FPR2/ALX, FPR3) partagent un certain nombre d'homologies de séquence (Chiang et al., 2006). Ces récepteurs ont été identifiés initialement à partir de leurs propriétés à reconnaître les peptides N-formylés libérés des bactéries et des mitochondries à la suite de lésions cellulaires. FPR2/ALX transmet les signaux inflammatoires suscités par la protéine amyloïde A sérique (SAA), les peptides antimicrobiens de la famille des cathélicidines (par exemple LL37) et les signaux de résolution de l'inflammation de LXA₄ et de l'annexine A1 (AnxA1). Sous l'effet de ligands (AnxA1, LXA₄), FPR2/ALX forme des homo-dimères qui contrôlent la production d'IL-10 via p38 MAP Kinase (Cooray et al., 2013). LXA₄ via la dimérisation FPR1-FPR2/ALX et dans une moindre efficacité à travers les monomères FPR2/ALX, active la voie JNK / caspase-3, qui conduit à l'apoptose des PNNs l'un des points de contrôle essentiel à la résolution de l'inflammation. L'activation de cette voie l'emporte sur l'action suppressive de la SAA et de LL-37. Les voies de signalisation du récepteur FPR2/ALX déclenchées par LL37 et SAA bloquent la résolution de l'inflammation en générant un signal de survie et en supprimant le programme de mort, favorisant ainsi la survie des PNNs. Par opposition, les glucocorticoïdes qui régulent la synthèse d'annexine 1 accélèrent l'apoptose. Finalement, les lipoxines et les épi-lipoxines antagonisent le signal anti-apoptique de SAA et redirigent

les PNNs vers l'apoptose, raccourcissant leur durée de vie (Figure 37).

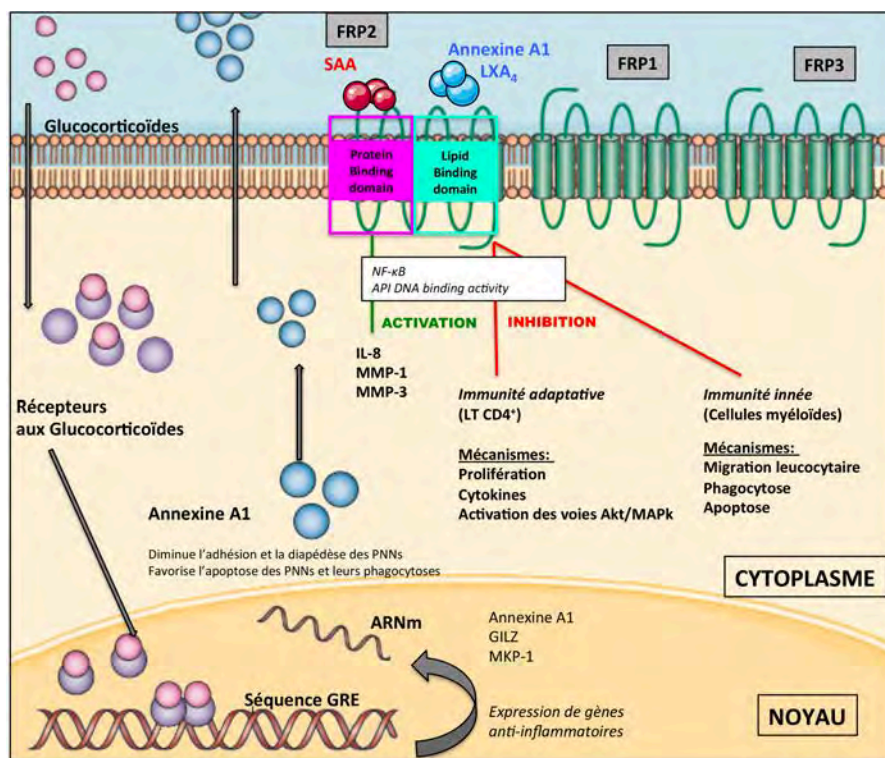


Figure 37 : Récepteurs aux lipoxines : mécanismes d'activation de FRP2.

Les macrophages M2 jouent un rôle clé dans le retour à l'homéostasie, la cicatrisation et la régénération tissulaire (Ariel and Serhan, 2012; Ingersoll et al., 2011; Zhang and Spite, 2012). Plusieurs sous-types de macrophages M2 qui contribuent à la phase de résolution de l'inflammation ont été identifiés dans les infiltrats inflammatoires lors de la phase de résolution de l'inflammation (Ariel and Serhan, 2012; Stables et al., 2011). Finalement, il apparaît que l'orientation du macrophage à exprimer un phénotype impliqué dans la résolution de l'inflammation plutôt qu'un phénotype délétère est un processus complexe. Il implique dans une situation physiopathologique définie une multitude des signaux, parmi lesquels les médiateurs lipidiques provenant de la 15-LOX-1 humaine ou de la 12/15-LOX murine (lipoxines, résolvines, protectines, marésines) jouent un rôle essentiel (Schif-Zuck et al., 2011; Serhan et al., 2014; Titos et al., 2011). Ainsi, chez les souris dont le gène codant pour la 12/15-LOX (*ALOX12/15*) est invalidé, le défaut de production de médiateurs lipidiques de résolution de l'inflammation est associé à une inflammation exacerbée (Serhan et al., 2014).

Finalement, bien que la résolution de l'inflammation soit une composante importante de la cicatrisation des plaies, le rôle des médiateurs lipidiques impliqués dans la résolution de l'inflammation (lipoxines, résolvines, protectines), dans la cicatrisation et la réparation tissulaire reste peu documenté. Dans ce domaine, les données les plus claires concernent le rôle de l'axe 12/15-LOX /LX₄ dans la stimulation de la cicatrisation de la cornée suite à une lésion (Biteman et al., 2007; Gronert et al., 2005; Kakazu et al., 2012; Wang et al., 2012). L'ensemble de ces données montre que LX₄ joue un rôle fondamental dans le maintien d'un environnement oculaire qui limite activement l'inflammation, tout en favorisant la cicatrisation des lésions. Récemment, Hong *et al* (Hong et al., 2014b) ont établi qu'au cours d'une blessure, les macrophages produisent au niveau de la peau des médiateurs lipidiques favorisant la résolution de l'inflammation. Ce processus est perturbé chez des souris diabétiques en relation avec

leur défaut de cicatrisation. Parallèlement, ces auteurs ont établi que le traitement des plaies d'animaux diabétiques avec la neuroprotectine/protectine D1 accélère la ré-épithélialisation et la formation du tissu de granulation en favorisant les fonctions des macrophages qui accélèrent ce processus.

4.2.4 *Aspirine et cicatrisation*

Si le rôle des épi-lipoxines et des résolvines résultant de l'acétylation de COX-2 par l'aspirine est bien documenté pour la résolution de l'inflammation, il n'en est pas de même vis-à-vis du processus cicatriciel. Outre les effets de l'aspirine sur la muqueuse digestive (Wallace, 2005), peu d'études ont exploré l'effet de l'aspirine sur la cicatrisation des plaies cutanées. Une étude récente (dos Santos and Monte-Alto-Costa, 2013) montre que l'aspirine administrée par voie péritonéale à forte dose (25mg/kg de poids corporel/jour) ralentit la vitesse de cicatrisation 7 jours après la lésion seulement chez les souris femelles. Cet effet serait corrélé à une réduction de la production d'œstrogènes. Toutefois, cet effet ne persiste pas dans le temps. Des retards de cicatrisation induits par l'aspirine avaient déjà été évoqués (Lee, 1968; Lee and Tong, 1969). Inversement, l'administration quotidienne de 300 mg d'aspirine réduit le temps de cicatrisation des ulcères des membres inférieurs chez des patients avec une insuffisance veineuse chronique (IVC) (del Rio Sola et al., 2012).

L'aspirine en fonction de la dose utilisée présente des effets plus ou moins importants sur l'agrégation plaquettaire (inhibition de l'activité cyclooxygénase de COX-1 et COX-2) et sur la production de lipoxines et de résolvines via l'activité peroxydase de COX-2. A faible dose (0,75mg à 300mg) l'effet antiagrégant plaquettaire est limité. L'utilisation de faibles doses est préconisée pour leurs effets cardio-protecteurs dans le cadre de la prévention d'une thrombose et en prévention secondaire dans le cas d'un infarctus du myocarde (Cooper et al., 2004). D'autres résultats tendent à démontrer une action anti-cancéreuse de l'aspirine, notamment pour le cancer colorectal. Toutefois, ces données font débats (Fink et al., 2014).

L'objectif de notre travail de recherche était d'établir si l'aspirine qui à faible dose, module la production de lipoxines et de résolvines via l'acétylation de COX-2 pourrait favoriser la résolution de l'inflammation chez des animaux diabétiques et ainsi accélérer le processus cicatriciel. Pour bien maîtriser les effets secondaires de l'aspirine, nous avons choisi de réaliser le traitement directement dans le lit de la plaie. Pour réaliser cela nous avons mis en place une nouvelle stratégie expérimentale qui est décrite dans partie expérimentale de ce mémoire. Le traitement par voie topique permet la diffusion rapide de l'acide acétylsalicylique au niveau cutané et permet de s'affranchir de ces effets néfastes dus à l'inhibition de la production des PGs (Keimowitz et al., 1993).

PARTIE 2
TRAVAUX DE RECHERCHE

1. Etat de l'art

Afin de faciliter la compréhension des processus régissant la cicatrisation de nombreux modèles expérimentaux ont été développés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Tous possèdent leurs avantages mais également leurs inconvénients du fait de leur spécificité.

Le modèle de fibroblastes ou de kératinocytes en culture monocouche (Lampugnani, 1999) est largement employé dans l'étude des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules isolées issues de culture primaire de peau. La « blessure » de cette monocouche crée une zone acellulaire (Soderholm and Heald, 2005) (**Figure 38**) et la vitesse à laquelle ces dernières se retrouvent de nouveau à confluence permet de déterminer par exemple si un actif pharmacologique a un effet positif ou négatif sur la cicatrisation (Yarrow et al., 2004).

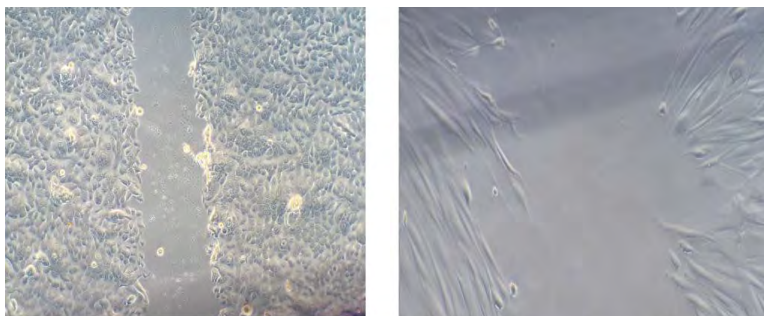


Figure 38. : « Blessure d'une monocouche de kératinocytes et de fibroblastes. (BioExigence, 2014a)

Dès 1979, on assiste au développement de matrices plus complexes (Bell et al., 1979), associant des gels de collagène aux fibroblastes. La répartition cellulaire non plus en monocouche mais en culture tridimensionnelle provoque spontanément une rétraction du gel de collagène, dénommée « lattice de collagène ». On en distingue plusieurs types (**Figure 39**) : La lattice de collagène à rétraction libre (Ehrlich and Rajaratnam, 1990; Rompre et al., 1990). La lattice de collagène sous contrainte : un anneau (le plus souvent en nylon) déposé au fond de la boîte empêche la rétraction sur la longueur du complexe fibroblaste collagène mais pas en épaisseur (Chapuis and Agache, 1992). Un dispositif permet de quantifier cette force de rétraction ou force isométrique. Il est à noter qu'à la place du collagène une solution de fibrine (Grassl et al., 2002) composée de fibrinogène issu du plasma humain et supplémentée en thrombine peut être utilisée. Ce type de matrice mime plus fidèlement les événements que l'on retrouve dans la formation du tissu de granulation.

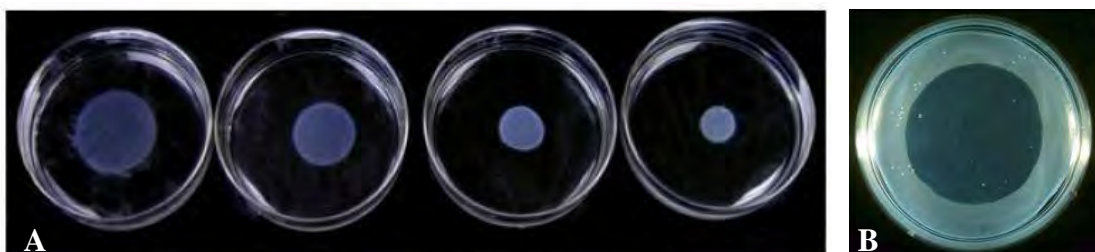


Figure 39 : Lattices de collagène. a) à rétraction libre. Le mélange de collagène/fibroblaste est déposé dans une boîte contenant du milieu nutritif. Progressivement, suite au déplacement des fibroblastes dans la matrice de collagène, les fibrilles de collagène se rapprochent et provoquent une rétraction du complexe. Progressivement la surface collagène/fibroblastes diminue et on obtient un tissu relâché (BioExigence, 2014b). b) sous contrainte. La rétraction est inhibée mécaniquement par la présence d'un anneau de nylon. Les fibrilles de collagènes sont alors piégées dans les mailles du nylon (BioExigence, 2014c).

Ces modèles *in vitro*, bien que de plus en plus élaborés, ne parviennent qu'à s'approcher des conditions physiologiques rencontrées chez le vivant. Les processus de cicatrisation dépendent de nombreuses synergies et d'antagonismes qui ne peuvent pas être reproduits fidèlement avec un modèle de culture cellulaire en monocouche ou des modèles de culture associant plusieurs types cellulaires.

Ainsi, les modèles animaux de cicatrisation sont d'importants outils biologiques afin de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires régissant le processus cicatriciel. Parmi les nombreux modèles animaux, le tissu cutané du cochon est celui qui a la plus forte analogie avec la peau humaine. Toutefois, par manque d'outils, ce modèle ne permet pas de reproduire et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent le processus cicatriciel chez des sujets diabétiques. Malgré ses limites, le modèle murin était le mieux adapté à notre objectif qui était de définir l'impact de la résolution de l'inflammation dans la dérégulation de la cicatrisation au cours du diabète de type 2.

Différents types de modèles de lésions cutanées chez la souris existent.

Le modèle incisionnel qui consiste en une incision franche, le plus souvent linéaire, calibrée en profondeur et généralement réalisée à l'aide d'un scalpel. L'intégrité des tissus en périphérie est préservée et la cicatrisation est très rapide (technique principalement utilisée dans l'étude des phénomènes de rétraction, que pour l'étude histologique poussée). Cette technique est peu informative dans le cas du défaut de cicatrisation chez l'animal diabétique.

Le modèle excisionnel qui est une exérèse calibrée (profondeur et étendue) du tissu cutané. Dû au volume important retiré, ce type de lésion met plus de temps à cicatriser et permet l'étude des différents stades de la cicatrisation, en particulier dans un contexte de diabète de type 2.

- L'excision superficielle de l'épiderme à l'aide d'un adhésif « Stripping » convient parfaitement à l'étude de la phase de réépithélialisation. La pression négative peut être également utilisée afin de décoller la partie superficielle de l'épiderme du derme (Levy et al., 1995) pour former une cavité semblable à celle qui apparaît lors de la formation d'une ampoule.
- L'excision partielle, consiste à retirer de manière parallèle à la surface de la peau une partie définie du derme (superficiel ou moyen). Cependant, en raison de la faible épaisseur de l'épiderme (50 µm) et du derme chez la souris (moins de 1mm) ce modèle est très peu utilisé chez cet animal. En revanche, il constitue un outil idéal pour l'étude de la réépithélialisation chez l'Homme et permet d'évaluer l'efficacité sur la cicatrisation de pansements ou d'actifs.
- L'excision profonde obtenue par exérèse totale du tissu cutané (comprenant l'épiderme, le derme et l'hypoderme) permet l'étude de l'ensemble des phénomènes liés à la cicatrisation. La plaie est obtenue généralement via l'emploi d'un biopsy punch (ou de ciseau) et laisse le plus souvent le fascia musculaire découvert (Zhou et al., 2000). **C'est ce type de plaie que nous avons choisi pour notre étude.**

Traditionnellement, les plaies sont recouvertes d'un pansement ou d'une compresse afin d'empêcher une contamination par des agents infectieux présents dans l'environnement. Cependant, ces systèmes ne permettent pas d'analyser les exsudats et de visualiser la cicatrisation en temps réel. Ils servent plutôt de systèmes de protection. Dans les conditions pathologiques où l'exsudation est abondante, le pansement doit donc être changé régulièrement pour éviter la macération et induire un retard dans la mise en place des processus cicatriciels (Gray and Weir, 2007; Voegeli, 2012). Cette procédure de changement implique un risque supplémentaire de contamination de la plaie, qui se retrouve ainsi momentanément exposée à l'air libre. L'adhésion des pansements (aussi faible soit-

elle) peut également provoquer de nouvelles lésions au niveau de la plaie lors de leur retrait. Ces nouvelles agressions engendrent un prolongement de l'inflammation et modifie de façon substantielle la cinétique de cicatrisation.

Afin de permettre le prélèvement et l'analyse des composants cellulaires et des médiateurs présents dans l'exsudat au cours de la phase inflammatoire du processus cicatriciel, différents dispositifs ont été utilisés depuis les années 1970 (Papenfuss et al., 1979). La plupart ont été fixés par implantation sous le derme des souris. Ces chambres de cicatrisation sont utilisées pour suivre macroscopiquement l'évolution du processus cicatriciel (**Figure 40**). La plupart des évolutions réalisées dans ce domaine portent sur les moyens de visualisation des plaies (Breuing et al., 1992; Palmer et al., 2011; Steintraesser et al., 2010; Steintraesser et al., 2006). De par leur conception et leur moyen de fixation invasive au niveau de la plaie, ces chambres de cicatrisation ne correspondaient pas à nos attentes. Ainsi, nous avons développé notre propre dispositif expérimental.

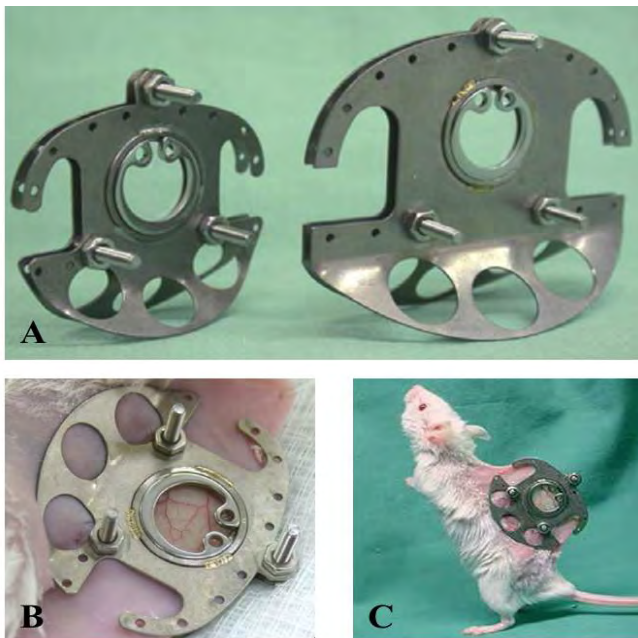


Figure 40 : Exemple de chambre implantable. Adaptée de (Laschke et al., 2011). **a)** La chambre en titane se compose de 2 parties symétriques venant prendre en « sandwich » la peau de la partie dorsale de l'animal. La partie supérieure se compose de trou permettant sa fixation sur le tissu cutané à l'aide de points de suture. **b)** Les 2 parties du dispositif sont rapprochés et permettent la compression de la peau. Les couches cutanées souhaitées sont alors retirées. **c)** La conformation de la chambre permet à l'animal de tolérer le dispositif sans nuire à ses déplacements ni à ses prises alimentaires.

2. Dispositif non-invasif, destiné à recueillir les exsudats d'une plaie son utilisation et kit comprenant ledit dispositif (ANNEXE 1 : FR 2984 722)

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les chambres de cicatrisation utilisées par la plupart des études sont implantés sous la peau et sont soit maintenues par des points de sutures ou bien sont fixées directement sur l'os (Adams et al., 2011). Ces méthodes invasives nécessitent un acte chirurgical complexe pour l'implantation et le retrait du dispositif. Elles ont comme inconvénients majeurs d'accroître la douleur de l'animal et de perturber le processus cicatriciel en modifiant les réactions inflammatoires. Toutefois, ces chambres évitent la rétractation de la plaie qui, à la différence de la cicatrisation chez l'Homme, est une des caractéristiques de la cicatrisation des plaies cutanées chez la souris.

Il existait donc un réel besoin de créer un dispositif original prenant en compte un certain nombre de caractéristiques. Ce dispositif devait :

- être non-invasif, étanche et conformable.
- permettre de visualiser la progression de la cicatrisation (sans être nécessairement obligé d'ouvrir ledit dispositif, ni de le retirer) : un suivi visuel, voire olfactif et des paramètres physico-chimiques comme l'aspect de la plaie (couleur, texture, profondeur, superficie) et/ou l'aspect de l'exsudat (couleur, odeur, limpidité, viscosité).
- assurer la protection de l'environnement intérieur du dispositif et donc la protection de la plaie, vis à vis de l'environnement extérieur (agents infectieux extérieurs, mais aussi de l'animal lui-même, ou de ses congénères).
- permettre de recueillir directement et passivement les exsudats et les cellules infiltrées afin de suivre l'évolution journalière de la plaie.
- permettre le recueil stérile de l'exsudat afin de déterminer leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules infiltrées.
- faciliter le traitement pharmacologique de la plaie plusieurs fois par jour sans anesthésier l'animal.

La mise au point et la réalisation d'un tel dispositif a débouché sur **le dépôt et la publication de 2 brevets (Dardenne et al., 2013a; Dardenne et al., 2013b)**.

Le premier brevet porte sur la conception de la chambre de cicatrisation elle-même (Dardenne et al., 2013b). La plaie est protégée par un dispositif original de nature inerte via sa conception en nylon et/ou en polyéthylène de basse densité biocompatibles. Ce dispositif se compose d'un cylindre constitué de parois latérales parallèles et ouvert des deux côtés. La partie inférieure du cylindre présente une collerette extérieure permettant la fixation du dit cylindre sur le dos de l'animal de manière à entourer la plaie. Le cylindre ainsi positionné sur l'animal constitue une chambre protégeant la plaie et permet le recueil de l'exsudat inflammatoire produit après la réalisation de la lésion cutanée.

Le second brevet porte sur la méthode d'utilisation dudit dispositif (Dardenne et al., 2013a). Une fois positionné sur la peau autour de la plaie par son interface adhésive, le moyen de fermeture du dispositif est replacé. L'extrémité supérieure de cette chambre est fermée par un bouchon protégeant la plaie de l'environnement extérieur sans supprimer les échanges gazeux grâce à la présence d'une membrane perméable aux gaz. Ce filtre permet d'éviter l'hypoxie et/ou l'anoxie et les contaminations extérieures. Ce bouchon à emboîtement extérieur est en polyéthylène de basse densité transparent et est fixé sur le dispositif de manière à maintenir le bouchon sur la partie cylindrique de la chambre et de faciliter son retrait.

L'ensemble des pièces composant ce dispositif est actuellement réalisé par la technologie de l'impression 3D (**Figure 41**) qui nous permet la réalisation de pièces parfaitement adaptées à tout type de morphologie (modèles murins obèses/diabétiques ou non diabétiques de morphologie normale). L'adhésion du dispositif sur la peau de l'animal est assurée par diverses technologies notamment à l'aide d'une solution de nitrocellulose dans un mélange d'éther et d'alcool (Collodion) ou d'adhésifs (colles chirurgicales à base de silicone biocompatibles). Les substances adhésives sont déposées sur la collerette thermo-imprimée de la chambre. Pour favoriser l'adhésion, cette collerette est souple et adaptée à la morphologie de la souris. Le dispositif est positionné au-dessus de la plaie de manière à la circonscrire.

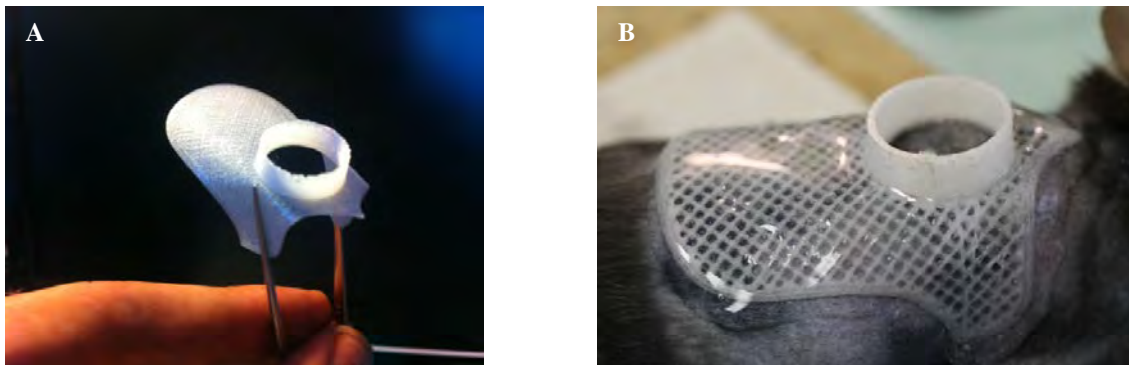


Figure 41 : Chambre de cicatrisation. a) Chambre de cicatrisation en nylon, préalablement thermoformée, afin d'épouser parfaitement le dos de l'animal b) Dispositif fixé à l'aide de colle chirurgicale. Le maillage permet une meilleure prise de l'adhésif et confère un ancrage optimal.

Notre chambre de cicatrisation, possède de nombreux avantages par rapport aux solutions existantes dans la littérature.

- Dispositif implantable ne nécessitant **pas son changement journalier** : La surface en contact de la peau est non absorbante. Il n'y a donc pas de problème de saturation d'absorption comme cela pourrait être le cas avec un pansement.
- Dispositif **ne rentrant pas en contact direct avec la partie lésée** du patient : Implantation au niveau du pourtour des berges de la plaie par fixation sur la partie saine du patient. Fixation par enduit collant et de ce fait non invasif (pas de points de fixation, ni implantation en sous-cutanée).
- **Étanchéité** garantissant un milieu protégé : Conserve l'exsudat dans la chambre cylindrique, pas de fuite au niveau des bords du dispositif. Possibilité de stérilisation du produit.
- **Accès aisé au site de la lésion** permettant la visualisation directe de la plaie et le suivi de l'évolution de la plaie : Bouchon pouvant être vissé/dévisé à volonté. La surface de la chambre cylindrique et du bouchon est en matériaux transparent permettant de suivre l'évolution de la cicatrisation et de toutes infections ou surinfections qui pourraient survenir. De plus, le bouchon se retirant facilement, il y a possibilité de prendre des photos de l'avancement de la cicatrisation sans avoir à retirer l'ensemble du dispositif.
- **Échanges gazeux préservés** : La partie supérieure du bouchon (filtre) permet les échanges gazeux entre l'environnement extérieur et la plaie, favorisant ainsi la cicatrisation et évitant tout risque de macération.
- **Lavage de la plaie** : Du liquide de lavage peut être injecté dans la chambre afin de nettoyer la plaie. Diminue les manipulations sur le site de la plaie grâce notamment à l'emploi d'un septum sur le

bouchon garantissant d'une part des manipulations stériles et surtout évite de retirer le dispositif à chaque lavage.

- **Possibilité d'administration** d'agents pharmacologiques. L'étanchéité du dispositif, permet le traitement direct de la plaie tout en évitant tout risque d'écoulement à l'extérieur du dispositif.
- **Récupération *in situ* de l'exsudat** : L'exsudat peut être collecté dans la chambre par lavage ou directement par prélèvement « *in situ* ». Il permet la récupération des facteurs et autres métabolites produits mais surtout de cellules vivantes et fonctionnelles. Il offre la possibilité de mettre en culture les cellules de l'exsudat pour réaliser des études fonctionnelles et phénotypiques. Le volume d'exsudat produit par la plaie peut être mesuré, ainsi que ses paramètres physicochimiques (pH, couleur, odeur, limpidité, viscosité).

3. Méthode d'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie à des niveaux microscopiques et macroscopiques (ANNEXE 2 : FR 2984 719)

A la différence des dispositifs qui permettent le prélèvement par dépression de l'exsudat contenu dans une mousse disposée sur la plaie et maintenu par le dispositif (TPN), notre système permet le recueil par aspiration *in situ* de la totalité de l'exsudat. Un tel recueil préserve les qualités morphologiques et fonctionnelles des cellules de l'exsudat. L'analyse des médiateurs (cytokines et médiateurs lipidiques pro- ou anti-inflammatoires, facteurs de croissance) au niveau de l'exsudat doit permettre de suivre l'évolution de la phase inflammatoire de la cicatrisation et sa résolution. Notre dispositif qui a pour avantage de préserver l'intégrité et les fonctionnalités des différentes populations cellulaires contenues dans l'exsudat permet d'avoir une vraie « image » de la plaie et de son environnement à un temps donné. L'implantation du dispositif n'étant pas invasive, il est possible de réaliser une étude histologique permettant de comparer le tissu cicatriciel au tissu externe à la plaie. Cette étude complémentaire de l'étude de l'évolution de la fermeture de la plaie par analyse d'images doit permettre d'apporter des informations quant à la qualité du tissu cicatriciel.

Finalement, ce dispositif étanche aux liquides mais perméable aux gaz permet de faciliter le nombre et la nature des traitements journaliers appliqués directement sur la plaie. Il permet l'administration de solutions à travers un septum directement sur la plaie. Ces solutions salines peuvent contenir des agents antimicrobiens, de nouveaux principes actifs pouvant agir sur la vitesse de cicatrisation. L'avantage majeur de ce dispositif est de permettre de tester des formes galéniques particulières directement administrées sur la plaie ou diffusées par un pansement maintenu sur la plaie par notre dispositif. Ce dispositif nous a permis d'évaluer l'effet de l'acide acétylsalicylique appliqué en solution saline sur la plaie (brevet FR 2999 936).

4. Aspirin topic treatment improves cutaneous wound healing in diabetic mice through lipoxygenase-dependent production of pro-resolving lipid mediator

Christophe Dardenne ^{1,2}, Lise Lefèvre ^{1,2}, Meunier Etienne ³, Mohamad Ala eddine ^{1,2}, José Bernad ^{1,2}, Agnès Coste ^{1,2}, Bernard Pipy ^{1,2}

¹ Université de Toulouse, UPS, UMR 152 (PHARMA-DEV), Toulouse 31432, France

² IRD, UMR 152, Toulouse 31432, France

³ Focal Area Infection Biology, Biozentrum, University of Basel, CH-4056 Basel, Switzerland.

4.1. Abstract

Impaired wound healing is an important diabetic complication that represents one of the leading causes of morbidity and mortality in diabetic patients. Multiple lines of evidence demonstrate that chronic unresolved inflammation is a critical underlying feature of altered wound healing in diabetic patients.

In this study, we determined the cellular and molecular mechanisms involved in the control of switch between the inflammatory process and the resolution phase in high-fat diet (HFD) diabetic mice induced by topic aspirin treatment. We have shown that macrophages isolated from wounds of diabetic mice have a significant, impaired apoptotic cells clearance. This decreased efferocytosis was associated with significantly higher burden of apoptotic cells in exudate and wound tissue, as well as a higher expression of pro-inflammatory leukotriene (LT)B₄, and lower expression of pro-resolving lipoxin (LX)A₄. These results are correlated with a strong neutrophil inflammation and M1 macrophages infiltration in wound exudate from HFD diabetic mice.

Interestingly, the topical daily application of aspirin (30 mg/day from day 3 until day 14 post-wounding) accelerated the wound healing of full-thickness excision cutaneous wounds in HFD diabetic mice. This topic treatment decreased inflammatory cell recruitment, promoted macrophages infiltration and restored their efferocytosis activity through the up-regulation of CD36. Aspirin treatment modified the balance between pro- and anti-inflammatory lipid mediators by promoting the synthesis of pro-resolving LXA₄. Furthermore, topic aspirin treatment induced the inhibition of LTA₄ hydrolase expression associated with an overexpression of 12/15-LOX. The use of mice models in which genes encoding 5-LOX or 12/15-LOX enzymes have been invalidated, we allowed us to confirm that these enzymes, involved in the synthesis of resolving mediators, were essentials to the beneficial effect of aspirin on wound healing in diabetic mice.

In conclusion, this study presents first evidence that aspirin improves the rate of wound healing in skin wounds from diabetic mice through the production of pro-resolving lipid mediators. Thus, this pharmacological approach promotes a new mechanism of resolution of inflammation in diabetic wound and allows us to envisage the development of new therapeutic strategy to promote the acceleration of diabetic wound healing.

4.2. Introduction

Diabetes is one of the most common diseases in the world that affect more than 350 million people worldwide. This pathology is characterized by metabolic deregulations, and more particularly, by healing disorders. Among diabetic complications, diabetic people are more susceptible to the development of non-healing wounds such as diabetic foot ulcers (Brem and Tomic-Canic, 2007; Falanga, 2005; Jeffcoate and Harding, 2003).

The skin repair process represents a well-orchestrated cascade of biological events, which involves three interdependent overlapping phases: inflammation, granulation tissue formation and fibroplasia, and finally matrix deposition and remodeling (Aarabi et al., 2007; Gurtner et al., 2008; Singer and Clark, 1999). It is now well established that wound inflammation is a main component of the wound healing process and is pivotal for tissue regeneration (Gourevitch et al., 2014; Koh and DiPietro, 2011; Mantovani et al., 2013). The inflammatory phase of wound healing may, be sub-divided in an early inflammatory response and in a resolution phase that is marked by the accumulation of apoptotic cells. During the early inflammatory phase, neutrophils and inflammatory macrophages accumulate in the injured tissue to phagocytize invading microorganisms and remove cellular and matrix debris. The phagocytosis of apoptotic cells known as efferocytosis (Vandivier et al., 2006) is the ultimate fate of apoptotic inflammatory cells at an injury site. Successful efferocytosis drives timely resolution of inflammation and defective clearance of apoptotic cells has been linked to persistent inflammatory process (Li et al., 2009; Maderna and Godson, 2003; Schwab et al., 2007; Serhan et al., 2009). In diabetic patients, this chronic inflammation is responsible of impaired wound healing (Al-Mulla et al., 2011; Bannon et al., 2013; Hong et al., 2014; Kampfer et al., 2005; Schurmann et al., 2014; Tian et al., 2011). It has been shown that macrophages isolated from wounds of diabetic mice presented significant deficiency in efferocytosis associated with higher expression of pro-inflammatory and lower expression of anti-inflammatory cytokines. These results were validated in the wound tissue of diabetic and non-diabetic patients (Khanna et al., 2010).

The wound Inflammation is triggered and stopped by a variety of mediators that are closely controlled in space and time (Oberyszyn, 2007; White and Mantovani, 2013). Besides, cytokines, proteases and reactive oxygen species (ROS), resident and invading cells in wound area promote the initiation of inflammation through the production of a variety of eicosanoids (Brem and Tomic-Canic, 2007; Kapoor et al., 2007). Among these mediators, arachidonic acid metabolites play a main role. Indeed, leukotriene B₄ (LTB₄) produced through cPLA₂, 5-lipoxygenase (5-LOX) and LTA₄ hydrolase (LTA₄h) activations was a strong chemotactic mediator for neutrophils and inflammatory macrophages during early inflammatory phase (Chou et al., 2010; Samuelsson, 1991). During this phase, the recruited macrophages were classically activated macrophages (M1). This phenotype express microbicidal and cytotoxic host defence functions by releasing high concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-12) and ROS (Mantovani et al., 2004; Sica and Mantovani, 2012). In contrast, resolution phase of inflammation requires macrophages mainly expressing M2 markers (CD206, arginase 1, Dectin-1, IL-10, scavenger receptors) with anti-inflammatory functions (Ferrante and Leibovich, 2012; Mantovani et al., 2013). Lipoxygenase-initiated lipid mediator pathways are important regulators of resolution phase of inflammation, since they can activate anti-inflammatory signals (Kuhn and O'Donnell, 2006; Serhan, 2007). The human and murine 12/15-LOX pathways are of particular interest, because they are key enzymes in the formation of a distinct class of eicosanoids, the lipoxins, which are generated during the resolution phase of inflammation via heterotypic cell-cell interactions. Lipoxin A₄ exhibits potent anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo* experimental animal models of acute or aberrant inflammation. LXA₄ inhibits PMN influx (Conte et al., 2010; Fierro et al., 2003),

triggers apoptosis (El Kebir et al., 2008) and induces M2 macrophages influx. These alternatively activated M2 macrophages, which highly express scavenger receptors such as CD36, were involved in efferocytosis of inflammatory apoptotic cells (Ferracini et al., 2013; Parks et al., 2013). In this regard, LXA₄ has been implicated as an important component of the endogenous regulatory signals that promote resolution of inflammation and wound healing (Biteman et al., 2007; Kakazu et al., 2012).

In addition to LOX-initiated lipoxin biosynthesis, an interesting novel route involving COX-2 was discovered. In the presence of aspirin, acetylated COX-2 loses its activity required to form prostaglandin (PG)_{H2} but maintains oxygenase activity to produce 15*R*-HETE from arachidonate (Lecomte et al., 1994; Rowlinson et al., 2000). This intermediate is metabolized via 5-LOX to generate 15-epi-lipoxins (Fierro et al., 2003). The 15-epi-lipoxins share the potent bioaction of lipoxins, suggesting that their formation could underlie the anti-inflammatory effect of aspirin that cannot be attributed only to the inhibition of prostanoid formation. Indeed, during the inflammatory process, concomitantly to COX-1 that is constitutively expressed in most tissues, COX-2 isoenzyme is rapidly induced and greatly contributes to prostanoid synthesis (Gilroy et al., 1999; Vane et al., 1998).

As the impaired of wound healing in diabetic context is caused by important dysregulations of the resolution phase of inflammation, we studied the mechanisms controlling the switch between inflammatory and resolution phases. We focused on the polarization of wound macrophages in type 2 diabetic mice and the synthesis of pro and anti-inflammatory AA metabolites from COX-2 and 5- and 12/15-LOX. In this study, we developed in mouse model of type II diabetes an excisional skin injury where a healing chamber was implanted. This model allowed us to investigate the effect of aspirin topical applications in wound healing of diabetic mice. **We demonstrated that Aspirin treatment improves cutaneous wound healing in type 2 diabetes mice through** the modulation of macrophage polarisation toward a M2 phenotype promoting the efferocytosis of apoptotic cells in injury. Moreover, the topical application of aspirin accelerates the repair of full-thickness excisional wounds in diabetic mice through the decrease of LTB₄ production correlated with an increase of LXA₄ through 12/15-LOX over-expression.

4.3. Experimental procedures

Mice

Eight-week-old Male C57BL/6J, BKS(D)-*Leprdb/jOrlRj* (*db/db*), BKS(D)-*Leprdb/jOrlRj* Control (*db/+*) and male *Alox5tm1Fun/J* (5-LOX KO), *12/15 Alox^{-/-}* were purchased from Janvier Laboratories (FRANCE). Animals were housed in a temperature-controlled animal facility (23°C) with a 12h light/dark cycle, and provided with the respective diet and water ad libitum. Mice were handled under protocols approved by the Conseil Scientifique du Centre de Formation et de Recherche Experimental Médico Chirurgical (CFREMC), with the rules of Decree 87–848 dated 10/19/1987 (modified by Decree 2001-464 and Decree 2001-131 relative to European Convention, EEC Directive 86/609 dated 24/11/1986). Animal experimental followed the guiding principles of animal care and the ethics board of the Midi-Pyrénées ethic committee for animal experimentation (experimentation permit number 31-067, approval number B3155503).

Induction of diabetes

One week after arrival, mice were randomly assigned for 16 week into two groups and were fed, either a High-Fat Diet (HFD) to induce the model of type two diabetes or received continuous feeding of a chow diet (NC). The caloric profile of fat, protein and carbohydrate on the HFD diet (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) was 60%, 20% and 20% respectively whereas 11%, 36%, and 53% for the normal chow diet (SSNIFF, GMGH, Deutschland). C57/BL6 and, for certain studies, *db/db* or *db/+* (used as controls) mice were also placed on regular diet Body weight was monitored weekly and thereafter daily throughout the duration of the study.

The diabetic state was confirmed by IPGGT (Intra-peritoneal glucose tolerance test) and IPIST (intra-peritoneal insulin sensitivity test) Briefly, for IPGGT test, NC-and HFD-fed mice were starved for eight hours and a solution of 20% glucose (1g per kg body weight) was administered by intra-peritoneal injection. Blood glucose levels were measured at different time points (0, 15, 30, 45, 90, 120 min). For IPIST, NC-and HFD-fed mice were starved for eight hours and insulin (0,5U per kg body weight) was administered by intra-peritoneal injection. Blood glucose levels were measured at different time points (0, 15, 30, 45, 90 min).

Skin chamber

Each wound skin chamber is composed of 2 distinct parts created from 3D printing technology in bio-compatible materials.

The first part is a 500 µl capacity tubular chamber, open at both ends with an outgrowth at the base for attachment on the device to the wounded body part. This flange has the peculiarity to be structured through a parametric mesh filling, a thickness of 200 microns and only 30% of density which provides the best conformability imaginable. With functional specifications and an original design taking into account of the animal morphology; this part fits perfectly on the back of non- or diabetic mice. So, this chamber was made in Nylon 618 and fixed with a bio-compatible Silicon Glue (Kwik-Sil, World Precision Instrument, USA) to obtain a perfectly sealed around the wound.

The second part is a cap in Acrylonitril butadiene styrene (ABS) taking place on the top of the tubular chamber to maintain the wound environment sterile. To avoid a damaging maceration on the wound bed, the upper part is provided with a porous membrane allowing gas exchange.

Excisional wound model

Mice were anesthetized with 2-5% isoflurane in oxygen for induction and 1%-2.5% in oxygen for maintenance. The hair back of each mouse was sheared and subsequently wiped with 70% ethanol. Full-thickness wounds (0.8 cm of diameter) were created on the back of the mice to the *panniculus carnosus*. The skin chamber was fixed on the wound edges without contact with the injured tissue using a bio-compatible silicon glue (Kwik-Sil, World Precision Instrument, USA).

Depending on the protocols put in place, wound were treated by daily topical application: 200µl of Sodium Chloride (NaCl), (BAXTER, USA) used as vehicle solution, 0.036 mg of aspirin(Sigma), 140ng of LTA₄ (Cayman Chemical), or 10 ng of LPS (Sigma). All active ingredients are dissolved into the vehicle solution.

All cages were changed twice weekly and all manipulations of animals were done in a laminar flow hood, under aseptic conditions.

Image quantification

Process of wound healing was observed from days 0 to 21 after wounding. Between 3–5 high powered images standardized digital photos were taken of the wounds, with the same distance, between camera and anesthetized mice, for each animal.

The pictures were examined using a planimetry for objective evaluation for degree of wound healing. Open wounds were calculated using an area analysis image software (Adobe Photoshop CS4). The number of pixels covering an open wound area on a given day was divided by the number of pixels spreading over the initial wound on day 0 to obtain the percentage of closure. The external surface of the skin chamber has been used as a template.

The percentage of wound healing was based on changes in the same wound on the same mouse for indicated time points, instead of changes among different mice. Thus, the calculated mean for the wound healing (percentage) among the 3 mice in a group was independently obtained, and the statistics of 3 groups of 3 independent experiments were calculated.

In-vitro efferocytosis quantification

200 000 murine peritoneal macrophages cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) provided by Gibco (Gibco, Saint Aubin, France) during 24h, with or without 1mM of Aspirin. 800 000 apoptotic polynuclear neutrophils in 100 µl of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS ^{+/+}) (Gibco, Saint Aubin, France) and 30 µl of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol) were added (100 µM).

After 60 min, the medium was removed, cells were twice washed with Phosphate Buffered Saline solution (PBS ^{-/-}, Gibco, Saint Aubin, France) and 2 congelation/ decongelation cycles was made.

50µl of H₂O₂ (0,1 M) was finally injected and MPO activity was measured by chemiluminescence using a thermostatically (37°C) controlled luminometer (Wallac 1420 Victor2).

Flow cytometry assay

400 µl of PBS was used to wash the wound site and the recuperated exudate solution was centrifuged. Exudate cells were washed in PBS 1% SVF and were incubated for 15 minutes with fluorescent-labeled antibodies: Ly6G-APC (BD Biosciences), 7/4-FITC (Serotec), F4/80-APC (BD Biosciences), CD36 (SANTACRUZ). Then cells were washed two times with staining buffer and stored at 4°C. Supernatant was preserved at -80 °C for subsequent cytokines analyses.

For efferocytosis, exudate cells were washed in PBS containing 1% SVF and were labeled with PE-conjugated anti-mouse F4/80 antibody (ABD SEROTEC). Subsequently, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm reagent (BD Bioscience) for 25 min, at 4°C in obscurity and washed twice with perm/wash solution. The cells were then incubated for intracellular staining with APC-conjugated anti- mouse Ly6G antibody (BD PHARMINGEN, 560599) for 25 minutes at 4°C. Finally exudate cells were washed with perm/wash solution and acquired by a FACScalibur cytometer (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA) using Cell Quest Pro software. A total of 10,000 events were collected for each sample. For analysis, all quadrants were set up, according to matched isotype control antibodies. All results are reported as percentages of expression.

Quantitative real-time PCR experiments

Total RNA obtained from wound tissue was prepared with RNeasy® Mini Kit columns (Qiagen) using the manufacturer's protocols. Synthesis of cDNA was performed from 650 ng of total RNA with QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations and primed with hexamers. Quantitative real-time PCR was performed on a LightCycler system (Roche Diagnostics) using QuantiFast™ SYBR® Green PCR (Qiagen). 10 µl of reaction mixture was incubated; the amplifications were performed for 60 cycles (10 s at 95°C and 60 s at 60°C). The primers (at a final concentration of 10 mM) were designed with the software Primer 3. *GAPDH* and *Actine* mRNA was used as invariant controls.

Acid Arachidonic metabolism study

Tissues lipids were crushed and homogenized in Lysing-matrix tubes containing 15% methanol. Exsudat was collected and centrifugated at 2 000 rpm during 5 min. Supernageant was transferred and completed with 15% of methanol. Sample were concentrated and purified by Solid Phase Extraction (SPE). Briefly, C18 Sep-Pak® Light column (Waters) were conditioned by 2 washing of methanol followed by deionized water. Sample were passed through the SPE column and then washed with deionized water followed by Hexane. Lipids were eluated by methyl formate and evaporated with a stream of nitrogen gaz. Residues were dissolved in the extraction buffer provided with the commercial EIA kit. The concentrations of LXA₄, 15-epi-LXA₄, LTB₄ in the wounded skin tissue were measured by ELISA (Oxford Research, Cayman Chemical) according to the instructions of the manufacturer.

Statistical analysis

Datas were expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using the means multiple comparison method of Bonferroni-Dunnet test. P<0.05 was considered statistically significant.

4.4. Results

Aspirin treatment improves cutaneous wound healing in type 2 diabetes mice.

To determine whether topical treatment with aspirin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, improves wound healing disorders in the context of diabetes, we first followed the rate of macroscopic wound closure after an excisional skin injury in mouse model of type II diabetes, C57BL/6J mice under high-fat diet during 16 weeks (HFD).

A 0.8 cm² circular full thickness skin excision wound (**Figure 1A**) was carried out on the back of HFD-induced diabetic mice and NC-fed lean mice. Then, a healing chamber was noninvasively implanted on the injury (**Figure 1A**). This chamber allowed collecting extracellular exudates, inflammatory cells, to protect the wound against pathogen invasion and to monitor the wound healing.

The wounds were photographed at day 0 and daily until complete healing (**Figure 1B**) and the percentage of wound closure was calculated as described in materials and methods.

The mice were treated with aspirin (36µg/wound in 200µL) or with the vehicle (0.9% NaCl, 200µL). The treatment was locally applied to the wound every day from the 3th to the 14th day post injury. As expected, wound image analysis from mice treated with vehicle revealed that diabetic HFD mice (**Figure 1B**) exhibited significantly delayed wound closure compared to the respective non-diabetic animals. Indeed, fully healing process in the non-diabetics C57BL/6 mice was obtained to day 14 ± 0.07 against the 19th day ± 1.01 for the diabetic HFD mice.

Figure 1B showed that aspirin has not effect on wound-healing process in non-diabetic mice fed NC. Interestingly, the diabetic HFD mice treated with Aspirin exhibited a significant increase in percentage of wound closure after day 1 post-treatment compared with untreated diabetic HFD mice. The effect of aspirin treatment on wound healing in diabetic mice appears during the early phase of healing between, the 4th day (day 1 post-treatment) and the 10th day after injury. The wounds of HFD diabetic mice treated with Aspirin trended toward faster closure than untreated diabetic mice. The kinetics of healing in the diabetic mice treated with aspirin are similar to the kinetics observed in the non-diabetic mice.

Taken together, our results show that topical application of aspirin accelerated the repair of full-thickness excisional wounds in type 2 diabetic mice. This effect most pronounced at the beginning of treatment, suggests that aspirin plays a role in the early step initiating the wound-healing process.

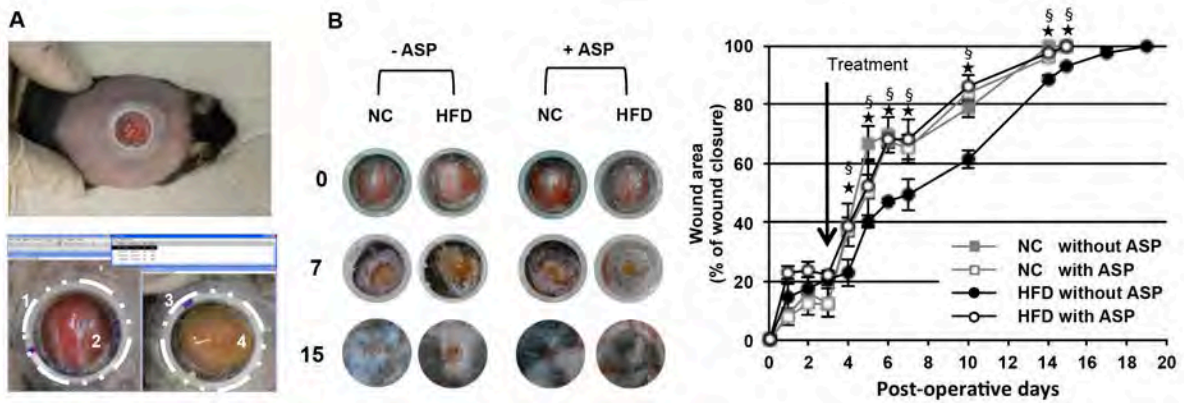


Figure 1. Aspirin treatment improves cutaneous wound healing in type 2 diabetes mice. **A)** An experimental skin chamber was implanted on the back of the animal as described in Methods. The protective cap has been removed to visualize the lesion. The original injury area was immediately calculated after wounding (2) based on the circular external surface on the skin chamber (1). Same process was applied to determine the wound surface (3-4) at various time during the healing process. **B)** Representative picture showing injury immediately after wounding and on the 7th and 15th days. At the indicate days, wound areas were determined using image analysis and expressed as percentage of wound area immediately post-injury (mean \pm SEM, n= 5 to 9). \star P<0,01 HFD with ASP versus HFD without ASP; \S P<0,01 NC with/without ASP versus HFD without ASP.

Aspirin treatment decreases inflammatory cells recruitment and promotes macrophages infiltration in murine diabetic wound exudate.

To evaluate whether the acceleration of wound closure by topical application of Aspirin is linked to a shorter delay between inflammatory phase and its resolution, we studied neutrophil and macrophage infiltrations into injury exudates during the early stage of wound healing. As the exudation disappears earlier in NC fed mice, the exudates were aseptically collected between 1 and 5 days after wounding in mice under NC and between 1 and 7 days for diabetic HFD mice. The persistent exudation in HFD fed mice corroborated with the delayed wound closure observed in diabetic mice.

The temporal pattern of inflammatory cell in exudates at 1, 2, 3, 5, and 7 days after wounding was evaluated by flow cytometry. The combination of Ly6B (7/4), Ly6G (Gr-1) and F4/80 antibodies allowed to identify two distinct populations of leukocytes in the inflammatory exudates from nondiabetic and diabetic mice (**Figure 2A-B**). Neutrophils were discriminated of monocytes/macrophages ($F4/80^+/Ly6B^{high/+}/Ly6G^-$) by their higher expression of both Ly6G and Ly6B ($Ly6G^{high}/Ly6B^{high}$) (**Figure 2A**).

Figure 2A showed that between 1 and 3 days after wounding the recruitment of neutrophils is stronger increased in diabetic HFD mice (85%) as compared to non-diabetic NC mice (60%), demonstrating an increased of post-injury inflammatory response in diabetic mice. The percentage of neutrophils in exudate from non-diabetic mice significantly decreased 5 days after wounding (34%) and the treatment with Aspirin did not affect this percentage (37%) (**Figure 2A**). In contrast, in diabetic HFD mice, the percentage of neutrophils still increased 5 days after wounding (93%) and Aspirin treatment decreased significantly the percentage of neutrophils (67%) in the wound exudate.

Simultaneously, between 1 and 3 days after wounding the percentage of recruited macrophages in injury exudate is largely higher in non-diabetic NC mice as compared with diabetic HFD mice (40% vs 12%) (**Figure 2B**). Furthermore, the Aspirin treatment during 2 days (5 days after wounding) significantly increased macrophage infiltration in diabetic HFD mice from 6% to 20%. In non-diabetic mice the Aspirin treatment did not modify the macrophage infiltration (32% vs 27%). Altogether, these results demonstrated that in diabetic HFD mice the neutrophil infiltration was preponderant. This greater infiltration that was accompanied of a minor macrophage infiltration correlated with the delayed wound closure observed in diabetic mice. Moreover, the restoration of neutrophils/macrophages ratio in injury exudate of diabetic HFD mice by Aspirin was consistent with the improvement of wound healing induced by this treatment.

Consistent with these results, we showed that the number of neutrophils in injury exudate from diabetic HFD mice was increased about three times between 1 and 2 days after wounding as compared to non-diabetic mice (**Figure 2C**). Furthermore, the number of neutrophils remains elevated until 7 days after wounding only in diabetic HFD mice without treatment, demonstrating the persistence of inflammatory phase. Interestingly, after Aspirin treatment the number of neutrophils in diabetic HFD mice becomes comparable to that of non-diabetic NC mice, suggesting that Aspirin triggers mechanisms involved both in the diminution of neutrophil infiltration and in their elimination.

Figure 2D showed that, 1 day after wounding, the number of macrophages was lower about 7 times in diabetic HFD mice as compared to non-diabetic mice, demonstrating a default in macrophage recruitment in diabetic HFD mice. The number of macrophages strongly decreased between 1 to 2 days after wounding in non-diabetic NC mice whereas in diabetic HFD mice this number remains constant. Moreover, from 2 days until 5 days after wounding, the number of macrophages was comparable between diabetic and non-diabetic mice, while the number of neutrophils was higher in

diabetic HFD mice. Thus, the decrease of macrophage migration into wound exudate fluid and the increase of neutrophils could be a characteristic of the altered inflammatory response in skin wounds of diabetic HFD mice leading to a delayed wound closure.

Interestingly, the Aspirin treatment inhibits exacerbated inflammatory processes in diabetic HFD mice, by increasing the number of macrophages and by decreasing neutrophils into wound exudate fluid, and hence could enhance the wound healing.

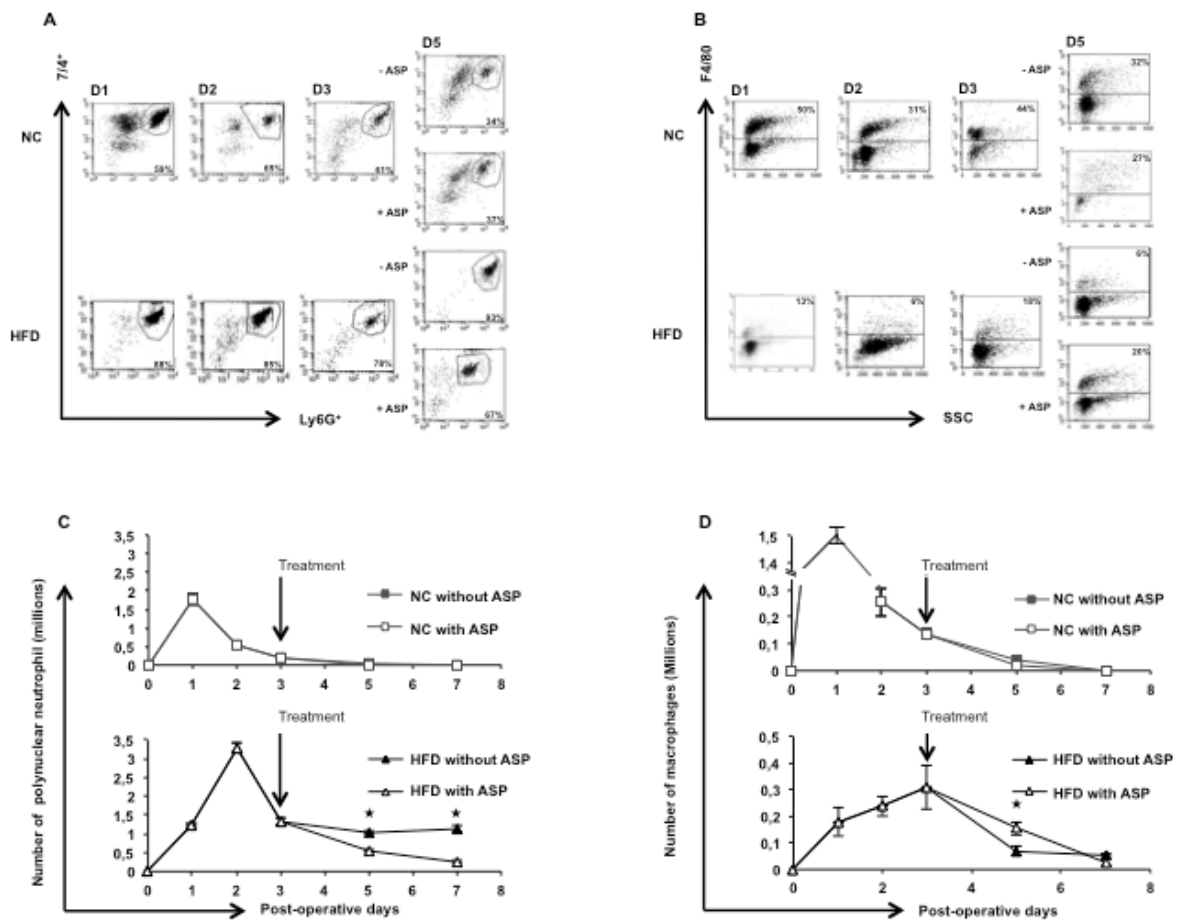


Figure 2. Aspirin treatment decreases inflammatory cells recruitment and promotes macrophages infiltration in murine diabetic wound exudate. (A-B) Representative examples of analysis of wound exudate cells population, using flow cytometry defining polynuclear neutrophils as 7/4⁺ Ly6G⁺ and macrophages as F4/80⁺. The percentage shown represents the population of neutrophils or macrophages according to all cells collected in exudate. **(C-D)** Quantitative analysis of polynuclear neutrophils and macrophages of total wound exudate cells. Data shown are the mean ± SEM of 6 to 12 mice per group of mice. ★ indicates significant differences (probability values P<0,01) of HFD mice treated with ASP compared with HFD mice treated with vehicle.

Aspirin treatment promotes the resolution of inflammation in wound from diabetic mice through the enhancement of efferocytosis by injury macrophages.

Efferocytosis of apoptotic inflammatory cells by alternatively activated macrophages following tissue injury is fundamental to the resolution of inflammation and initiation of wound healing. We assessed whether aspirin might promote neutrophil phagocytosis by macrophage (efferocytosis) in wound area. To evaluate apoptotic cell clearance by macrophages during wound healing process, the neutrophils engulfed by F4/80⁺ macrophages were quantified using anti-mouse Ly6G antibody by flow cytometry.

Figure 3A showed, 3 days after wounding, a stronger decrease of F4/80⁺ / Ly6G⁺ cells in injury exudate from diabetic HFD mice, demonstrating an impaired of apoptotic cell clearance or efferocytosis activity of macrophages from wound exudate of diabetic mice. The decrease of efferocytosis by diabetic macrophages was amplified 5 days after wounding. In contrast, the efferocytosis by non-diabetic macrophages remains constant. Interestingly, aspirin treatment during 2 days (5 days after wounding) restores the capacity of diabetic wound macrophages to engulf apoptotic neutrophils.

To evaluate whether aspirin promote the elimination of inflammatory cells through the induction of CD36, a scavenger receptor known to mediate efferocytosis following tissue injury, we assessed the CD36 protein level at the surface of macrophages. **Figure 3B** showed a slight CD36 protein expression on diabetic HFD macrophages 5 days post injury as compared to non-diabetic NC macrophages. Aspirin treatment fully restored CD36 protein level on diabetic HFD macrophages. Indeed, with aspirin, the CD36 protein level was similar on diabetic and non-diabetic wound macrophages. Thus, the increase of neutrophil efferocytosis by wound macrophages from diabetic HFD mice treated by Aspirin was correlated to CD36 over-expression. The increase of CD36-dependent efferocytosis could be the mechanism involved in the improvement of wound healing by aspirin.

To further explore whether Aspirin treatment of macrophages promote efferocytosis of apoptotic neutrophils, we evaluated *in vitro* the myeloperoxidase activity (specific neutrophil marker) of resident peritoneal macrophages after co-culture with apoptotic neutrophils. **Figure 3C** showed an increase of myeloperoxidase activity of Aspirin-treated resident macrophages as compared to non-treated macrophages, supporting the positive regulation of efferocytosis by Aspirin.

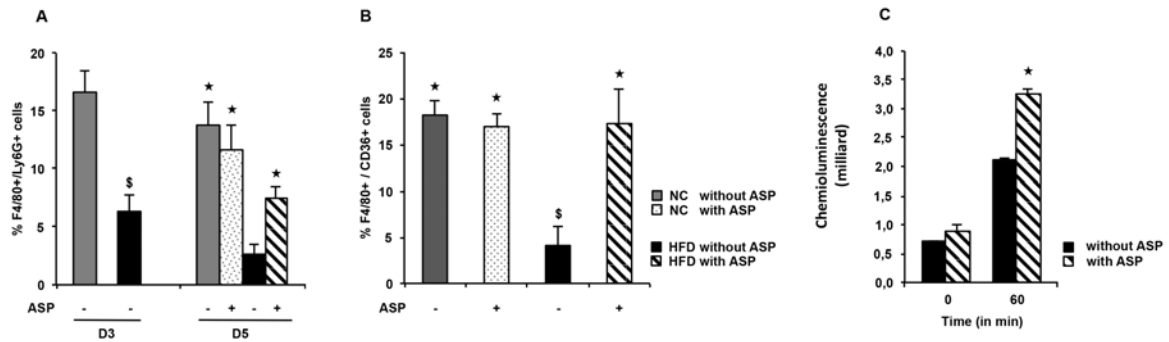


Figure 3. Aspirin treatment promotes the resolution of inflammation in wound from diabetic mice through the enhancement of efferocytosis by injury macrophages. A) Wound exudate cells were collected 5 days post injury and labeled with fluorescent-labeled F4/80 antibodies. Cells were fixed, permeabilized and incubated for intracellular staining with fluorescent-labeled Ly6G antibodies. For analysis, all quadrants were set up, according to matched isotype control antibodies. All results are reported as percentages of total wound cells (mean \pm SEM, n= 6). \star P<0,01 versus HFD without ASP. **B)** Flow cytometric analysis at the 5th days post lesion of the total wound exudate cells. Enumeration in the bar graph indicates percentage of macrophages F4/80⁺ expressed the CD36 receptor (mean \pm SEM, n= 6). \star P<0,01 versus HFD without ASP. **C)** In vitro efferocytosis quantification. Murine peritoneal macrophages cells were cultivated with or without Aspirin. Apoptotic polynuclear neutrophils were just added during 0 min or 60 min and were removed. MPO activity was measured by chemiluminescence using a thermostatically (37°C) controlled luminometer (mean \pm SEM, n= 3). \star P<0,01 versus HFD without ASP.

Aspirin treatment promotes the wound healing in diabetic mice through the modulation of macrophage polarization.

To define the polarization of macrophages present in injury exudates, 3 days after wounding, from mice in chow and HF fed conditions, the expression of specific markers of classical M1 and M2s activation was evaluated by RT-PCR (**Figure 4A**). Overall, macrophages from mice both in chow and HF fed conditions displayed an up-regulation of M2s markers like Ym1, Arginase, IL-1ra, CCL22, Mannose Receptor (MR) and IL-10. In macrophages from non-diabetic NC mice, this finding was supported by the weak expression of M1 markers such as IL12, IL-1 β , TNF- α , CD11b and CD64 and the robust expression of CD36 and CCL22. Thus, together with CCL22 a bona fide marker of alternative M2a polarization, our data clearly demonstrate that the macrophages from non-diabetic NC mice are characterized by an M2a phenotype.

Interestingly, the induction of M2s markers was lower in macrophages from diabetic mice under HFD than macrophages from non-diabetic mice under CD. Concomitantly with reduced alternative activation markers in macrophages from diabetic mice in HF fed condition, the M1 markers such as IL-12, IL-1 β , TNF- α and the Fc γ -receptors CD64 and CD11b were highly expressed. This pro-inflammatory signature in macrophages from diabetic HFD mice, which was accompanied by production of anti-inflammatory IL-10, IL-1ra in high amounts, suggests that the macrophages of diabetic mice under HFD present a M2b phenotype. Indeed, only M2b macrophages are characterized by simultaneous production of pro-inflammatory cytokines, and IL-10, together with CCL1 a bona fide marker of M2b polarization. Moreover, the higher expression of CD11b and CD64, specific M1 polarization markers, suggest the simultaneous presence of both M2b and M1 phenotypes. These results demonstrate that the macrophages, day 3 post-lesion, from non-diabetic CD mice are characterized by an M2a polarization whereas the HFD induces M2b and M1 inflammatory phenotypes.

Aspirin treatment of the injury during 2 days (5 days post-wounding), of diabetic mice under HFD conditions induced a strong decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β which was accompanied by the up-regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and TGF- β , suggesting that the Aspirin favours the polarization of macrophages towards an anti-inflammatory M2 profile (**Figure 4B**). This finding was further supported by the induction of Arginase-1, YM-1, MR and CD36 and the reciprocal reduction of CD11b and CD64. Thus, together with the strong increased of CCR2 expression, a bona fide marker of M2c polarization, our result clearly demonstrate that Aspirin treatment switches the polarization of macrophages of diabetic HFD mice from an M2b and M1 inflammatory phenotypes towards an M2c phenotype involved in tissue repair and remodelling.

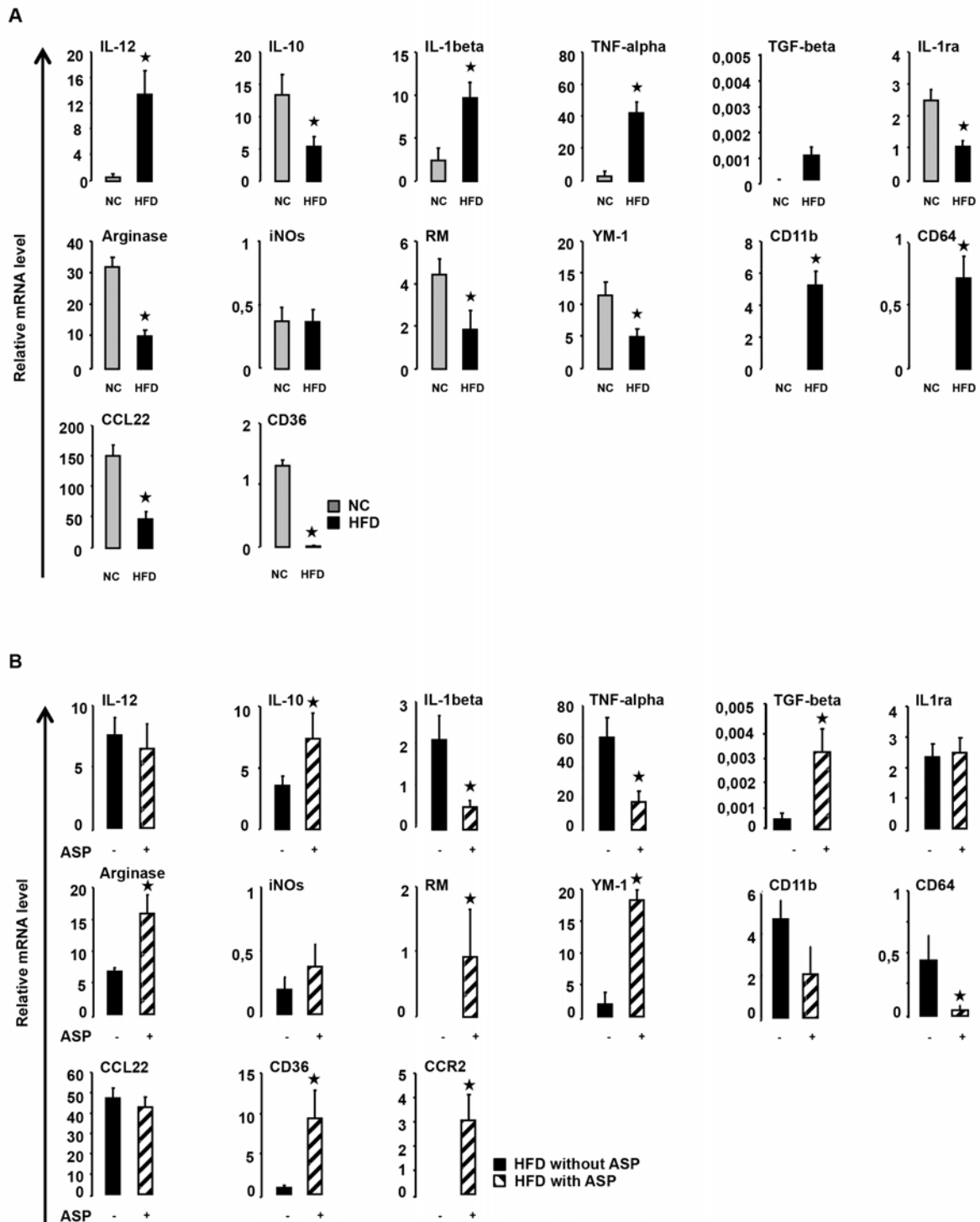


Figure 4. Aspirin treatment promotes the wound healing in diabetic mice through the modulation of macrophage polarization.

A) qRT-PCR analysis of biological markers for M1 and M2 polarization programs. NC and HFD wound exudate macrophages were collected 72 hours post-injury. ★ $p < 0,05$ compared to the HFD mice. **B)** 5 days post injury and 2 days post aspirin treatment, macrophages of the wound exudate HFD mice were isolated and characterized. ★ $p < 0,05$ compared to the HFD mice without aspirin treatment.

Aspirin treatment promotes the resolution of inflammation in wound from diabetic mice through LTB₄/LXA₄ balance.

Lipid mediators from arachidonic acid are among the first signals that are released in response to tissue injury. These lipids mediators are metabolized through two families of enzymes, the cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) involved in the production of pro-inflammatory prostanoids and the lipoxygenases (5-LOX, 12-LOX, and 15-LOX) involved in leukotrienes and lipoxins synthesis. During the inflammatory phase of wound healing, LTB₄ were produced from arachidonic acid by 5-LOX/ LTA₄ hydrolase pathway; whereas during the resolution of inflammatory response the 5-LOX and 12/15-LOX participate to the biosynthesis of anti-inflammatory and proresolving mediators such as lipoxins (LXA₄). Moreover, it is known that aspirin promotes inflammation resolution through the production of 15(R)-HPETE via COX-2 acetylated, which is then metabolized in 15-epi-lipoxin A₄ via 5-LOX.

To evaluate whether Aspirin, which ameliorate wound healing of diabetic HFD mice, modulates LTB₄, LXA₄ and/or 15-epi-lipoxin A₄ productions, we concomitantly evaluated their production in injury exudates and macrophage mRNA level of enzymes involved in their synthesis.

Before treatment with aspirin (3 days after wounding) exudate macrophages from diabetic mice are characterized by an increased mRNA level of LTA₄h.

Consistently, a significant augmentation of LTB₄ related to a decrease of LXA₄ in wound exudate was observed (**Figure 5A-B**).

Aspirin treatment of the injury from diabetic mice under HFD conditions during 2 days (D5 post-wounding) induced a strong decrease of mRNA level of LTA₄h. In line, the level of LTB₄ drastically decreased after aspirin treatment. Surprisingly, although aspirin treatment of diabetic mice induced COX-2 mRNA level, it did not trigger the production of 15-epi-LXA₄ since we did not detect this mediator in injury exudate from diabetic mice with or without aspirin treatment (data not shown) (**Figure5A-B**).

In wound tissues, between 3 and 14 days post injury, COX-2 mRNA level was not induced both in non-diabetic mice and diabetic mice. Moreover, aspirin treatment did not modify COX-2 expression during wound healing process.

Three days post injury, the 12/15-LOX mRNA level was strongly decreased in tissues from diabetic mice as compared to non-diabetic mice. In contrast, 5-LOX and LTA₄h mRNA levels were increased. Interestingly, from 5 days until 10 days post-injury, aspirin treatment increased significantly 12/15-LOX mRNA level in tissue from diabetic mice, while this treatment decreased 5-LOX and LTA₄h mRNA levels (**Figure5C**).

Consistent with these results, we demonstrated J3 post-injury a significant augmentation of LTB₄ in injury tissue of diabetic mice associated with a decrease of LXA₄. Furthermore, a significant increase of LXA₄ in injury tissue of diabetic mice related with a decrease of LTB₄ was revealed from 2 to 5 days after aspirin treatment (**Figure 5D**).

Although Aspirin triggers 15-epi-lipoxin A₄ from 4 days of treatment, this augmentation did not correlated with the induction of COX-2 mRNA level (data not show).

Taken together, our results suggest that delayed wound closure observed in diabetic mice is correlated both with the generation of pro-inflammatory LTB₄ through 5-LOX/LTA₄h axis and with the inhibition of anti-inflammatory LXA₄ synthesis associated to a weak 12/15-LOX expression. The topical application of aspirin accelerated the repair of full-thickness excisional wounds in diabetic mice through the decrease of LTB₄ production correlated with an increase of LXA₄ through 12/15-LOX over-expression. Surprisingly, aspirin promotes inflammatory resolution both through LXA₄ and 15-epi-lipoxin A₄ generations.

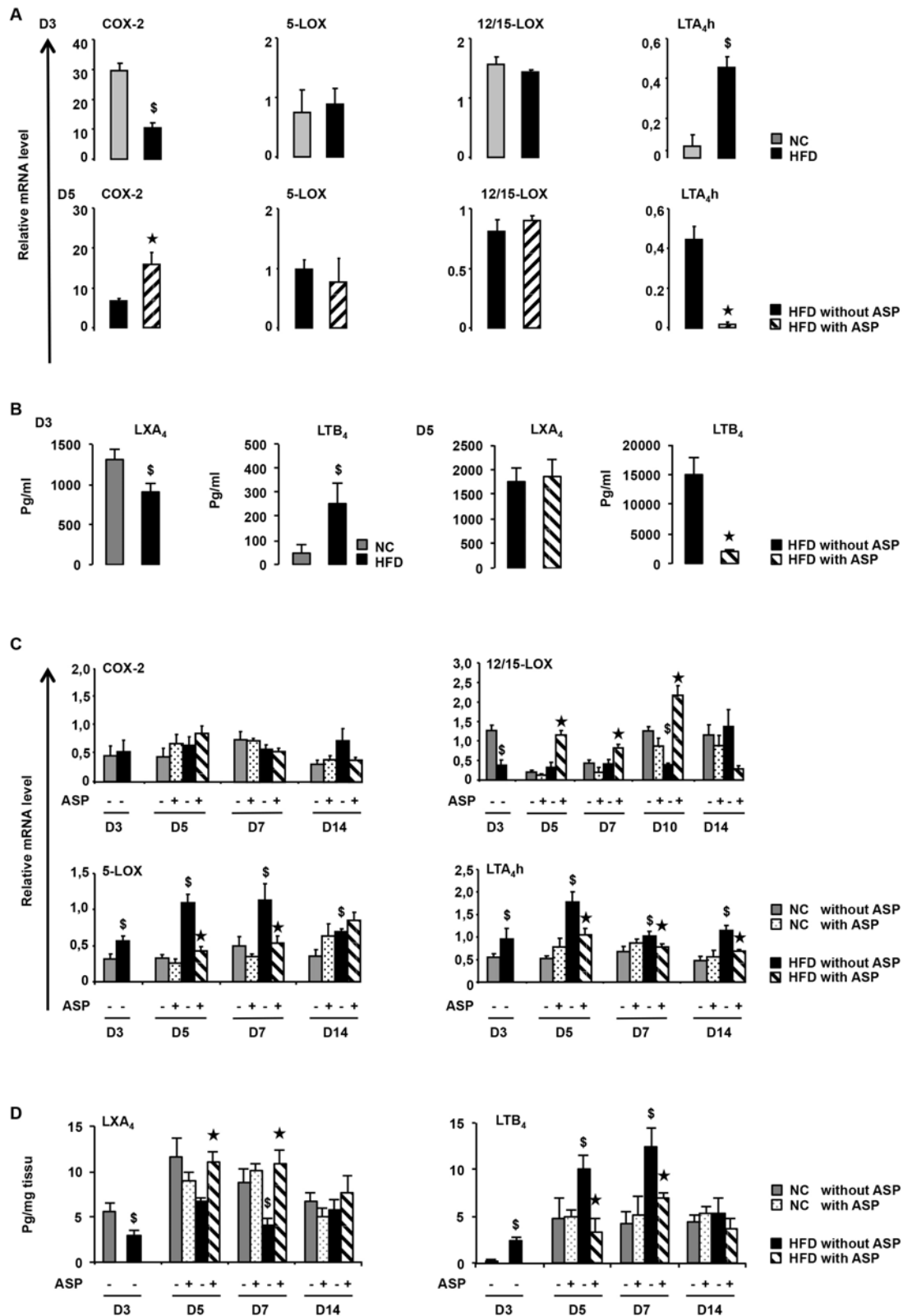


Figure 5. Aspirin treatment promotes the resolution of inflammation in wound from diabetic mice through LTB₄/LXA₄ balance. **A)** qRT-PCR analysis of enzymes involved in the arachidonic acid metabolism from cells that compose the exudate, 3 days and 5 days post wounding in NC and HFD diabetic mice treated or not treated by aspirin. ★ p < 0,05 compared to the HFD mice. \$ p < 0,05 compared to the NC mice. **B)** LXA₄ and LTB₄ production from wound exudate at 3 days and 5 days post lesion in NC and HFD diabetic mice treated or not treated by aspirin and quantified by enzyme immunoassay (EIA). ★ p < 0,05 compared to the HFD mice. \$ p < 0,05 compared to the NC mice. **C)** qRT-PCR analysis of enzymes involved in the arachidonic acid metabolism from wound tissue, 3,5,7, and 14 days post wounding in NC and HFD diabetic mice treated or not treated by aspirin. ★ p < 0,05 compared to the HFD mice. \$ p < 0,05 compared to the NC mice. **D)** LXA₄ and LTB₄ production from wound tissue at 3 days and 5 days post lesion in NC and HFD diabetic mice treated or not treated by aspirin and quantified by enzyme immunoassay (EIA). ★ p < 0,05 compared to the HFD mice. \$ p < 0,05 compared to the NC mice.

The improvement of impaired wound healing of diabetic mice by aspirin involves 5-LOX and 12/15-LOX

To evaluate whether 5-LOX (involved in LXA₄ and 15-epi-lipoxin A₄ productions) and 12/15-LOX (involved in LXA₄ production) were implicated in the improvement of impaired wound closure in diabetic mice, we performed the rate of macroscopic wound closure after an excisional skin injury in 5-LOX and 12/15-LOX KO murine models under high-fat diet.

Figure 6A showed that the 5-LOX deletion in non-diabetic mice reduced wound healing process from 5 days to 15 days post-injury and aspirin treatment did not ameliorate this impaired wound healing. Furthermore, 5-LOX deletion in diabetic HFD mice did not affect the wound-healing process.

As expected, while Aspirin treatment increased the percentage of wound closure in WT littermate diabetic mice, this treatment did not change wound closure in diabetic mice deleted for 5-LOX (**Figure 6B**).

Interestingly, in diabetic mice deleted for 5-LOX, we demonstrated that treatment both LTA₄ and aspirin administered on the injury, can restore a kinetic of wound closure comparable to the WT diabetic mouse treated by aspirin. In contrast, in absence of aspirin, LTA₄ treatment increased the delayed wound closure during inflammatory phase of wound healing in 5-LOX diabetic mice (**Figure 6C**).

Figure 6D demonstrated that the deletion of 5-LOX in non-diabetic mice decreased the rate of wound healing and aspirin treatment did not restore effective wound healing.

Surprisingly, in diabetic mice the deletion of 12/15-LOX suppressed the amelioration of aspirin induced-wound healing (**Figure 6E**), suggesting that the acetylation of COX-2 by aspirin was not efficient to restore an impaired wound healing in diabetic mice.

To assess whether COX-2 induction could reverse the absence of aspirin induced-wound healing in diabetic mice deleted for 12/15-LOX, we pre-treated the wounds with LPS known to increase COX-2 expression. Interestingly, we showed that LPS restored the favourable aspirin effect on the wound healing in diabetic mice deleted for 12/15-LOX (**Figure 6F**).

Altogether, these results demonstrated that the impaired wound healing in diabetic mice was dependent on a delay in the resolution phase of inflammation due to a functional default of 5-LOX/12/15-LOX axis. We showed that the 12/15-LOX and 5-LOX are essentials to the beneficial effect of aspirin on wound healing in diabetic mice while COX-2 is not required.

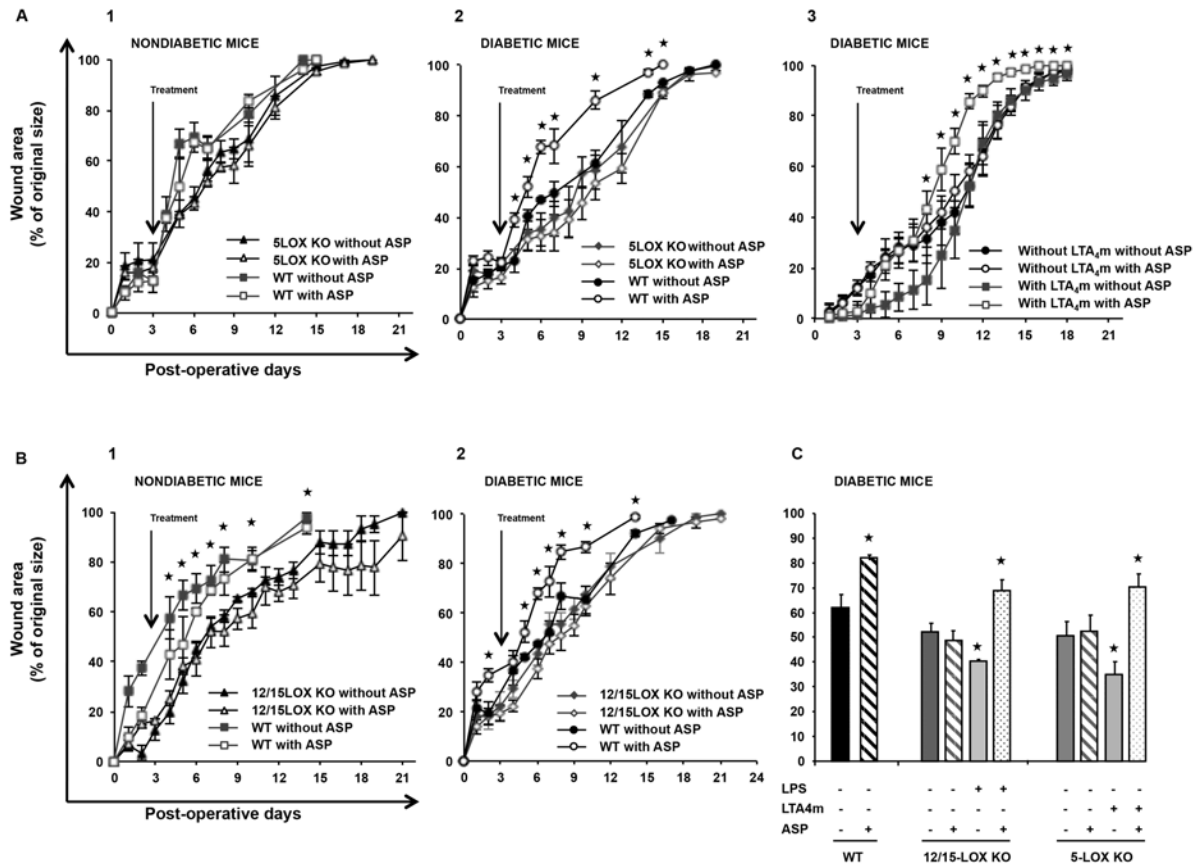


Figure 6. The improvement of impaired wound healing of diabetic mice by aspirin involves 5-LOX and 12/15-LOX
A) Time course of wound closure in nondiabetic (1) and diabetic 5-LOX KO mice (2,3). At the indicate days, wound areas were determined using image analysis and expressed as percentage of wound area immediately post-injury (mean ± SEM, n= 5 to 9), as described in Methods. ★ P<0,01 versus HFD without aspirin. **B)** Time course of wound closure in nondiabetic (1) and diabetic 12/15-LOX KO mice (2). At the indicate days, wound areas were determined using image analysis and expressed as percentage of wound area immediately post-injury (mean ± SEM, n= 5 to 9), as described in Methods. ★ P<0,01 versus HFD without aspirin. **C)** Wound area 10 days post lesion on WT, 12/15 LOX and 5-LOX diabetic mice. ★ P<0,01 versus HFD without LPS/LTA_{4m} and without aspirin

4.5. Discussion

Skin lesions and ulcerations are severe complications of diabetes that often result in leg amputations. In this context, it is important to understand and develop new strategies to treat wounds. In diabetic patients, the persistent inflammatory process is responsible of impaired wound healing (Baltzis et al., 2014; Kampfer et al., 2005). Indeed, it has been shown that PMN infiltration was strongly increased during inflammatory phase of wound healing in diabetic context (Al-Mulla et al., 2011). Consistently, we demonstrated here that the number of PMNs in exudate from diabetic HFD mice was higher than in non-diabetic mice. Concomitantly to the PMNs increased, the level of LTB₄, a PMN chemotactic eicosanoid (Wetzler et al., 2000), was strongly released in the injury exudate and in wound tissue of diabetic animals. We have also established that the greater number of PMNs in wound exudate of the diabetic mice was correlated with a failure of macrophages influx in the injury. These macrophages present a lack of CD36 expression correlated with an impaired of apoptotic PMNs efferocytosis. These data are consistent with *in vitro* studies showing that macrophages from diabetic *db/db* mice have a deficiency of apoptotic cell clearance (Nohgawa et al., 1997) and with phenotypic and functional deregulation of diabetic monocytes / macrophages established elsewhere (Khanna et al., 2010). Previously, we have demonstrated that the peritoneal macrophages from mice under HFD diet presented an M2b phenotype (TNF- α high IL-10^{high}, MR⁺ Dectin-1⁺) (Cucak et al., 2014). In line, we showed here, a high proportion and the persistence of inflammatory M1 and M2b macrophages in injury exudate of HFD diabetic mice. Given that during the wound healing the macrophages switch from a pro-inflammatory M1 towards M2s phenotypes that contribute to the resolution of inflammation and tissue repair (Lefevre et al., 2010), we showed here that the impaired wound healing in diabetic mice is associated with a default of macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype. This impaired macrophage polarization towards M2 phenotype in diabetic mice is associated with an imbalance of LXA₄ / LTB₄ ratio in favour of LTB₄ production. Indeed, the resolution of inflammation, which determines the outcome of the wound healing, was induced by the release of LXA₄ proresolving mediators derived from arachidonic acid mainly produced by M2 macrophages (Brancato and Albina, 2011).

To promote the wound healing process in HFD diabetic mice, we modulated the inflammatory phase by an original pharmacological approach using low dose of aspirin locally applied on the wounds. It is known that aspirin inhibits the prostanoid production and promotes, unlike other anti-inflammatory drugs, the pathway involved in pro-resolving lipid mediators production through COX-2-dependent epi-lipoxins synthesis (Serhan, 2014) (Serhan, 1997, 2005). Besides the effects of aspirin on the gastrointestinal tract, few studies have explored its effect on the wound healing (Claria and Serhan, 1995; Wallace, 2005). A recent study showed that the administration of aspirin at high doses (25 mg / kg body weight / day) to female mice slowed the cutaneous wound healing by decreasing the estrogen production (dos Santos and Monte-Alto-Costa, 2013; Wallace, 2005). In line, impaired wound healing was highlighted when aspirin is orally administered at very high doses (dos Santos and Monte-Alto-Costa, 2013; Lee, 1968; Lee and Tong, 1969). However, aspirin daily dose of 300 mg shortens the healing time of ulcerated lesions in the chronic venous insufficiency (del Rio Sola et al., 2012; Lee and Tong, 1969). Consistently, we showed here that the topical application of low dose of aspirin (10 μ g / wound / day) promotes wound closure in HFD diabetic mice, while topic aspirin treatment with high doses worsened wound healing (data not shown). A special feature of aspirin is linked to its dose-dependent mechanisms. The favourable effects of aspirin (antiplatelet effect, resolution of inflammation) occur at low doses while higher doses induce side effects (Bradlow and Chetty, 1982; del Rio Sola et al., 2012). To promote the synthesis of anti-inflammatory bioactive lipids, we choose to start topic aspirin application from J3 post-injury, corresponding to the end of the inflammatory phase

of healing process in non-diabetic mice. Indeed, aspirin triggers the epi-lipoxin only at the end of inflammatory process when the cyclooxygenase-2 is expressed and could be acetylated.

Improved wound healing by aspirin was accompanied by an up-regulation of CD36 gene expression in wound macrophages. This scavenger receptor mediates recognition, and clearance of inflammatory apoptotic cells, a fundamental step to the resolution of inflammation and initiation of tissue repair. This improvement of wound healing is associated with a reduction of inflammation in the wound. This decreased inflammation after aspirin treatment is linked to a switch of inflammatory macrophages towards M2c macrophages characterized by low expression of IL-12 and TNF- α inflammatory cytokines, and high expression of anti-inflammatory mediators, such as IL-10. This M2c phenotype participates in immunoregulation, matrix deposition, and tissue remodelling (Coleman and Alberts, 2006; Gordon and Martinez, 2010; Koscsó et al., 2013)].

Previous studies have shown that aspirin inhibits the cyclooxygenase activity by serine acetylation but not the peroxidase activity of both COX-1 and COX-2. The acetylation of COX-2, prevents the formation of prostanoids (Sabat et al., 2010), but the acetylated enzyme remains active in situ to generate 15R-hydroxyeicosatetraenoic acid (15R-HETE) from arachidonic acid (Herschman, 1998; Lecomte et al., 1994). 15R-HETE is released and converted by activated inflammatory cells to the 15-epi-lipoxins. These natural local mediators display potent antiinflammatory properties (ref). Surprisingly in our study, the 15-epi-LXA₄ was not detected 5 days post-injury in the wound exudate of HFD diabetic mice treated with aspirin. Moreover, the 15-epi-LXA₄ appears at a very low concentration in the tissue 7 days post-injury in diabetic mice. Unexpectedly, 7 days post-lesion, aspirin treatment promotes the generation of LXA₄ related to a significant overexpression of 12/15-LOX and a downregulation of LTA₄h. In 12/15-LOX-deficient diabetic mice, we demonstrated that the topical application of aspirin did not promote the closure of wounds, confirming that the effect of aspirin treatment in the improvement of wound healing is 12/15-LOX enzyme dependant. Thus, in our experimental condition, aspirin acts rather through 12/15-LOX and lipoxin production than via COX-2 acetylation and 15-epi lipoxin production. In 12/15-LOX knockout diabetic and non-diabetic mice upon aspirin, acetylated COX-2, should improve the delayed wound healing through 15R-HETE and 15-epi-lipoxin productions. The topical treatment of 12/15-LOX knockout diabetic mice, with 10 ng of LPS per wound (a potent inducer of COX-2) restores the beneficial effect of aspirin on the wound healing, suggesting that COX-2 is slightly express in the skin lesion during the topical aspirin treatment.

As expected in 5-LOX-deficient diabetic mice, the improvement of wound healing by aspirin treatment was lost, demonstrating the key role of this enzyme in the effectiveness of aspirin treatment. Interestingly, the daily topical application of LTA₄ (140 ng) restores the positive effect of aspirin on wound healing in 5-LOX-deficient diabetic mice. This result corroborated with the inhibition of LTA₄ hydrolase gene expression and LTB₄ production in inflammatory exudates and in wound tissue observed in diabetic mice treated with aspirin. Thus, our results suggest that the exogenous LTA₄ was preferentially metabolized in LXA₄ through 12/15-LOX enzyme induced by aspirin treatment.

Interestingly, our data showed for the first time that 12/15-LOX-deficient non-diabetic mice have an impaired wound healing similar to those of wild-type littermate diabetic mice. However, the deletion of 5-LOX gene, slightly affects the wound healing of non-diabetic mice. These results highlight the importance of 12/15-LOX in the production of lipid mediators involved in the resolution of inflammation and hence in wound closure.

The absence of wound healing delay in 5-LOX-deficient non-diabetic mice could be dependent on the decrease of inflammation correlated both to the absence of LTB₄ release and to the increase of the anti-inflammatory AA metabolites production through 12/15-LOX activity. The impaired wound healing in 12/15-LOX-deficient diabetic mice comforts this hypothesis.

The AA metabolites from the 12/15-LOX, including 15-HETE, are endogenous ligands of Peroxisome proliferator-activated receptors- α , β , δ , γ (PPAR- α and PPAR- β / δ , - γ) (Huang et al., 1999; Limor et al., 2008; Naruhn et al., 2010; Serhan et al., 2000). These nuclear receptors, which exhibit different tissue distributions, control many cellular and metabolic processes. PPAR- α and PPAR- γ were involved in lipid metabolism, energy homeostasis and inflammatory responses. (Abdelrahman et al., 2005; Bertin et al., 2013; Campbell, 2005; Kozak et al., 2002). PPAR- α and PPAR- β / δ contribute to epidermal maturation and repair of cutaneous wounds (Michalik et al., 2005; Montagner et al., 2011; Tan et al., 2004; Yang et al., 2008).

However, in 12/15-LOX diabetic mice, PPAR nuclear receptors are not sufficient to improve wound healing. These results could result of decreased PPARs expression in diabetic context (Chong et al., 2009; Hu et al., 2013; Kanie et al., 2003). In diabetic mice, aspirin treatment restores the 12/15-LOX induction and hence promotes PPARs activation through the production of endogenous ligands.

In 12/15-LOX-deficient mice, the AA metabolism could be turn toward LTB₄ production through the 5-LOX and LTA₄ hydrolase. Consequently, the inflammatory phase of wound healing process would be favoured to the detriment of its resolution. After aspirin treatment, LTA₄ hydrolase is downregulated, promoting the 5-HETE release. The oxidation of this metabolite by 5-dehydrogenase hydroxyeicosanoïde in 5-oxo-ETE could aggravate the outcome of wound healing. Indeed, 5-oxo-ETE is highly chemoattractant for eosinophils (Michalik et al., 2001). Consistently in 12/15-LOX-deficient mice, we showed that aspirin treatment was poorly tolerated causing a robust delay of wound healing (data not shown).

In conclusion, this work provides new data showing the positive effect of topical aspirin treatment in the improvement of cutaneous wound healing in diabetic context. Aspirin treatment promotes the influx of anti-inflammatory type 2 macrophages to injury site and consequently the efferocytosis of apoptotic cells in injury. Moreover, the topical application of aspirin accelerates the repair of full-thickness excisional wounds in diabetic mice through the decrease of LTB₄ production correlated with an increase of LXA₄ through 12/15-LOX over-expression. Thus, this pharmacological approach highlights a new mechanism of resolution of inflammation in diabetic context promoting the acceleration of wound healing.

4.6. References

- Aarabi, S., Longaker, M.T., and Gurtner, G.C. (2007). Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS medicine* 4, e234.
- Abdelrahman, M., Sivarajah, A., and Thiemermann, C. (2005). Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovascular research* 65, 772-781.
- Al-Mulla, F., Leibovich, S.J., Francis, I.M., and Bitar, M.S. (2011). Impaired TGF-beta signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to delayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes. *Molecular bioSystems* 7, 3006-3020.
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., and Veves, A. (2014). Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Advances in therapy* 31, 817-836.
- Bannon, P., Wood, S., Restivo, T., Campbell, L., Hardman, M.J., and Mace, K.A. (2013). Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice. *Disease models & mechanisms* 6, 1434-1447.
- Bertin, B., Dubuquoy, L., Colombel, J.F., and Desreumaux, P. (2013). PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Current drug targets* 14, 1501-1507.

- Biteman, B., Hassan, I.R., Walker, E., Leedom, A.J., Dunn, M., Seta, F., Laniado-Schwartzman, M., and Gronert, K. (2007). Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 2257-2266.
- Bradlow, B.A., and Chetty, N. (1982). Dosage frequency for suppression of platelet function by low dose aspirin therapy. *Thrombosis research* 27, 99-110.
- Brancato, S.K., and Albina, J.E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology* 178, 19-25.
- Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 117, 1219-1222.
- Campbell, I.W. (2005). The Clinical Significance of PPAR Gamma Agonism. *Current molecular medicine* 5, 349-363.
- Chong, H.C., Tan, M.J., Philippe, V., Tan, S.H., Tan, C.K., Ku, C.W., Goh, Y.Y., Wahli, W., Michalik, L., and Tan, N.S. (2009). Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *The Journal of cell biology* 184, 817-831.
- Chou, R.C., Kim, N.D., Sadik, C.D., Seung, E., Lan, Y., Byrne, M.H., Haribabu, B., Iwakura, Y., and Luster, A.D. (2010). Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* 33, 266-278.
- Claria, J., and Serhan, C.N. (1995). Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9475-9479.
- Coleman, J.L., and Alberts, M.J. (2006). Effect of aspirin dose, preparation, and withdrawal on platelet response in normal volunteers. *The American journal of cardiology* 98, 838-841.
- Conte, F.P., Menezes-de-Lima, O., Jr., Verri, W.A., Jr., Cunha, F.Q., Penido, C., and Henriques, M.G. (2010). Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. *British journal of pharmacology* 161, 911-924.
- Cucak, H., Grunnet, L.G., and Rosendahl, A. (2014). Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *Journal of leukocyte biology* 95, 149-160.
- del Rio Sola, M.L., Antonio, J., Fajardo, G., and Vaquero Puerta, C. (2012). Influence of aspirin therapy in the ulcer associated with chronic venous insufficiency. *Annals of vascular surgery* 26, 620-629.
- dos Santos, J.S., and Monte-Alto-Costa, A. (2013). Female, but not male, mice show delayed cutaneous wound healing following aspirin administration. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 40, 90-96.
- El Kebir, D., Jozsef, L., and Filep, J.G. (2008). Opposing regulation of neutrophil apoptosis through the formyl peptide receptor-like 1/lipoxin A4 receptor: implications for resolution of inflammation. *Journal of leukocyte biology* 84, 600-606.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736-1743.
- Ferracini, M., Rios, F.J., Pecenin, M., and Jancar, S. (2013). Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators of inflammation* 2013, 950273.
- Ferrante, C.J., and Leibovich, S.J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in wound care* 1, 10-16.
- Fierro, I.M., Colgan, S.P., Bernasconi, G., Petasis, N.A., Clish, C.B., Arita, M., and Serhan, C.N. (2003). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *Journal of immunology* 170, 2688-2694.
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature medicine* 5, 698-701.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gourevitch, D., Kossenkov, A.V., Zhang, Y., Clark, L., Chang, C., Showe, L.C., and Heber-Katz, E. (2014). Inflammation and Its Correlates in Regenerative Wound Healing: An Alternate Perspective. *Advances in wound care* 3, 592-603.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
- Herschman, H.R. (1998). Recent progress in the cellular and molecular biology of prostaglandin synthesis. *Trends in cardiovascular medicine* 8, 145-150.
- Hong, S., Lu, Y., Tian, H., Alapure, B.V., Wang, Q., Bunnell, B.A., and Laborde, J.M. (2014). Maresin-like Lipid Mediators Are Produced by Leukocytes and Platelets and Rescue Reparative Function of Diabetes-Impaired Macrophages. *Chemistry & biology* 21, 1318-1329.
- Hu, Y., Chen, Y., Ding, L., He, X., Takahashi, Y., Gao, Y., Shen, W., Cheng, R., Chen, Q., Qi, X., *et al.* (2013). Pathogenic role of diabetes-induced PPAR-alpha down-regulation in microvascular dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 15401-15406.
- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., and Glass, C.K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400, 378-382.
- Jeffcoate, W.J., and Harding, K.G. (2003). Diabetic foot ulcers. *Lancet* 361, 1545-1551.
- Kakazu, A., He, J., Kenchegowda, S., and Bazan, H.E. (2012). Lipoxin A(4) inhibits platelet-activating factor inflammatory response and stimulates corneal wound healing of injuries that compromise the stroma. *Experimental eye research* 103, 9-16.
- Kampfer, H., Schmidt, R., Geisslinger, G., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2005). Wound inflammation in diabetic ob/ob mice: functional coupling of prostaglandin biosynthesis to cyclooxygenase-1 activity in diabetes-impaired wound healing. *Diabetes* 54, 1543-1551.
- Kanie, N., Matsumoto, T., Kobayashi, T., and Kamata, K. (2003). Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR alpha and PPAR gamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *British journal of pharmacology* 140, 23-32.
- Kapoor, M., Kojima, F., Yang, L., and Crofford, L.J. (2007). Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 76, 103-112.
- Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., Bhasker, V., Gordillo, G.M., Sen, C.K., and Roy, S. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS one* 5, e9539.

- Koh, T.J., and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e23.
- Kosco, B., Csoka, B., Kokai, E., Nemeth, Z.H., Pacher, P., Virag, L., Leibovich, S.J., and Hasko, G. (2013). Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. *Journal of leukocyte biology* 94, 1309-1315.
- Kozak, K.R., Gupta, R.A., Moody, J.S., Ji, C., Boeglin, W.E., DuBois, R.N., Brash, A.R., and Marnett, L.J. (2002). 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *The Journal of biological chemistry* 277, 23278-23286.
- Kuhn, H., and O'Donnell, V.B. (2006). Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Progress in lipid research* 45, 334-356.
- Lecomte, M., Laneuville, O., Ji, C., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1994). Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *The Journal of biological chemistry* 269, 13207-13215.
- Lee, K.H. (1968). Studies on the mechanism of action of salicylates. 3. Effect of vitamin A on the wound healing retardation action of aspirin. *Journal of pharmaceutical sciences* 57, 1238-1240.
- Lee, K.H., and Tong, T.G. (1969). Studies on the mechanism of action of salicylates. VI. Effect of topical application of retinoic acid on wound-healing retardation action of salicylic acid. *Journal of pharmaceutical sciences* 58, 773-774.
- Lefevre, L., Gales, A., Olagner, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., Valentin, A., Auwerx, J., Pipy, B., and Coste, A. (2010). PPAR gamma Ligands Switched High Fat Diet-Induced Macrophage M2b Polarization toward M2a Thereby Improving Intestinal Candida Elimination. *PloS one* 5.
- Li, S., Sun, Y., Liang, C.P., Thorp, E.B., Han, S., Jehle, A.W., Saraswathi, V., Pridgen, B., Kanter, J.E., Li, R., *et al.* (2009). Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. *Circulation research* 105, 1072-1082.
- Limor, R., Sharon, O., Knoll, E., Many, A., Weisinger, G., and Stern, N. (2008). Lipoxygenase-derived metabolites are regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 expression in human vascular smooth muscle cells. *American journal of hypertension* 21, 219-223.
- Maderna, P., and Godson, C. (2003). Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 1639, 141-151.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 229, 176-185.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.
- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N.S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J.M., Kaya, G., Gonzalez, F.J., Zakany, J., *et al.* (2001). Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *The Journal of cell biology* 154, 799-814.
- Michalik, L., Feige, J.N., Gelman, L., Pedrazzini, T., Keller, H., Desvergne, B., and Wahli, W. (2005). Selective expression of a dominant-negative form of peroxisome proliferator-activated receptor in keratinocytes leads to impaired epidermal healing. *Molecular endocrinology* 19, 2335-2348.
- Montagner, A., Rando, G., Degueurce, G., Leuenberger, N., Michalik, L., and Wahli, W. (2011). New insights into the role of PPARs. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 85, 235-243.
- Naruhn, S., Meissner, W., Adhikary, T., Kaddatz, K., Klein, T., Watzler, B., Muller-Brusselbach, S., and Muller, R. (2010). 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. *Molecular pharmacology* 77, 171-184.
- Nohgawa, M., Sasada, M., Maeda, A., Asagoe, K., Harakawa, N., Takano, K., Yamamoto, K., and Okuma, M. (1997). Leukotriene B4-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. *J Leukoc Biol* 62, 203-209.
- Oberyszyn, T.M. (2007). Inflammation and wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 2993-2999.
- Parks, B.W., Black, L.L., Zimmerman, K.A., Metz, A.E., Steele, C., Murphy-Ullrich, J.E., and Kabarowski, J.H. (2013). CD36, but not G2A, modulates efferocytosis, inflammation, and fibrosis following bleomycin-induced lung injury. *Journal of lipid research* 54, 1114-1123.
- Rowlinson, S.W., Crews, B.C., Goodwin, D.C., Schneider, C., Gierse, J.K., and Marnett, L.J. (2000). Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5Z,8Z,11Z, 13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesize 15-(R)-hete. *The Journal of biological chemistry* 275, 6586-6591.
- Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 331-344.
- Samuelsson, B. (1991). Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 50 Suppl 1, 3-6.
- Schurmann, C., Goren, I., Linke, A., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2014). Deregulated unfolded protein response in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential connection to inflammatory and angiogenic disorders in diabetes-impaired wound healing. *Biochemical and biophysical research communications* 446, 195-200.
- Schwab Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., and Schwab erhan, C.N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874.
- Serhan, C.N. (1997). Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins* 53, 107-137.
- Serhan, C.N. (2005). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 141-162.
- Serhan, C.N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual review of immunology* 25, 101-137.
- Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92-101.
- Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., and Gronert, K. (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *The Journal of experimental medicine* 192, 1197-1204.

- Serhan, C.N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P.S., Porter, T.F., Oh, S.F., and Spite, M. (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine* 206, 15-23.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 122, 787-795.
- Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine* 341, 738-746.
- Tan, N.S., Michalik, L., Di-Poi, N., Desvergne, B., and Wahli, W. (2004). Critical roles of the nuclear receptor PPARbeta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta) in skin wound healing. *Biochemical Society transactions* 32, 97-102.
- Tian, H., Lu, Y., Shah, S.P., and Hong, S. (2011). Autacoid 14S,21R-dihydroxy-docosahexaenoic acid counteracts diabetic impairment of macrophage prohealing functions. *The American journal of pathology* 179, 1780-1791.
- Vandivier, R.W., Henson, P.M., and Douglas, I.S. (2006). Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* 129, 1673-1682.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology* 38, 97-120.
- Wallace, J.L. (2005). Recent advances in gastric ulcer therapeutics. *Current opinion in pharmacology* 5, 573-577.
- Wetzler, C., Kampfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 115, 245-253.
- White, E.S., and Mantovani, A.R. (2013). Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *The Journal of pathology* 229, 141-144.
- Yang, Y., Gocke, A.R., Lovett-Racke, A., Drew, P.D., and Racke, M.K. (2008). PPAR Alpha Regulation of the Immune Response and Autoimmune Encephalomyelitis. *PPAR research* 2008, 546753.

5. Utilisation d'acide acétylsalicylique pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique (ANNEXE 3 : FR 299 936)

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis la publication le 26 Juin 2014 d'un troisième brevet portant sur l'utilisation topique d'acide acétylsalicylique pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique (Dardenne et al., 2014)(Dardenne et al., 2014). Nous montrons à travers des résultats complémentaires que l'aspirine utilisé à des concentration comprise entre 200 μM et 4800 μM (soit entre $7,2 \cdot 10^{-3}$ et 0,173 mg par cm^2 pour une plaie d' 1cm^2) apporte un effet bénéfique sur la cicatrisation des plaies du patient diabétique. L'acide acétylsalicylique (ou l'un de ses sels) permet de rétablir une phase inflammatoire dite contrôlée (non prolongée et non exacerbée) et ainsi d'accélérer la cinétique de fermeture de la plaie.

PARTIE 3
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail réalisé au cours de cette thèse nous a permis de mettre en place une stratégie expérimentale permettant d'évaluer, *in vivo*, à l'aide de modèles murins spécifiques, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui accompagnent la dérégulation du processus cicatriciel chez des animaux diabétiques de type 2. Cette approche nous a aussi permis de mettre en place et d'évaluer une stratégie pharmacologique permettant d'accélérer la vitesse de cicatrisation dans ce contexte de diabète.

1. Mise en place d'un nouveau dispositif expérimental

La majorité des travaux portant sur la cicatrisation des plaies s'appuient essentiellement sur des modèles expérimentaux *in vitro* plus ou moins complexes ou sur des études histologiques chez l'animal. Si ces études ont permis des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes intervenant lors de la fermeture des plaies, de nombreux aspects restent non élucidés. Au cours de nos recherches, nous nous sommes attachés à explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la phase exsudative inflammatoire et dans la phase de résolution de l'inflammation.

La première difficulté que nous avons rencontrée a été la mise en place d'une méthode expérimentale nous permettant de suivre les étapes initiales de la réaction inflammatoire. Celles-ci étant déclenchées quelques heures après la réalisation de la lésion cutanée, la seule analyse de tissus cicatriciel permettait pas de suivre intégralement les phases exsudatives précoces. En effet, dès la réalisation de la plaie par excision de la peau (sur une surface de 78mm²) nous avons observé une forte exsudation, notamment chez les souris diabétiques (**Tableau 42**).

	J1	J2	J3	J4	J5	J7	J9
Db/Db NC	+	+	++	+	+	+/-	-
	0,5x10 ⁶	0,7x10 ⁶	1,0x10 ⁶	0,5x10 ⁶	0,5x10 ⁶	0,5x10 ⁶	
db/db	+	++	+++	+++	+++	+	-
	0,5x10 ⁶	1,0x10 ⁶	2,5x10 ⁶	3,5x10 ⁶	2,5x10 ⁶	1,5x10 ⁶	
HFD	+	++	+++	+++	+++	+	-
	0,5x10 ⁶	1,0x10 ⁶	2,5x10 ⁶	3,5x10 ⁶	2,5x10 ⁶	1,0x10 ⁶	

Tableau 42 :
Volume de l'exsudat prélevé et infiltration cellulaire. – absence d'exsudation ; +/- Suintement ; + Volume inférieur à 50µl ; ++ Volume compris entre 50 µl et 200 µl ; +++ Volume supérieur à 200 µl. Les valeurs représentent le nombre moyen des cellules contenues dans l'exsudat inflammatoire.

Notre premier objectif a été de mettre en place une stratégie expérimentale permettant (i) de suivre l'infiltration cellulaire au niveau de la lésion cutanée (ii) de caractériser les différents phénotypes des cellules inflammatoires au cours de la progression de la phase inflammatoire exsudative. Dans ce contexte, il était difficile de suivre l'évolution de ces paramètres lorsque la plaie était protégée par un pansement. En effet, l'absorption des cellules et médiateurs par le pansement rendait l'analyse de la phase exsudative impossible.

La récupération des cellules effectrices et des médiateurs inflammatoires nécessitait la mise en place autour de la lésion d'un dispositif permettant de collecter l'exsudat inflammatoire afin d'étudier la cinétique d'infiltration des cellules et des médiateurs. De tels dispositifs avaient déjà été utilisés dans d'autres études. Ils étaient implantés de manière invasive au niveau de la lésion cutanée (Sorg et al., 2007; Steintraesser et al., 2010). Nous avons exclu de tels dispositifs contraignants pour l'animal et

pouvant entraîner des variations au niveau des paramètres inflammatoires et pouvant modifier le déroulement du processus cicatriciel.

Ainsi, notre premier objectif a été de développer une chambre de cicatrisation innovante, parfaitement adaptée et conçue pour l'étude des mécanismes précoces et tardifs régissant la cicatrisation (Dardenne et al., 2013b). Ce dispositif a pu être réalisé au laboratoire et il a progressivement évolué grâce à la technologie de l'impression de petits objets à l'aide d'une imprimante 3D. Ce dispositif non invasif devait être biocompatible et ne pas aggraver la lésion lors de son implantation sur l'animal. Il devait être supporté par l'animal tout au long du processus cicatriciel et ne pas perturber son comportement. De par sa conception et sa fixation par adhésion sur le pourtour de la lésion, cette chambre devait protéger la plaie et permettre de recueillir l'ensemble des effecteurs produits au niveau de la plaie sans altérer la cinétique de cicatrisation. Il devait permettre d'injecter à travers un septum des traitements. La partie supérieure du dispositif devait être amovible de manière à permettre le contrôle journalier de l'évolution de la plaie et de faciliter l'archivage photographique et le traitement d'images (Dardenne et al., 2013a). Elle devait aussi permettre les échanges gazeux évitant tout risque de macération, d'hypoxie et en protégeant la plaie de l'environnement extérieur.

2. Choix du modèle murin pour les études *in vivo*

Le deuxième point a été le choix du modèle expérimental murin d'animaux diabétiques. Malgré l'apparition de nouveaux modèles, comme par exemple les souris NONcNZO10/LtJ notre choix s'est orienté vers les souris *db/db*. En effet, le diabète des souris NONcNZO10/LtJ était la conséquence de mutations polygéniques et était encore mal caractérisé (Fang et al., 2010; Leiter et al., 2013). Le diabète de type 2 des modèles murins les plus utilisés aujourd'hui est dû à des mutations monogéniques dans lesquelles le gène codant pour la leptine (souris *ob/ob*) ou pour son récepteur *obR1* (souris *db/db*) sont invalidés. Le modèle *db/db* est caractérisé par des troubles du métabolisme glucidique (Garris and Garris, 2003) qui conduisent à un excès de glucose plasmatique (Hummel et al., 1966) et à l'apparition d'un syndrome d'obésité (Gao et al., 2004). Ces particularités font de ces souris des modèles de choix dans l'étude de la cicatrisation dans un contexte de diabète de type II. On retrouve une grande partie de ces particularités également chez le modèle *ob/ob* (Coleman and Hummel, 1973), avec toutefois la présence d'un état diabétique non systématique.

Dans ce travail, nous avons choisi de ne pas utiliser systématiquement ces modèles de souris génétiquement modifiées. En effet, des données récentes suggèrent que la leptine, connu pour jouer un rôle de premier plan dans la fonction de régulation de la prise alimentaire, serait également impliquée dans les phases tardives de la cicatrisation. Cette adipokine jouerait un rôle modulateur prédominant dans les étapes de néovascolarisation et de réépithélialisation (Frank et al., 2000; Lin and Yan, 2007; Murad et al., 2003; Wen et al., 2012). Ainsi, avec le modèle *db/db*, il devenait alors difficile de déterminer la part de la dérégulation du processus inflammatoire dans le retard de cicatrisation chez le diabétique de type 2 si l'absence de leptine peut altérer les étapes finales de fermeture de plaie.

Dans ce contexte, afin de nous rapprocher de la physiopathologie du diabète de type 2 et de réduire l'impact de la leptine dans le processus de guérison, la plupart de nos études ont aussi été réalisées sur des souris rendues diabétiques après 16 semaines de régime riche en graisses (HFD). Ce diabète d'origine nutritionnelle est comparable à celui que l'on peut rencontrer chez l'homme. Il présente comme caractéristiques principales une résistance à l'insuline et une forte hyperglycémie (**Figure 43**). Ce type d'alimentation riche en graisses saturées (saindoux) permet d'induire des retards de cicatrisation retrouvés au cours du diabète de type 2 (Nascimento and Costa, 2006). Il est important

de souligner que ces modèles expérimentaux ne reproduisent pas de manière parfaite les plaies chroniques caractéristiques des patients diabétiques. Ceci étant certainement dû aux réactions inflammatoires de plus faible intensité chez la souris que chez l'homme (Seitz et al., 2010). Ainsi, dans tous les modèles murins diabétiques utilisés, la fermeture complète de la lésion cutanée est toujours observée. Finalement, nous arrivons à reproduire l'allongement de la durée de la cicatrisation, comme rencontrée chez de nombreux patients diabétiques, sans pour autant parvenir à la génération d'une plaie chronique qui ne cicatrise pas.

La comparaison des cinétiques de cicatrisation des souris en régime HFD et de souris nourries avec un régime standard (NC) montre un délai de fermeture des plaies de plusieurs jours entre les souris HFD diabétiques (HFD) et non diabétiques (NC). Ainsi la fermeture de la plaie chez l'animal non diabétique prend environ 14 jours alors que pour l'animal diabétique le processus cicatriciel perdure au-delà de 18 jours. Toutefois, ce délai de fermeture des plaies est moins prononcé entre les souris HFD et NC qu'entre les souris diabétiques *db/db* et les souris hétérozygotes *db/+* non diabétiques, avec une fermeture totale de la lésion pouvant prendre jusqu' 25 jours. Cette différence peut être due d'une part à l'effet de l'absence de leptine lors de la phase tardive de cicatrisation mais aussi à une phase inflammatoire plus longue chez les souris *db/db* que chez les souris HFD. Finalement, ces deux modèles murins apparaissent complémentaires dans le cadre d'études du processus cicatriciel chez le diabétique de type 2.

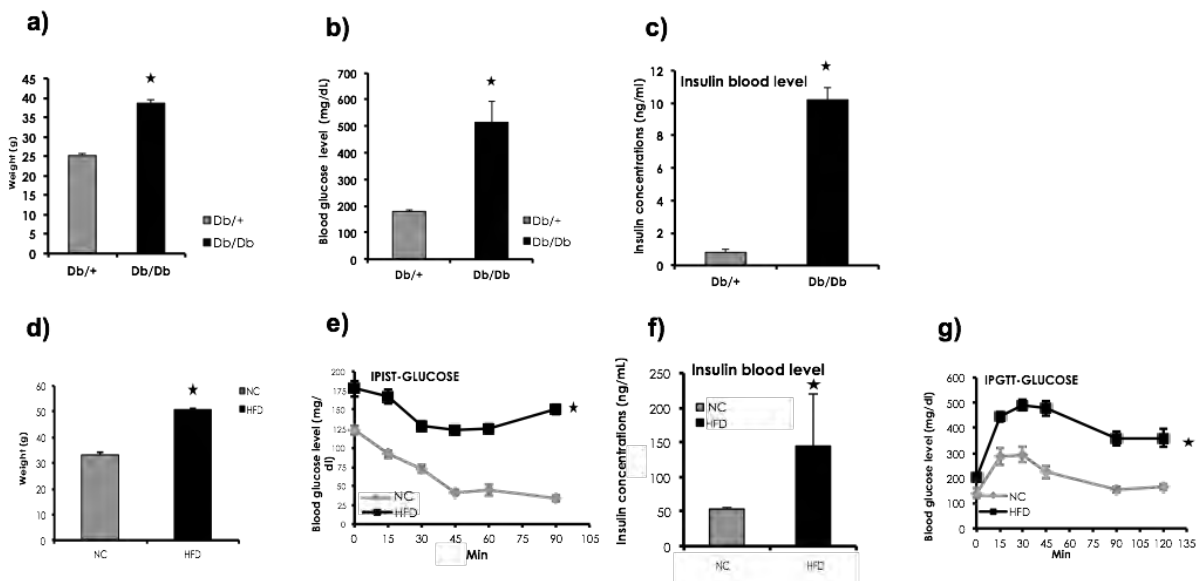


Figure 43 : Validation du modèle de diabète nutritionnel induit (HFD). **a-d)** Comparaison des poids entre les souris diabétiques (*Db/Db* et HFD) et non diabétiques (*Db/+* et NC). **b)** Glycémie à jeun des souris *Db/+* et *Db/Db*. **c-d)** Insulinémie des souris diabétiques (*Db/Db* et HFD) et non diabétiques (*Db/+* et NC). **e)** IPIST réalisée à jeun par injection d'insuline (0,5U par kg). **g)** IPIGTT réalisée à jeun par injection d'une solution saline (NaCl) à 20% de glucose (1g par kg). ★ Significativité $P < 0,01$ entre les souris *Db/Db* comparées aux souris *Db/+* et entre les souris HFD comparées au souris NC

3. Les macrophages dans la résolution de la phase inflammatoire de la cicatrisation

Afin de limiter l'extension des dégâts tissulaires au cours d'un processus inflammatoire, les cellules inflammatoires, notamment les PNNs, doivent être rapidement éliminées. Pour cela, ces cellules inflammatoires doivent rentrer rapidement en apoptose et être éliminées par efférocytose par des macrophages. Le processus d'efférocytose évite une nécrose secondaire qui amplifierait l'état inflammatoire de la plaie (Majno and Joris, 1995). Dans le cadre du diabète, de précédentes études ont pu mettre en évidence une infiltration de PNNs anormalement importante durant la phase inflammatoire du processus cicatriciel (Wetzler et al., 2000).

Notre dispositif non invasif nous a permis de récupérer l'exsudat inflammatoire produit au niveau de la plaie dès les premiers jours après lésion et de déterminer les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules qui le composent. Ainsi, nous avons pu confirmer que l'exsudat récolté chez les souris HFD diabétiques présentait une population de PNNs beaucoup plus importante que dans l'exsudat des souris non diabétiques (NC). Cet exsudat inflammatoire des souris diabétiques persiste également jusqu'à 7 jours après la lésion contrairement aux souris NC. Plusieurs faits concourent au retard de l'arrêt de l'inflammation chez les souris diabétiques. Ainsi, nous avons observé un taux plus élevé de LTB₄ dans l'exsudat et dans le tissu des animaux diabétiques.

Nous avons aussi établi que le nombre plus élevé de neutrophiles dans l'exsudat des souris diabétiques était corrélé à un défaut d'afflux de macrophages. De par leur plasticité phénotypique et fonctionnelle les macrophages participent à l'initiation et à l'arrêt de l'inflammation, notamment à travers l'élimination des cellules apoptotiques. Des études réalisées *in vitro* ont montré clairement que les macrophages provenant de plaies de souris diabétiques *db/db* présentaient un défaut de clairance des cellules apoptotiques (Khanna et al., 2010). Nous montrons que les macrophages de l'exsudat des plaies de souris diabétiques présentent un défaut d'efférocytose des neutrophiles apoptotiques corrélé à un défaut d'expression du CD36. Ces données établies *in vivo*, confirment les dérégulations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes/macrophages de sujets diabétiques établies par ailleurs (Cucak et al., 2014).

Dans des études précédentes, nous avons établi qu'un régime hyperlipidique diabéto-gène entraînait une polarisation M2b des macrophages péritonéaux de souris (TNF- α ^{high}, IL-10^{high}, MR⁺, Dectin-1⁺) (Lefevre et al., 2010a). Nous montrons ici, une forte proportion de macrophages inflammatoires M1 et M2b dans l'exsudat des souris diabétiques. Cette infiltration au niveau de la plaie de macrophages à potentialité inflammatoire s'accompagne d'un défaut d'apparition de macrophages impliqués dans la résolution de l'inflammation.

S'il est admis aujourd'hui que les macrophages évoluent au cours du processus cicatriciel de macrophages pro-inflammatoires M1 activés classiquement vers des macrophages M2 qui contribuent à la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Brancato and Albina, 2011), il est encore mal compris quelles sont les caractéristiques phénotypiques des macrophages qui favorisent ces deux étapes clés de la cicatrisation. En effet, des travaux récents n'ont pas permis d'établir l'effet bénéfique des macrophages M2a et M2c dans l'amélioration du processus cicatriciel chez les sujets diabétiques (Jetten et al., 2014). Ces auteurs ont montré que l'injection au niveau des lésions cutanées de macrophages polarisés *in vitro* avec l'IL-4 (M2a) ou avec l'IL-10 (M2c) retarde la fermeture des plaies chez les souris diabétiques *db/db*. Cependant, il est légitime de penser que la polarisation des macrophages réalisée « *in vitro* » ne tient pas compte de la complexité de l'environnement cicatriciel rencontré *in vivo*, (présence de PNNs apoptotiques, cytokines pro- et ou anti-inflammatoires et autres facteurs de croissance). Ainsi, les macrophages polarisés *in vitro* M2a par l'IL-4 ou M2c par l'IL-10 ne sont pas forcément l'image des macrophages anti-inflammatoires ou réparateurs présents sur le site lésionnel. Cela confirme la complexité de la polarisation des macrophages dans un contexte cicatriciel (**Figure 44**).

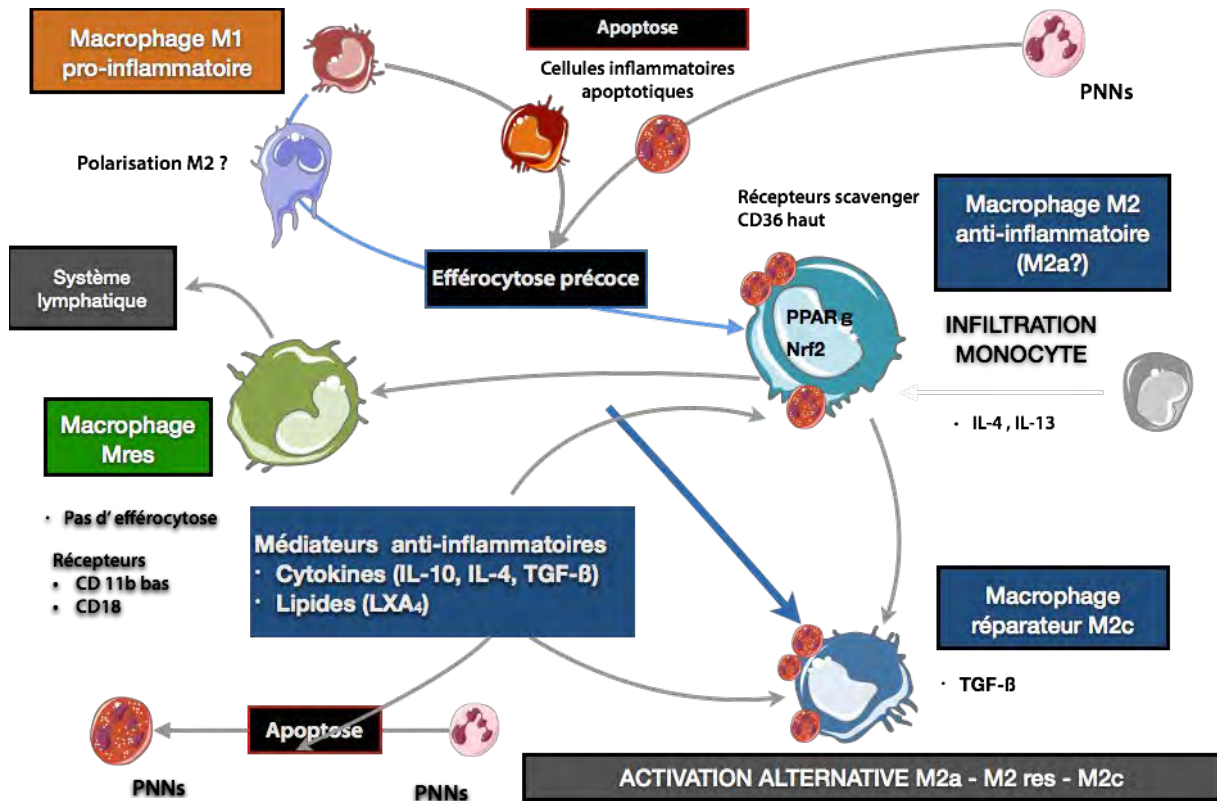


Figure 44 : Le macrophage dans la résolution de l'inflammation.

La résolution de l'inflammation initiée par un certain nombre de médiateurs d'origine lipidique conditionne le bon déroulement des phases plus tardives du processus cicatriciel. Les médiateurs impliqués dans la résolution de l'inflammation, produits entre autres par des macrophages M2, proviennent du métabolisme des acides gras polyinsaturés comme notamment de l'acide arachidonique (Serhan, 2014). Notre modèle expérimental nous a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'équilibre entre les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (LTB₄) et anti-inflammatoires (LXA₄) chez les animaux diabétiques. En effet, nous observons une augmentation plus importante du LTB₄, qui perdure dans le temps chez ces animaux. Le fort pouvoir chimioattractant du LTB₄ pour les neutrophiles soutient l'hypothèse d'un afflux plus important des PNNs sur le site lésionnel. L'augmentation de la production de LTB₄ chez les diabétiques est associée à une surexpression du gène codant pour la LTA₄ hydrolase, enzyme clé pour la synthèse du LTB₄. De manière intéressante, chez les souris non diabétiques, l'orientation du métabolisme de l'AA vers la production de LXA₄ se fait au dépend de la production de LTB₄ et s'accompagne d'une baisse d'expression de la LTA₄ hydrolase. Ces observations vont dans le sens d'une altération de la balance LXA₄/LTB₄, qui conditionnerait la persistance de l'inflammation au niveau de la lésion des souris diabétiques.

4. Le traitement des plaies par l'aspirine améliore le processus cicatriciel des souris diabétiques

Dans notre modèle expérimental, le retard de cicatrisation des animaux diabétiques s'accompagne d'un retard de la phase de résolution de l'inflammation. Pour accélérer le processus cicatriciel de ces animaux diabétiques, nous avons ciblé la phase inflammatoire par approche pharmacologique originale. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser l'aspirine appliquée par voie topique à faible dose au niveau de la plaie. L'aspirine qui inhibe la production des prostanoïdes, favorise, à la différence des autres anti-inflammatoires non-stéroïdiens, la voie de synthèse de médiateurs lipidiques capables de déclencher la résolution de l'inflammation (Serhan, 2005). L'administration d'aspirine par voie topique, devrait permettre d'obtenir une synthèse locale d'épi-lipoxines via l'axe métabolique COX-2/5-LOX (Claria and Serhan, 1995; Serhan, 1997). Ces épi-lipoxines sont capables, comme les lipoxines, de favoriser l'apoptose de cellules inflammatoires et leur élimination via des macrophages polarisés M2 exprimant fortement les récepteurs scavenger (Mitchell et al., 2002). L'intérêt d'utiliser la voie topique pour administrer l'aspirine était validé par des données de la littérature qui montraient que des patchs contenant des doses faibles d'aspirine (80mg) permettaient le passage transdermique de l'aspirine, et que celui-ci conservait ses propriétés pharmacologiques après passage transdermique (McAdam et al., 1996).

Outre les effets de l'aspirine sur la muqueuse digestive (Wallace, 2005), peu d'études ont exploré l'effet de l'aspirine sur la cicatrisation des plaies cutanées. Une étude récente (dos Santos and Monte-Alto-Costa, 2013) montre que l'aspirine administrée à forte dose (25mg/kg de poids corporel/jour) à des souris femelles ralentit la vitesse de cicatrisation de plaies cutanées en réduisant la production d'oestrogènes. L'aspirine n'a pas d'effet chez les souris mâles. Des retards de cicatrisation induits par l'aspirine avaient déjà été évoqués (Lee, 1968; Lee and Tong, 1969) lorsque cette molécule était administrée par voie orale à très forte dose. Inversement, l'administration quotidienne par voie orale de 300 mg d'aspirine réduit le temps de cicatrisation des ulcères des membres inférieurs chez des patients avec une insuffisance veineuse chronique (del Rio Sola et al., 2012).

Une des spécificités de l'aspirine est liée à un changement de mécanisme d'action en fonction de la concentration à laquelle elle est utilisée. Les effets bénéfiques de l'aspirine (effet antiagrégant plaquettaire, résolution de l'inflammation) apparaissent à faible dose. Les fortes doses d'aspirine peuvent réduire les effets bénéfiques de cette molécule (Bradlow and Chetty, 1982; Coleman and Alberts, 2006). Afin de promouvoir la synthèse de lipides bioactifs anti-inflammatoires, nous avons choisi une administration topique d'aspirine à faible dose (entre 10 et 40µg/plaie/jour). Cette dose est équivalente à un maximum de 80mg/jours pour une personne adulte. Le traitement des plaies a été commencé à partir de J3 post-lésion. Ce temps correspond à la fin de la phase inflammatoire du processus cicatriciel des souris non diabétiques. En effet, pour que l'aspirine déclenche la production d'épi-lipoxines, il faut que l'inflammation soit installée, que la cyclooxygénase-2 s'exprime et qu'elle soit acétylée.

De manière intéressante, nos résultats montrent pour la première fois que l'application topique de l'aspirine (entre 10 et 40 µg/plaie/jour) favorise la fermeture des plaies chez les souris diabétiques. Ces données font l'objet d'un brevet publié (Dardenne et al, 2014c). Des doses supérieures d'aspirine ont des effets délétères et retardent la cicatrisation. L'aspirine induit l'expression du CD36 des macrophages de souris diabétiques. Nous montrons que cette induction favorise l'efférocytose des PNNs par ces macrophages et contribue ainsi à diminuer l'état inflammatoire de la plaie. Des gènes

caractéristiques d'une polarisation M2c des macrophages (IL-10, YM1 et récepteur CCR2) sont aussi fortement induits lors du traitement des plaies des souris diabétiques par l'acide acétylsalicylique.

Ainsi, nos travaux apportent de nouvelles données illustrant l'effet de l'aspirine administrée par voie topique au niveau du site lésionnel à promouvoir l'apparition de macrophages de type 2 à potentiel anti-inflammatoire. D'autres études seront nécessaires pour déterminer plus précisément le phénotype des macrophages polarisés par l'aspirine et pour établir si ces macrophages proviennent de macrophages nouvellement recrutés ou de macrophages déjà présents au sein de la lésion cutanée.

5. L'aspirine améliore le processus cicatriciel des animaux diabétiques via un mécanisme original impliquant la 5-lipoxygénase et la 12/15-lipoxygénase

Il est admis classiquement que l'aspirine agit sur l'orientation du métabolisme des AGPI, notamment de l'AA, via l'acétylation de l'activité cyclooxygénase de COX-2 tout en préservant l'activité peroxydase de l'enzyme. Ainsi, l'aspirine favorise via COX-2 acétylé la génération de 15(R)-HETE (Lecomte et al., 1994). Ce métabolite est un substrat de la 5-LOX et contribue à la production de 15-épi-LXA₄ (**Figure 45A**) ayant les propriétés anti-inflammatoires de la LXA₄ (Takano et al., 1997). De manière surprenante la 15-épi LXA₄ n'a pas été détectée dans l'exsudat des souris diabétiques traitées par l'aspirine J5 post lésion. De plus, la 15-épi LXA₄ reste à un niveau très faible dans le tissu à J7 post lésion chez ces souris diabétiques. Inversement, de manière inattendue l'aspirine favorise la production de LXA₄ à J7 post-lésion corrélée avec une surexpression du gène codant pour la 12/15-LOX (**Figure 45B**) et une inhibition de la LTA₄h (**Figure 45C**).

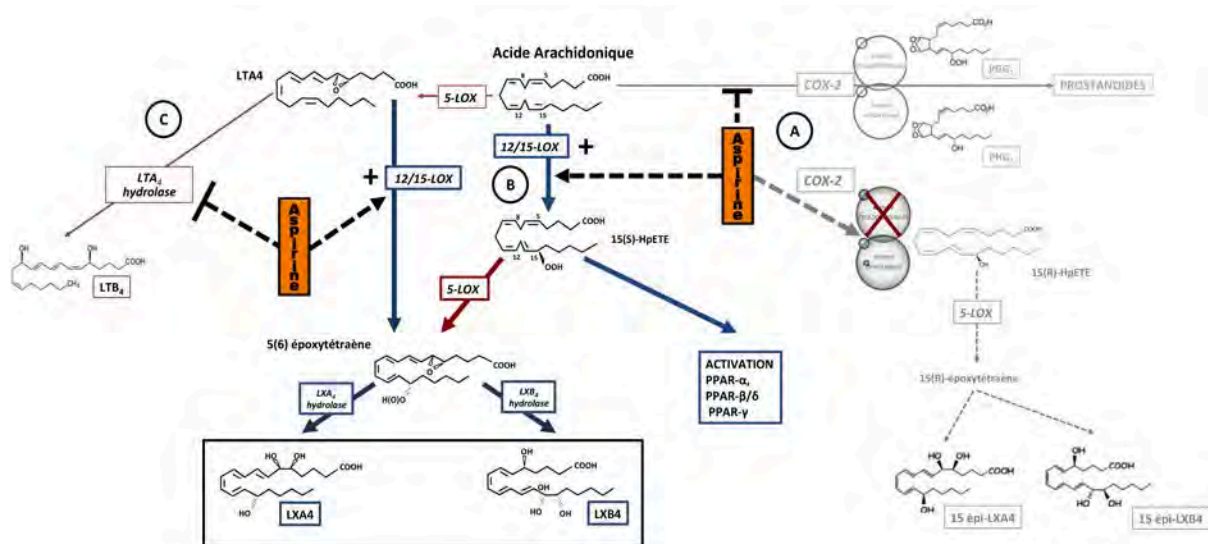


Figure 45 : Mécanisme d'action de l'aspirine et modulation du métabolisme de l'AA chez les animaux diabétiques. **A**) L'acétylation de COX-2 par l'aspirine permet la production préférentielle à partir d'AA de 15(R)-HpETE et de 15-épi-LXA₄/LXB₄ et non plus de PGG₂/PGH₂ à l'origine des nombreux prostanoides. Chez les souris diabétiques cette voie métabolique ne semble pas être fonctionnelle. **B**) Chez les souris diabétiques, l'administration d'aspirine a pour conséquence l'induction de la 12/15-LOX, pour donner du 15(S)-HpETE à l'origine de la synthèse des lipoxines. A travers ce mécanisme original, l'aspirine agirait préférentiellement sur la cicatrisation via la production de lipoxines (LXA₄) et non pas de 15-épi-LXA₄. **C**) Dans le cadre du diabète, l'axe 5-LOX/LTA₄h est privilégié (forte production de LTB₄). L'action combinée de l'aspirine à la fois sur l'inhibition de la LTA₄h et sur l'induction de la 12/15-LOX favorise d'autant plus, la génération de lipoxines.

Au vu de ces résultats et afin de comprendre les mécanismes d'action de l'aspirine dans notre modèle expérimental, nous avons utilisé des modèles murins invalidés pour les gènes codant pour la 5-LOX et pour la 12/15-LOX. L'étude de la cinétique de fermeture des plaies cutanées de souris dont le gène codant la 5-LOX est invalidé nous a permis de démontrer que l'absence de cette enzyme supprime l'efficacité du traitement à l'aspirine sur le processus cicatriciel des souris diabétiques (**Figure 46A**). Le rétablissement de l'effet de l'aspirine sur des souris invalidées pour la 5-LOX par l'application topique journalière de 140ng de LTA₄ confirme l'implication de la 5-LOX dans l'effet de l'aspirine. De plus, comme la LTA₄ hydrolase et la production du LTB₄ (exsudat et tissu) sont inhibées par le traitement à l'aspirine, le LTA₄ exogène appliqué sur les plaies doit être préférentiellement métabolisé en LXA₄ via la 12/15-LOX (**Figure 46B**).

L'étude sur des souris diabétiques dont le gène codant pour la 12/15 LOX est invalidé montre l'importance de cette enzyme dans le mécanisme d'action de l'aspirine sur le processus de cicatrisation. En effet, l'étude de la cinétique de fermeture des plaies cutanées montre clairement que l'absence de cette enzyme supprime l'efficacité du traitement à l'aspirine. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'aspirine agirait préférentiellement via la 12/15-LOX et la production de lipoxines, plutôt que via l'acétylation de COX-2 et la production de 15-épi lipoxines. En effet en présence de COX-2 l'aspirine aurait dû corriger le retard de cicatrisation des souris diabétiques et non diabétiques même chez les souris invalidées pour la 12/15-LOX. Le traitement des plaies des souris diabétiques invalidées pour la 12/15 LOX avec 10 ng de LPS (un puissant inducteur de COX-2) restaure en partie l'effet bénéfique de l'aspirine (**FIGURE 46E**). Ces données suggèrent que la faible production de 15-épi LXA₄ pourrait résulter d'un défaut d'expression et/ou d'acétylation de COX-2.

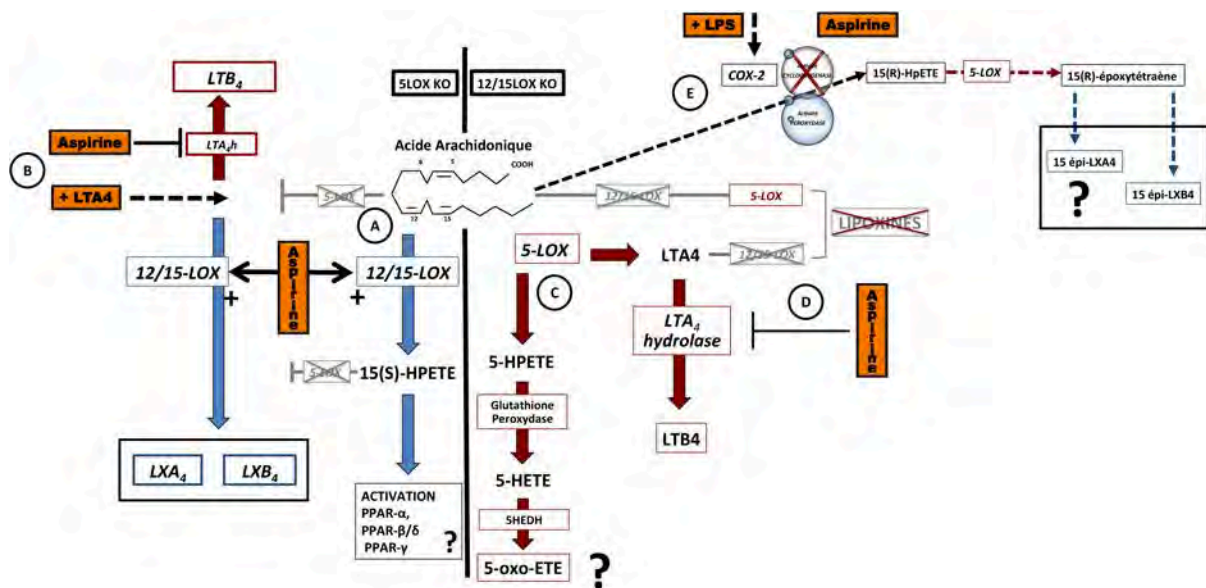


Figure 46 : Métabolisme de l'AA dans les modèles murins 5-LOX KO et 12/15-LOX KO A) L'invalidation de la 5-LOX bloque la génération de LTB₄ pro-inflammatoire mais également la synthèse des lipoxines à potentialités anti-inflammatoires. L'AA, via la 12/15 lipoxygénase fonctionnelle, va être métabolisé en 15(S)-HPETE. B) L'administration d'aspirine induit la 12/15-LOX, et favorise la synthèse de 15(S)-HpETE qui n'est pas un facteur suffisant pour favoriser la cicatrisation chez les souris 5-LOX KO diabétiques. L'ajout de LTA₄ sur la plaie, conduit à la production préférentielle de LTB₄ chez les souris diabétiques. L'aspirine, qui inhibe à la fois la LTA₄h et induit la 12/15-LOX, promeut la génération de lipoxines. C) L'invalidation de la 12/15 LOX a pour conséquence d'une part de favoriser les voies métaboliques à caractère inflammatoires via la production de LTB₄ et de 5-Oxo-EETE et d'autre part de supprimer la synthèse des lipoxines. D) L'aspirine n'a pas d'effet bénéfique sur la cicatrisation des souris 12/15-LOX KO diabétiques et non diabétiques. L'inhibition de la LTA₄h par l'aspirine n'est pas suffisante pour améliorer la cicatrisation. E) L'ajout de LPS pour induire COX-2, permet de retrouver l'effet bénéfique de l'aspirine sur la fermeture des plaies. La génération d'épi-lipoxines devra être démontrée.

Finalement, le mécanisme de l'aspirine sur la vitesse de cicatrisation des souris diabétiques implique à la fois la 5-LOX et la 12/15-LOX. L'induction de la 12/15-LOX par l'aspirine est une donnée nouvelle que nous avons pu valider *in vitro* sur des macrophages péritonéaux de souris. Il nous reste à établir *in vitro* et *in vivo* que cette induction implique des macrophages M2. En effet, il est établi que les macrophages polarisés M2a par IL-13 et l'IL-4 sont caractérisés par une forte induction de la 12/15-LOX (Nassar et al., 1994; Wuest et al., 2012; Yang et al., 2002). Une défaillance de différenciation des macrophages vers un phénotype M2a/c, comme cela est rencontré chez les souris diabétiques, pourrait entraîner un défaut d'expression de la 12/15 LOX et ainsi un défaut de résolution de l'inflammation.

6. LA 12/15 LIPOXYGENASE EST UNE ENZYME CLEF DU PROCESSUS CICATRICIEL

De manière intéressante, nos travaux montrent pour la première fois que les souris invalidées pour 12/15-LOX non diabétiques ont un défaut de cicatrisation comparable à celui des souris diabétiques sauvages ; alors que la délétion du gène de la 5-LOX a une incidence plus limitée sur la cicatrisation des animaux non diabétiques. Ces résultats soulignent l'importance de la 12/15-LOX dans la production de médiateurs lipidiques impliqués dans la résolution de l'inflammation et la fermeture de la plaie.

L'exacerbation limitée de la phase inflammatoire du processus de cicatrisation chez les souris invalidées pour 5-LOX non diabétiques pourrait résulter de la production, via la 12/15-LOX, de métabolites de l'AA ayant des propriétés anti-inflammatoires et favorisant la cicatrisation. En effet, les métabolites de l'AA provenant de la 12/15-LOX, notamment le 15-HETE, sont des ligands des isotypes des Peroxisome proliferator-activated receptors- α - β - δ - γ (PPAR- α ; PPAR- β/δ et PPAR- γ) (Huang et al., 1999; Kozak et al., 2002; Limor et al., 2008; Naruhn et al., 2010). Ces récepteurs nucléaires dont l'activité est induite par des ligands de nature lipidique contrôlent de nombreux processus cellulaires et métaboliques. Les 3 isotypes (alpha, beta/delta et gamma) qui présentent des distributions tissulaires différentes remplissent des fonctions spécifiques. PPAR- α et PPAR- γ contrôlent le métabolisme lipidique, l'homéostasie énergétique et les réponses inflammatoires. Ils sont impliqués dans le contrôle de maladies chroniques, telles que le diabète, l'obésité et l'athérosclérose (Abdelrahman et al., 2005; Bertin et al., 2013; Campbell, 2005; Yang et al., 2008). PPAR- α , PPAR- β/δ contribuent à la maturation épidermique et à la réparation des plaies cutanées (Chong et al., 2009; Michalik et al., 2005; Montagner et al., 2011; Tan et al., 2004). Cependant, chez les souris diabétiques, l'axe 12/15-LOX/PPARs n'est pas suffisant, même en présence d'aspirine, pour améliorer la cicatrisation. Ces résultats peuvent s'expliquer par un défaut d'expression des récepteurs PPARs qui pourrait rendre ce mécanisme de compensation inefficace (Hu et al., 2013; Kanie et al., 2003; Michalik et al., 2001). Dans ce cas, l'apport de LTA₄ est nécessaire pour compenser l'absence de 5-LOX et améliorer la fermeture des plaies via la production de lipoxines.

Dans le cas des souris invalidées pour la 12/15-LOX, le métabolisme de l'AA pourrait être dévié vers la production de LTB₄ via la 5-LOX et la LTA₄ hydrolase (**FIGURE 43C**). La phase inflammatoire serait alors favorisée au détriment de son arrêt. Dans le cas d'un traitement par l'aspirine, la LTA₄ hydrolase est inhibée, le métabolisme de l'AA pourrait alors être dévié vers la synthèse de 5-HETE. Ce métabolite lipidique pourrait être oxydé par la 5-hydroxyeicosanoïde déshydrogénase (5-HEDH) en 5-OXO-ETE (**FIGURE 43D**). Cette molécule est fortement chimioattractante pour les éosinophiles (Powell and Rokach, 2013). Elle pourrait être à l'origine d'une réaction inflammatoire mal contrôlée qui pourrait alors s'amplifier dans le temps. En effet, nous avons constaté que le traitement par l'aspirine est mal supporté après une semaine d'application chez des souris dont le gène codant pour la 12/15-LOX est invalidé. A terme nous observons une mortalité plus élevée dans les groupes 12/15 LOX KO traités à l'aspirine.

7. CONCLUSION ET PERSPECTIVE

En résumé, le développement d'un nouveau dispositif expérimental nous a permis d'établir que le retard de cicatrisation chez la souris diabétique prend son origine dans un processus inflammatoire non contrôlé caractérisé par (i) une persistance des polynucléaires neutrophiles, (ii) un défaut de polarisation des macrophages ainsi que leur dérégulation fonctionnelle, notamment de leur capacité d'efférocytose des cellules inflammatoires apoptotiques.

De plus, nos travaux suggèrent que le métabolisme de l'acide arachidonique des souris diabétiques serait dérégulé, avec à la fois une augmentation de la synthèse de lipides bioactifs pro-inflammatoires (LTB₄) et une diminution de la production des lipides bioactifs anti-inflammatoires (lipoxines).

L'application topique d'une dose faible d'aspirine (entre 10 et 40µg/plaie/jour) accélère la fermeture des plaies chez les animaux diabétiques. Ce traitement favorise l'induction de la 12/15-LOX et la génération de macrophages M2 ayant un fort potentiel anti-inflammatoire. Ces macrophages, via leur activité d'efférocytose, participent au contrôle de l'inflammation et à la génération de nombreux médiateurs anti-inflammatoires.

Ce travail, souligne l'importance de la modulation, via l'aspirine, de la voie de la 12/15-LOX qui associée à la 5-LOX produirait des lipoxines aux propriétés pro-apoptotiques et anti-inflammatoires. Ces données nous ont amenés à déposer un brevet en vue d'utiliser une application topique de faibles doses d'aspirine pour contrôler la phase inflammatoire du processus cicatriciel et favoriser la cicatrisation de plaies chronique chez le patient diabétique.

Toutefois, bien que l'utilisation de modèles murins, que ce soit en recherche fondamentale ou en recherche préclinique, présente de nombreux avantages dans l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de cicatrisation, il est important de prendre en compte les limites de ces modèles expérimentaux. Ces limites sont dues aux particularités spécifiques de la peau de souris par rapport à la peau humaine (Galiano et al., 2004). En effet il existe des changements dans la cinétique de cicatrisations entre la souris et l'homme.

Les résultats que nous avons obtenus sur des modèles murins nous permettent de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de cicatrisation des plaies dans un contexte de diabète de type 2. Ils nous ont aussi permis d'identifier une nouvelle cible thérapeutique : **la réorientation du métabolisme des AGPI à travers la polarisation des macrophages**. Cette cible thérapeutique devra être validées chez des patients diabétiques.

Notre stratégie pharmacologique a permis de montrer que l'effet bénéfique d'une application topique à faible dose d'aspirine sur la cicatrisation des plaies du sujet diabétique implique un mécanisme d'action original : génération de LXA₄ et non de 15-épi-LXA₄. Ce mécanisme implique un rôle central de la 12/15-LOX. L'étude des médiateurs lipidiques produits par les souris invalidées pour la 5-LOX ou pour la 12/15 nous permettra de valider nos précédentes conclusions. Nous préciserons également pourquoi l'aspirine ne génère pas de 15-épi-LXA₄. Nous déterminerons si la voie COX-2 /15-épi-LXA₄ via l'induction préalable de COX-2 pourrait aussi de favoriser le processus cicatriciel des plaies des sujets diabétiques. Finalement, notre stratégie expérimentale suggère que la LXA₄ est le métabolite de l'AA indispensable au bon déroulement de la cicatrisation. L'application topique de LXA₄ sur des plaies de patients diabétiques devrait valider nos résultats et ouvrir de nouvelles perspectives de traitements.

Il est connu qu'outre les épi-lipoxines produite via COX-2 acétylé ou les lipoxines produites via la 12/15 lipoxigénase, d'autres médiateurs lipidiques aux potentialités anti-inflammatoires peuvent être

produits via ces deux enzymes. Ces médiateurs (resolvines, protectines) ont pour origine des AGPI n-3 tels que l'EPA et le DHA. Il sera donc intéressant de déterminer si un régime alimentaire riche en EPA et DHA potentialise l'effet bénéfique de l'aspirine sur la cicatrisation chez les patients diabétiques.

PARTIE 4
BIBLIOGRAPHIE

- Abdelrahman, M., Sivarajah, A., and Thiernermann, C. (2005). Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovascular research* 65, 772-781.
- Adams, D.L., Economides, J.R., Jocson, C.M., Parker, J.M., and Horton, J.C. (2011). A watertight acrylic-free titanium recording chamber for electrophysiology in behaving monkeys. *J Neurophysiol* 106, 1581-1590.
- Adamson, R. (2009). Role of macrophages in normal wound healing: an overview. *Journal of wound care* 18, 349-351.
- Afonso, P.V., Janka-Junttila, M., Lee, Y.J., McCann, C.P., Oliver, C.M., Amer, K.A., Losert, W., Cicerone, M.T., and Parent, C.A. (2012). LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Developmental cell* 22, 1079-1091.
- Aguilar-Ruiz, S.R., Torres-Aguilar, H., Gonzalez-Dominguez, E., Narvaez, J., Gonzalez-Perez, G., Vargas-Ayala, G., Meraz-Rios, M.A., Garcia-Zepeda, E.A., and Sanchez-Torres, C. (2011). Human CD16+ and CD16- monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. *J Leukoc Biol* 90, 1119-1131.
- Ahmad, J., Zubair, M., Malik, A., Siddiqui, M.A., and Wangnoo, S.K. (2012). Cathepsin-D, adiponectin, TNF-alpha, IL-6 and hsCRP plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlation with clinical variables: a multicentric study. *Foot (Edinb)* 22, 194-199.
- Alikhani, Z., Alikhani, M., Boyd, C.M., Nagao, K., Trackman, P.C., and Graves, D.T. (2005). Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 280, 12087-12095.
- Amano, S., Akutsu, N., Ogura, Y., and Nishiyama, T. (2004). Increase of laminin 5 synthesis in human keratinocytes by acute wound fluid, inflammatory cytokines and growth factors, and lysophospholipids. *The British journal of dermatology* 151, 961-970.
- Anderson, C.F., Gerber, J.S., and Mosser, D.M. (2002). Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *Journal of endotoxin research* 8, 477-481.
- Andersson, A., Kokkola, R., Wefer, J., Erlandsson-Harris, H., and Harris, R.A. (2004). Differential macrophage expression of IL-12 and IL-23 upon innate immune activation defines rat autoimmune susceptibility. *J Leukoc Biol* 76, 1118-1124.
- Apelqvist, J.A., and Lepantalo, M.J. (2012). The ulcerated leg: when to revascularize. *Diabetes Metab Res Rev* 28 Suppl 1, 30-35.
- Ariel, A., and Serhan, C.N. (2012). New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Frontiers in immunology* 3, 4.
- Ariens, R.A., Lai, T.S., Weisel, J.W., Greenberg, C.S., and Grant, P.J. (2002). Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 100, 743-754.
- Armstrong, D.G., and Jude, E.B. (2002). The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc* 92, 12-18.
- Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U.M., Grutzkau, A., and Henz, B.M. (1999). Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 8, 1-16.
- Aumailley, M., and Rousselle, P. (1999). Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 18, 19-28.
- Avram, A.S., Avram, M.M., and James, W.D. (2005). Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 671-683.
- Azzi, L., El-Alfy, M., Martel, C., and Labrie, F. (2005). Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol* 124, 22-27.
- Bachelez, H., Basset, S.N., Crickx, B. (2005). Les grandes fonctions de la peau. *Ann Dermatol Venereol* 132, 8S49-68.
- Back, M., Powell, W.S., Dahlen, S.E., Drazen, J.M., Evans, J.F., Serhan, C.N., Shimizu, T., Yokomizo, T., and Rovati, G.E. (2014). Update on leukotriene, lipoxin and oxoecosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *British journal of pharmacology* 171, 3551-3574.
- Baetselier, P.D., Namangala, B., Noel, W., Brys, L., Pays, E., and Beschin, A. (2001). Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. *International journal for parasitology* 31, 575-587.
- Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E.A. (1995). Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8527-8531.
- Bandyopadhyay, B., Fan, J., Guan, S., Li, Y., Chen, M., Woodley, D.T., and Li, W. (2006). A "traffic control" role for TGFbeta3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *J Cell Biol* 172, 1093-1105.

- Bangert, C., Brunner, P.M., and Stingl, G. (2011). Immune functions of the skin. *Clin Dermatol* 29, 360-376.
- Bannon, P., Wood, S., Restivo, T., Campbell, L., Hardman, M.J., and Mace, K.A. (2013). Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice. *Disease models & mechanisms* 6, 1434-1447.
- Barbul, A., and Regan, M.C. (1990). The regulatory role of T lymphocytes in wound healing. *The Journal of trauma* 30, S97-100.
- Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F., and Kopf, M. (1998). Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol* 8, 669-672.
- Barrandon, Y. (1998). [The biology of epidermal stem cells]. *Ann Dermatol Venereol* 125 Suppl 2, S5-6.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16, 585-601.
- Basavarajappa, D., Wan, M., Lukic, A., Steinhilber, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2014). Roles of coactosin-like protein (CLP) and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in cellular leukotriene biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 11371-11376.
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., and Rudich, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 89, 27-71.
- Basu, G.D., Tinder, T.L., Bradley, J.M., Tu, T., Hatstrup, C.L., Pockaj, B.A., and Mukherjee, P. (2006). Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances the efficacy of a breast cancer vaccine: role of IDO. *Journal of immunology* 177, 2391-2402.
- Bayat, A., McGrouther, D.A., and Ferguson, M.W. (2003). Skin scarring. *Bmj* 326, 88-92.
- Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M., and Schreml, S. (2012). Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 26, 812-820.
- Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1274-1278.
- Bellaye, P.S., Burgy, O., Causse, S., Garrido, C., and Bonniaud, P. (2014). Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil? *Pharmacology & therapeutics* 143, 119-132.
- Bennett, J.S. (2001). Platelet-fibrinogen interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 936, 340-354.
- Berge, U., Behrens, J., and Rattan, S.I. (2007). Sugar-induced premature aging and altered differentiation in human epidermal keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 524-529.
- Berridge, M.J. (2012). *Cell Signalling Biology*.
- Berry, A., Balard, P., Coste, A., Olganier, D., Lagane, C., Authier, H., Benoit-Vical, F., Lepert, J.C., Seguela, J.P., Magnaval, J.F., *et al.* (2007). IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. *European journal of immunology* 37, 1642-1652.
- Bertin, B., Dubuquoy, L., Colombel, J.F., and Desreumaux, P. (2013). PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Current drug targets* 14, 1501-1507.
- Bertin E, L.M. (1999). Physiopathologie du pied diabétique et de ses complications. *STV* 1, 30-37.
- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49, 3-8.
- Bhansali, A., Venkatesh, S., Dutta, P., Dhillon, M.S., Das, S., and Agrawal, A. (2009). Which is the better option: recombinant human PDGF-BB 0.01% gel or standard wound care, in diabetic neuropathic large plantar ulcers off-loaded by a customized contact cast? *Diabetes research and clinical practice* 83, e13-16.
- BioExigence (2014a). Blessures de monocouches de kératinocytes et de fibroblastes. In *Monocouches de fibroblastes et de kératinocytes blessés et derme blessé*.
- BioExigence (2014b). Lattices de collagène à rétraction libre. In *Derme équivalent*.
- BioExigence (2014c). Lattices de collagène sous contrainte. In *Derme équivalent*.
- Biology Discussion Forums For All Your Science Needs (2013). Wound healing by Primary / Secondary / Tertiary intention. (Biology-forums.com).

- Birrer, M. (2001). [Macroangiopathy in diabetes mellitus]. *VASA. Zeitschrift für Gefasskrankheiten* 30, 168-174.
- Bishop, A. (2008). Role of oxygen in wound healing. *Journal of wound care* 17, 399-402.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* 11, 889-896.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2012). Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism* 15, 432-437.
- Biteman, B., Hassan, I.R., Walker, E., Leedom, A.J., Dunn, M., Seta, F., Laniado-Schwartzman, M., and Gronert, K. (2007). Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 2257-2266.
- Blakytyn, R., and Jude, E. (2006). The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 23, 594-608.
- Blomme, E.A., Chinn, K.S., Hardy, M.M., Casler, J.J., Kim, S.H., Opsahl, A.C., Hall, W.A., Trajkovic, D., Khan, K.N., and Tripp, C.S. (2003). Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. *The British journal of dermatology* 148, 211-223.
- Bonnefont-Rousselot, D., Bastard, J.P., Jaudon, M.C., and Delattre, J. (2000). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26, 163-176.
- Borgeson, E., and Godson, C. (2012). Resolution of inflammation: therapeutic potential of pro-resolving lipids in type 2 diabetes mellitus and associated renal complications. *Frontiers in immunology* 3, 318.
- Borradori, L., and Sonnenberg, A. (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112, 411-418.
- Boulais, N., and Misery, L. (2007). Merkel cells. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57, 147-165.
- Boulais, N., and Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. *European journal of dermatology : EJD* 18, 119-127.
- Boulton, A.J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., and Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 366, 1719-1724.
- Bradlow, B.A., and Chetty, N. (1982). Dosage frequency for suppression of platelet function by low dose aspirin therapy. *Thrombosis research* 27, 99-110.
- Brancato, S.K., and Albina, J.E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology* 178, 19-25.
- Branchet, M.C., Boisnic, S., Frances, C., Lesty, C., and Robert, L. (1991). Morphometric analysis of dermal collagen fibers in normal human skin as a function of age. *Archives of gerontology and geriatrics* 13, 1-14.
- Brass, L.F., Zhu, L., and Stalker, T.J. (2005). Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *The Journal of clinical investigation* 115, 3385-3392.
- Breathnach, A., and Bannister, L. H. (1995). Integumental system: skin and breasts. In *Gray's anatomy* (Williams, P. L., ed) pp. 376-412, Churchill-Livingstone, New-York.
- Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., and Nischt, R. (2013). Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. *BioMed research international* 2013, 179784.
- Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 117, 1219-1222.
- Breuing, K., Eriksson, E., Liu, P., and Miller, D.R. (1992). Healing of partial thickness porcine skin wounds in a liquid environment. *The Journal of surgical research* 52, 50-58.
- Brew, K., Dinakarandian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-283.
- Briggaman, R.A., and Wheeler, C.E., Jr. (1975). The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol* 65, 71-84.
- Brombacher, F., Arendse, B., Peterson, R., Holscher, A., and Holscher, C. (2009). Analyzing classical and alternative macrophage activation in macrophage/neutrophil-specific IL-4 receptor-alpha-deficient mice. *Methods in molecular biology* 531, 225-252.

- Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., and Attinger, C.E. (2006). A brief history of wound care. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 6S-11S.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Buck, R.C. (1979). Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 767-784.
- Buckley, C.D., Gilroy, D.W., and Serhan, C.N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 40, 315-327.
- Bunting, S., Moncada, S., and Vane, J.R. (1983). The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *British medical bulletin* 39, 271-276.
- Burgeson, R.E., and Christiano, A.M. (1997). The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 9, 651-658.
- Bylund, J., Ericsson, J., and Oliw, E.H. (1998). Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic and linoleic acids by liquid chromatography-mass spectrometry with ion trap MS. *Analytical biochemistry* 265, 55-68.
- Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., van Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S., and Gilroy, D.W. (2008). Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112, 4117-4127.
- Caliskan, B., and Banoglu, E. (2013). Overview of recent drug discovery approaches for new generation leukotriene A4 hydrolase inhibitors. *Expert opinion on drug discovery* 8, 49-63.
- Calvin, M. (1998). Cutaneous wound repair. *Wounds* 10: 1, 12-32.
- Campbell, E.L., Louis, N.A., Tomassetti, S.E., Canny, G.O., Arita, M., Serhan, C.N., and Colgan, S.P. (2007). Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J* 21, 3162-3170.
- Campbell, I.W. (2005). The Clinical Significance of PPAR Gamma Agonism. *Current molecular medicine* 5, 349-363.
- Caputo, W.J., Beggs, D.J., DeFede, J.L., Simm, L., and Dharma, H. (2008). A prospective randomised controlled clinical trial comparing hydrosurgery debridement with conventional surgical debridement in lower extremity ulcers. *Int Wound J* 5, 288-294.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167, 377-388.
- Carpenter, S.L., and Mathew, P. (2008). Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 14, 1250-1254.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13926-13931.
- Chang, M.C., Lin, L.D., Zwei-Ching Chang, J., Huang, C.F., Chuang, F.H., Lee, J.J., Jeng, P.Y., Wang, T.M., and Jeng, J.H. (2012). Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 in dental pulp cells by interleukin-1beta: the role of prostanoids. *Journal of endodontics* 38, 774-779.
- Chapuis, J.F., and Agache, P. (1992). A new technique to study the mechanical properties of collagen lattices. *J Biomech* 25, 115-120.
- Chellan, G., Shivaprakash, S., Karimassery Ramaiyar, S., Varma, A.K., Varma, N., Thekkeparambil Sukumaran, M., Rohinivilasam Vasukutty, J., Bal, A., and Kumar, H. (2010). Spectrum and prevalence of fungi infecting deep tissues of lower-limb wounds in patients with type 2 diabetes. *J Clin Microbiol* 48, 2097-2102.
- Chen, C.E., Ko, J.Y., Fong, C.Y., and Juhn, R.J. (2010). Treatment of diabetic foot infection with hyperbaric oxygen therapy. *Foot Ankle Surg* 16, 91-95.
- Chen, H.T., Lin, H.D., Won, J.G., Lee, C.H., Wu, S.C., Lin, J.D., Juan, L.Y., Ho, L.T., and Tang, K.T. (2008). Cardiovascular autonomic neuropathy, autonomic symptoms and diabetic complications in 674 type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 82, 282-290.
- Chen, J.D., Kim, J.P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K.C., Kramer, R.H., and Woodley, D.T. (1993). Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Experimental cell research* 209, 216-223.

- Chen, X.W., Shen, Y., Sun, C.Y., Wu, F.X., Chen, Y., and Yang, C.D. (2011). Anti-class a scavenger receptor autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients impair phagocytic clearance of apoptotic cells by macrophages in vitro. *Arthritis research & therapy* 13, R9.
- Chery-Croze, S. (1983). Painful sensation induced by a thermal cutaneous stimulus. *Pain* 17, 109-137.
- Chiang, N., Gronert, K., Clish, C.B., O'Brien, J.A., Freeman, M.W., and Serhan, C.N. (1999). Leukotriene B4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. *The Journal of clinical investigation* 104, 309-316.
- Chiang, N., Serhan, C.N., Dahlen, S.E., Drazen, J.M., Hay, D.W., Rovati, G.E., Shimizu, T., Yokomizo, T., and Brink, C. (2006). The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacological reviews* 58, 463-487.
- Chong, H.C., Tan, M.J., Philippe, V., Tan, S.H., Tan, C.K., Ku, C.W., Goh, Y.Y., Wahli, W., Michalik, L., and Tan, N.S. (2009). Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *The Journal of cell biology* 184, 817-831.
- Chou, W.L., Chuang, L.M., Chou, C.C., Wang, A.H., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., and Chang, Z.F. (2007). Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *The Journal of biological chemistry* 282, 18162-18172.
- Chun, K.S., and Langenbach, R. (2007). A proposed COX-2 and PGE(2) receptor interaction in UV-exposed mouse skin. *Molecular carcinogenesis* 46, 699-704.
- Claria, J., and Serhan, C.N. (1995). Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9475-9479.
- Clark, R.A. (2010). Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol* 130, 362-370.
- Classen, A., Lloberas, J., and Celada, A. (2009). Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods in molecular biology* 531, 29-43.
- Clausen, B.E., and Kel, J.M. (2010). Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunology and cell biology* 88, 351-360.
- Clemetson, K.J., and Clemetson, J.M. (2007). Collagen receptors as potential targets for novel anti-platelet agents. *Current pharmaceutical design* 13, 2673-2683.
- Coleman, D.L., and Hummel, K.P. (1973). The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia* 9, 287-293.
- Coleman, J.L., and Alberts, M.J. (2006). Effect of aspirin dose, preparation, and withdrawal on platelet response in normal volunteers. *The American journal of cardiology* 98, 838-841.
- Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunological reviews* 262, 153-166.
- Colwell, A.S., Longaker, M.T., and Lorenz, H.P. (2003). Fetal wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, s1240-1248.
- Cooper, D., Russell, J., Chitman, K.D., Williams, M.C., Wolf, R.E., and Granger, D.N. (2004). Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286, H1895-1900.
- Cooper, D.M., Yu, E.Z., Hennessey, P., Ko, F., and Robson, M.C. (1994). Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* 219, 688-691; discussion 691-682.
- Cooray, S.N., Gobbetti, T., Montero-Melendez, T., McArthur, S., Thompson, D., Clark, A.J., Flower, R.J., and Perretti, M. (2013). Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 18232-18237.
- Copping, J.A., Cagney, G., Toomey, S., Kislinger, T., Belton, O., McRedmond, J.P., Cahill, D.J., Emili, A., Fitzgerald, D.J., and Maguire, P.B. (2004). Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 103, 2096-2104.
- Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M.D., Cassaing, S., Lepert, J.C., Balard, P., Chalmeton, S., Bernad, J., Orfila, C., Seguela, J.P., and Pipy, B. (2003). PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 19, 329-339.

- Coste, A., Lagane, C., Filipe, C., Authier, H., Gales, A., Bernad, J., Douin-Echinard, V., Lepert, J.C., Balard, P., Linas, M.D., *et al.* (2008). IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2(-/-) mice via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Journal of immunology* 180, 4939-4947.
- Cotta-Pereira, G., Guerra Rodrigo, F., and Bittencourt-Sampaio, S. (1976). Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 66, 143-148.
- Coughlan, M.T., Thorburn, D.R., Penfold, S.A., Laskowski, A., Harcourt, B.E., Sourris, K.C., Tan, A.L., Fukami, K., Thallas-Bonke, V., Nawroth, P.P., *et al.* (2009). RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 20, 742-752.
- Cowen, T., Trigg, P., and Eady, R.A. (1979). Distribution of mast cells in human dermis: development of a mapping technique. *The British journal of dermatology* 100, 635-640.
- Cucak, H., Grunnet, L.G., and Rosendahl, A. (2014). Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 95, 149-160.
- Cullen, B., Smith, R., McCulloch, E., Silcock, D., and Morrison, L. (2002). Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 10, 16-25.
- Dalla Paola, L., and Faglia, E. (2006). Treatment of diabetic foot ulcer: an overview strategies for clinical approach. *Curr Diabetes Rev* 2, 431-447.
- Dalli, J., Montero-Melendez, T., McArthur, S., and Perretti, M. (2012). Annexin A1 N-terminal derived Peptide ac2-26 exerts chemokinetic effects on human neutrophils. *Frontiers in pharmacology* 3, 28.
- Daly, C.H. (1982). Biomechanical properties of dermis. *J Invest Dermatol* 79 Suppl 1, 17s-20s.
- Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., *et al.* (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31-40.
- Dardenne, C., Bouschbacher, M., Coste, A., Laurensou, C., and Pipy, B. (2013a). Methode d'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie a des niveau microscopique et macroscopique. L.U. (FR), S.d.d.e.d.r.i. (FR), U.P.S.T.I. (FR), and I.I.N.d.I.S.e.d.I.R.M. (FR), eds.
- Dardenne, C., Coste, A., and Pipy, B. (2014). Utilisation d'acide acétylsalicylique pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique. L.U. (FR), I.I.N.d.I.S.e.d.I.R.M. (FR), I.I.d.R.e.d.D. (FR), and U.P.S.T.I. (FR). eds. (FRANCE).
- Dardenne, C., Pipy, B., and Lamoise, M. (2013b). Dispositif non-invasif, destine a recevoir les exsudats d'une plaie, son utilisation et kit comprenant ledit dispositif. L.U. (FR), S.d.d.e.d.r.i. (FR), U.P.S.T.I. (FR), and I.I.N.d.I.S.e.d.I.R.M. (FR), eds.
- Darius, H., Binz, C., Veit, K., and Fisch, A. (1995). Augmented platelet-endothelial adhesion induced by PGI2 receptor desensitization. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research* 23, 427-429.
- de Boer, J.P., Creasey, A.A., Chang, A., Abbink, J.J., Roem, D., Eerenberg, A.J., Hack, C.E., and Taylor, F.B., Jr. (1993). Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infection and immunity* 61, 5035-5043.
- de Freitas, A., Banerjee, S., Xie, N., Cui, H., Davis, K.I., Friggeri, A., Fu, M., Abraham, E., and Liu, G. (2012). Identification of TLT2 as an engulfment receptor for apoptotic cells. *Journal of immunology* 188, 6381-6388.
- de Panfilis, G. (1996). Langerhans cells, dendritic cells, 'dendrocytes' and macrophages in normal human dermis. *The British journal of dermatology* 135, 652-653.
- Dean, R.A., Cox, J.H., Bellac, C.L., Doucet, A., Starr, A.E., and Overall, C.M. (2008). Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112, 3455-3464.
- Decline, F., and Rousselle, P. (2001). Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *Journal of cell science* 114, 811-823.
- del Rio Sola, M.L., Antonio, J., Fajardo, G., and Vaquero Puerta, C. (2012). Influence of aspirin therapy in the ulcer associated with chronic venous insufficiency. *Annals of vascular surgery* 26, 620-629.
- Delmas, P., Hao, J., and Rodat-Despoix, L. (2011). Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nature reviews. Neuroscience* 12, 139-153.

- Dennis, E.A. (2000). Phospholipase A2 in eicosanoid generation. *American journal of respiratory and critical care medicine* *161*, S32-35.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2011). Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical reviews* *111*, 6130-6185.
- Detmar, M. (1996). Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *J Invest Dermatol* *106*, 207-208.
- Diegelmann, R.F., and Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* *9*, 283-289.
- Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* *87*, 2095-2147.
- Dinh, T., Tecilazich, F., Kafanas, A., Doupis, J., Gnardellis, C., Leal, E., Tellechea, A., Pradhan, L., Lyons, T.E., Giurini, J.M., and Veves, A. (2012). Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* *61*, 2937-2947.
- DiPietro, L.A. (1995). Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* *4*, 233-240.
- Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology* *11*, 98-107.
- dos Santos, J.S., and Monte-Alto-Costa, A. (2013). Female, but not male, mice show delayed cutaneous wound healing following aspirin administration. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* *40*, 90-96.
- Dovi, J.V., He, L.K., and DiPietro, L.A. (2003). Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* *73*, 448-455.
- Dovi, J.V., Szpaderska, A.M., and DiPietro, L.A. (2004). Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost* *92*, 275-280.
- Downey, J.A., Huckaba, C.E., and Darling, R.C. (1971). The effect of skin and central cooling on human thermoregulation. *Int J Biometeorol* *15*, 171-175.
- Downing, D.T., Stewart, M.E., Wertz, P.W., Colton, S.W., Abraham, W., and Strauss, J.S. (1987). Skin lipids: an update. *J Invest Dermatol* *88*, 2s-6s.
- Drela, E., Stankowska, K., Kulwas, A., and Rosc, D. (2012). Endothelial progenitor cells in diabetic foot syndrome. *Adv Clin Exp Med* *21*, 249-254.
- Duffield, J.S., Forbes, S.J., Constantinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., and Iredale, J.P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of clinical investigation* *115*, 56-65.
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., *et al.* (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* *110*, 4319-4330.
- Dumville, J.C., Deshpande, S., O'Meara, S., and Speak, K. (2011a). Foam dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*, CD009111.
- Dumville, J.C., Deshpande, S., O'Meara, S., and Speak, K. (2012a). Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* *2*, CD009099.
- Dumville, J.C., O'Meara, S., Deshpande, S., and Speak, K. (2011b). Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*, CD009101.
- Dumville, J.C., O'Meara, S., Deshpande, S., and Speak, K. (2012b). Alginate dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* *2*, CD009110.
- Dunlop, M. (2000). Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* *77*, S3-12.
- Dunn, J.A., Patrick, J.S., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1989). Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* *28*, 9464-9468.
- Dupasquier, M., Stoitzner, P., van Oudenaren, A., Romani, N., and Leenen, P.J. (2004). Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. *J Invest Dermatol* *123*, 876-879.
- Eckert, R.L. (1989). Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* *69*, 1316-1346.
- Edmonds, M. (2013). Modern treatment of infection and ischaemia to reduce major amputation in the diabetic foot. *Current pharmaceutical design* *19*, 5008-5015.

- Edwards, D.R., Leco, K.J., Beaudry, P.P., Atadja, P.W., Veillette, C., and Riabowol, K.T. (1996). Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp Gerontol* 31, 207-223.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P., and Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6, 1899-1904.
- Eguchi, J., Kong, X., Tenta, M., Wang, X., Kang, S., and Rosen, E.D. (2013). Interferon regulatory factor 4 regulates obesity-induced inflammation through regulation of adipose tissue macrophage polarization. *Diabetes* 62, 3394-3403.
- Ehrlich, H.P., and Rajaratnam, J.B. (1990). Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. *Tissue Cell* 22, 407-417.
- Ekambaram, P., Lambiv, W., Cazzolli, R., Ashton, A.W., and Honn, K.V. (2011). The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews* 30, 397-408.
- El Fekih, N., Tounsi, J., Kharfi, M., Zegloui, F., Turki, E., Fazaa, B., Gaigi, S., and Kamoun, M.R. (2006). [Foot and diabetic neuropathy: about 205 cases]. *La Tunisie medicale* 84, 225-228.
- El Kebir, D., and Filep, J.G. (2010). Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *TheScientificWorldJournal* 10, 1731-1748.
- Elias, P.M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 29, 3-14.
- Elmets, C.A., J, J.L., and Athar, M. (2014). Cyclooxygenases: Mediators of UV-Induced Skin Cancer and Potential Targets for Prevention. *J Invest Dermatol* 134, 2497-2502.
- Erwig, L.P., and Henson, P.M. (2007). Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *The American journal of pathology* 171, 2-8.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., and Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8.
- Evans, M.J., Van Winkle, L.S., Fanucchi, M.V., Toskala, E., Luck, E.C., Sannes, P.L., and Plopper, C.G. (2000). Three-dimensional organization of the lamina reticularis in the rat tracheal basement membrane zone. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22, 393-397.
- Fadeel, B., Xue, D., and Kagan, V. (2010). Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochemical and biophysical research communications* 396, 7-10.
- Fadini, G.P., Sartore, S., Agostini, C., and Avogaro, A. (2007). Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* 30, 1305-1313.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998a). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* 101, 890-898.
- Fadok, V.A., Warner, M.L., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1998b). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *Journal of immunology* 161, 6250-6257.
- Faglia, E., Clerici, G., Clerissi, J., Gabrielli, L., Losa, S., Mantero, M., Caminiti, M., Curci, V., Lupattelli, T., and Morabito, A. (2006). Early and five-year amputation and survival rate of diabetic patients with critical limb ischemia: data of a cohort study of 564 patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 32, 484-490.
- Falanga, V. (1993). Growth factors and wound healing. *J Dermatol Surg Oncol* 19, 711-714.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736-1743.
- Fang, R.C., Kryger, Z.B., Buck, D.W., 2nd, De la Garza, M., Galiano, R.D., and Mustoe, T.A. (2010). Limitations of the db/db mouse in translational wound healing research: Is the NONcNZO10 polygenic mouse model superior? *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 18, 605-613.
- Feigen, L.P., Chapnick, B.M., Hyman, A.L., King, L., Marascalco, B., and Kadowitz, P.J. (1980). Peripheral vasodilator effects of prostaglandins: comparison of 6-keto-prostaglandin E1 with prostacyclin and escape from prostaglandin E2 in the mesenteric vascular bed. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 214, 528-534.
- Fernandez-Montequin, J.I., Betancourt, B.Y., Leyva-Gonzalez, G., Mola, E.L., Galan-Naranjo, K., Ramirez-Navas, M., Bermudez-Rojas, S., Rosales, F., Garcia-Iglesias, E., Berlanga-Acosta, J., et al. (2009a). Intralesional administration of epidermal growth factor-based formulation (Heberprot-P) in chronic diabetic foot ulcer: treatment up to complete wound closure. *Int Wound J* 6, 67-72.

- Fernandez-Montequin, J.I., Infante-Cristia, E., Valenzuela-Silva, C., Franco-Perez, N., Savigne-Gutierrez, W., Artaza-Sanz, H., Morejon-Vega, L., Gonzalez-Benavides, C., Eliseo-Musenden, O., Garcia-Iglesias, E., *et al.* (2007). Intralesional injections of Citoprot-P (recombinant human epidermal growth factor) in advanced diabetic foot ulcers with risk of amputation. *Int Wound J* 4, 333-343.
- Fernandez-Montequin, J.I., Valenzuela-Silva, C.M., Diaz, O.G., Savigne, W., Sancho-Soutelo, N., Rivero-Fernandez, F., Sanchez-Penton, P., Morejon-Vega, L., Artaza-Sanz, H., Garcia-Herrera, A., *et al.* (2009b). Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Int Wound J* 6, 432-443.
- Ferracini, M., Rios, F.J., Pecenin, M., and Jancar, S. (2013). Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators of inflammation* 2013, 950273.
- Ferrante, C.J., and Leibovich, S.J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in wound care* 1, 10-16.
- Fery, F., and Paquot, N. (2005). [Etiopathogenesis and pathophysiology of type 2 diabetes]. *Rev Med Liege* 60, 361-368.
- Fine, J.D. (1991). Structure and antigenicity of the skin basement membrane zone. *J Cutan Pathol* 18, 401-409.
- Fink, S.P., Yamauchi, M., Nishihara, R., Jung, S., Kuchiba, A., Wu, K., Cho, E., Giovannucci, E., Fuchs, C.S., Ogino, S., *et al.* (2014). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Science translational medicine* 6, 233re232.
- Finn, A.V., Saeed, O., and Virmani, R. (2012). Macrophage subsets in human atherosclerosis. *Circulation research* 110, e64; author reply e65-66.
- Flier, J.S. (1995). The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* 80, 15-18.
- Fong, G.H. (2008). Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 11, 121-140.
- Fox, S., Leitch, A.E., Duffin, R., Haslett, C., and Rossi, A.G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity* 2, 216-227.
- Frank, S., Stallmeyer, B., Kampf, H., Kolb, N., and Pfeilschifter, J. (2000). Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *The Journal of clinical investigation* 106, 501-509.
- Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J., and Burrell, M.A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 280, E827-847.
- Fuentes, L., Wouters, K., Hannou, S.A., Cudejko, C., Rigamonti, E., Mayi, T.H., Derudas, B., Pattou, F., Chinetti-Gbaguidi, G., Staels, B., and Paumelle, R. (2011). Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia* 54, 3150-3156.
- Furie, B., and Furie, B.C. (2007). In vivo thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 Suppl 1, 12-17.
- Futagami, A., Ishizaki, M., Fukuda, Y., Kawana, S., and Yamanaka, N. (2002). Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 1503-1513.
- Gailani, D., and Renne, T. (2007). Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2507-2513.
- Gales, A., Conduche, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olganier, D., Beraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M.D., Auwerx, J., Coste, A., and Pipy, B. (2010). PPARgamma controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 6, e1000714.
- Galiano, R.D., Michaels, J.t., Dobryansky, M., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 12, 485-492.
- Ganz, M.B., and Seftel, A. (2000). Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 278, E146-152.
- Garris, D.R., and Garris, B.L. (2003). Diabetes (db/db) mutation-induced ovarian involution: progressive hypercytolipidemia. *Experimental biology and medicine* 228, 1040-1050.
- Geering, B., Gurzeler, U., Federzoni, E., Kaufmann, T., and Simon, H.U. (2011). A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood* 117, 5953-5962.

- Geering, B., and Simon, H.U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell death and differentiation* 18, 1457-1469.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
- Geras, A.J. (1990). *Dermatology, a medical artist's interpretation* Basle: Sandoz Medical Publications, 139 pages.
- Gerber, P.A., Buhren, B.A., Schrupf, H., Homey, B., Zlotnik, A., and Hevezi, P. (2014). The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. *Biological chemistry* 395, 577-591.
- Geske, F.J., Monks, J., Lehman, L., and Fadok, V.A. (2002). The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer, and regulator. *International journal of hematology* 76, 16-26.
- Ghosh, M., Tucker, D.E., Burchett, S.A., and Leslie, C.C. (2006). Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Progress in lipid research* 45, 487-510.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research* 107, 1058-1070.
- Gillery, P., Monboisse, J.C., Maquart, F.X., and Borel, J.P. (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab* 14, 25-30.
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature medicine* 5, 698-701.
- Gils, A., and J., D.P. (2003). *Plasminogen: Structure, Activation, and Regulation*.
- Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19, 257-267.
- Gleissner, C.A. (2012). Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Frontiers in physiology* 3, 1.
- Gleissner, C.A., Shaked, I., Little, K.M., and Ley, K. (2010). CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology* 184, 4810-4818.
- Godson, C., Mitchell, S., Harvey, K., Petasis, N.A., Hogg, N., and Brady, H.R. (2000). Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology* 164, 1663-1667.
- Goh, S.Y., and Cooper, M.E. (2008). Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1143-1152.
- Goldstein, B.J., Mahadev, K., Wu, X., Zhu, L., and Motoshima, H. (2005). Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1021-1031.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74, 111-122.
- Goodwin, C.W., and Heppenstall, R.B. (1977). The effect of chronic hypoxia on wound healing. *Adv Exp Med Biol* 94, 669-672.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology* 3, 23-35.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 5, 953-964.
- Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schurmann, C., Linke, A., Holdener, M., Waisman, A., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2009). A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *The American journal of pathology* 175, 132-147.
- Goren, I., Kampf, H., Podda, M., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2003). Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. *Diabetes* 52, 2821-2832.
- Goren, I., Muller, E., Schiefelbein, D., Christen, U., Pfeilschifter, J., Muhl, H., and Frank, S. (2007). Systemic anti-TNFalpha treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. *J Invest Dermatol* 127, 2259-2267.
- Gosain, A., and DiPietro, L.A. (2004). Aging and wound healing. *World journal of surgery* 28, 321-326.

- Gospodarowicz, D. (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249, 123-127.
- Grant, G.E., Rokach, J., and Powell, W.S. (2009). 5-Oxo-ETE and the OXE receptor. *Prostaglandins & other lipid mediators* 89, 98-104.
- Grassl, E.D., Oegema, T.R., and Tranquillo, R.T. (2002). Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J Biomed Mater Res* 60, 607-612.
- Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C.E., Schledzewski, K., and Goerdts, S. (2001). Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 53, 386-392.
- Gray, M., and Weir, D. (2007). Prevention and treatment of moisture-associated skin damage (maceration) in the periwound skin. *Journal of wound, ostomy, and continence nursing : official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society / WOCN* 34, 153-157.
- Greaves, N.S., Ashcroft, K.J., Baguneid, M., and Bayat, A. (2013). Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of dermatological science* 72, 206-217.
- Green, K.J., and Jones, J.C. (1996). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J* 10, 871-881.
- Greenberg, M.E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., and Hazen, S.L. (2006). Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 2613-2625.
- Greene, A.K., Puder, M., Roy, R., Arsenault, D., Kwei, S., Moses, M.A., and Orgill, D.P. (2006). Microdeformational wound therapy: effects on angiogenesis and matrix metalloproteinases in chronic wounds of 3 debilitated patients. *Ann Plast Surg* 56, 418-422.
- Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1019-1030.
- Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J., and Ross, R. (1990). PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *The American journal of pathology* 136, 1235-1246.
- Grice, E.A., and Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology* 9, 244-253.
- Griffis, C.D., Metcalfe, S., Bowling, F.L., Boulton, A.J., and Armstrong, D.G. (2009). The use of gentamycin-impregnated foam in the management of diabetic foot infections: a promising delivery system? *Expert Opin Drug Deliv* 6, 639-642.
- Gronert, K. (2005). Lipoxins in the eye and their role in wound healing. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 221-229.
- Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I.R., Dunn, M., and Laniado Schwartzman, M. (2005). A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *The Journal of biological chemistry* 280, 15267-15278.
- Guffanti, A. (2014). Negative pressure wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a systematic review of the literature. *Journal of wound, ostomy, and continence nursing : official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society / WOCN* 41, 233-237.
- Guillausseau, P.J., and Laloi-Michelin, M. (2003). [Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus]. *Rev Med Interne* 24, 730-737.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
- Guvakova, M.A. (2007). Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 890-909.
- Ha Van G, H.A., Marty L, Danan JP, Koskas F, Grimaldi A. (1997). Pied diabétique. *Endocrinologie Nutrition, Endocrinologie Nutrition*, 10-366-L-320.
- Hall, J.M., Cruser, D., Podawiltz, A., Mummert, D.L., Jones, H., and Mummert, M.E. (2012). Psychological Stress and the Cutaneous Immune Response: Roles of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Dermatology research and practice* 2012, 403908.
- Hamamoto, T., Yabuki, A., Yamato, O., Fujiki, M., Misumi, K., and Matsumoto, M. (2009). Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 induction during wound healing in dog skin. *Research in veterinary science* 87, 349-354.

- Hardison, S.E., Herrera, G., Young, M.L., Hole, C.R., Wozniak, K.L., and Wormley, F.L., Jr. (2012). Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *Journal of immunology* *189*, 4060-4068.
- Hart, J. (2002). Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* *11*, 205-209.
- Hata, A.N., and Breyer, R.M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* *103*, 147-166.
- Hatane, T., Yoshida, E., Kawano, J., Sugiki, M., Onitsuka, T., and Maruyama, M. (1998). Prostaglandin I₂ analog enhances the expression of urokinase-type plasminogen activator and wound healing in cultured human fibroblast. *Biochim Biophys Acta* *1403*, 189-198.
- Hayes, M.M., Lane, B.R., King, S.R., Markovitz, D.M., and Coffey, M.J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit HIV-1 replication in macrophages by transcriptional and post-transcriptional effects. *The Journal of biological chemistry* *277*, 16913-16919.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature immunology* *14*, 978-985.
- Held, T.K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D.V., and Cross, A.S. (1999). Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infection and immunity* *67*, 206-212.
- Hellstrom, M., Hellstrom, S., Engstrom-Laurent, A., and Berthoin, U. (2014). The structure of the basement membrane zone differs between keloids, hypertrophic scars and normal skin: A possible background to an impaired function. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*.
- Hern, S., and Mortimer, P.S. (1999). Visualization of dermal blood vessels--capillaroscopy. *Clinical and experimental dermatology* *24*, 473-478.
- Hickey, M.M., and Simon, M.C. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol* *76*, 217-257.
- Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* *127*, 526-537.
- Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., and Nagata, K. (2001). Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *The Journal of experimental medicine* *193*, 255-261.
- Hoffman, M., Harger, A., Lenkowski, A., Hedner, U., Roberts, H.R., and Monroe, D.M. (2006). Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood* *108*, 3053-3060.
- Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., and Sugimoto, Y. (2014). Prostanoid receptors and acute inflammation in skin. *Biochimie*.
- Holick, M.F. (2003). Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* *88*, 296-307.
- Holmes, C., Wrobel, J.S., Maceachern, M.P., and Boles, B.R. (2013). Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. *Diabetes Metab Syndr Obes* *6*, 17-29.
- Hong, S., Lu, Y., Tian, H., Alapure, B.V., Wang, Q., Bunnell, B.A., and Laborde, J.M. (2014a). Maresin-like Lipid Mediators Are Produced by Leukocytes and Platelets and Rescue Reparative Function of Diabetes-Impaired Macrophages. *Chemistry & biology* *21*, 1318-1329.
- Hong, S., Tian, H., Lu, Y., Laborde, J.M., Muhale, F.A., Wang, Q., Alapure, B.V., Serhan, C.N., and Bazan, N.G. (2014b). Neuroprotectin/Protectin D1: Endogenous Biosynthesis and Actions on Diabetic Macrophages in Promoting Wound Healing and Innervation Impaired by Diabetes. *American journal of physiology. Cell physiology*.
- Hosgood, G. (2006). Stages of wound healing and their clinical relevance. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* *36*, 667-685.
- Hould, R. (1982). *Le tégument (Décarie, Montréal)*.
- Hu, Y., Chen, Y., Ding, L., He, X., Takahashi, Y., Gao, Y., Shen, W., Cheng, R., Chen, Q., Qi, X., *et al.* (2013). Pathogenic role of diabetes-induced PPAR-alpha down-regulation in microvascular dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 15401-15406.
- Huang, J.S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., and Le Breton, G.C. (2004). Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. *Cellular signalling* *16*, 521-533.

- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., and Glass, C.K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400, 378-382.
- Hummel, K.P., Dickie, M.M., and Coleman, D.L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153, 1127-1128.
- Hunt, J.V., Dean, R.T., and Wolff, S.P. (1988). Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *The Biochemical journal* 256, 205-212.
- Hunt, J.V., Smith, C.C., and Wolff, S.P. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39, 1420-1424.
- Huysman, E., and Mathieu, C. (2009). Diabetes and peripheral vascular disease. *Acta chirurgica Belgica* 109, 587-594.
- Imachi, H., Murao, K., Hiramane, C., Sayo, Y., Sato, M., Hosokawa, H., Ishida, T., Kodama, T., Quehenberger, O., Steinberg, D., and Takahara, J. (2000). Human scavenger receptor B1 is involved in recognition of apoptotic thymocytes by thymic nurse cells. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 80, 263-270.
- Ingersoll, M.A., Platt, A.M., Potteaux, S., and Randolph, G.J. (2011). Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends in immunology* 32, 470-477.
- International Diabetes Federation (2012). *Diabetes Atlas Five Edition*.
- Ishida, Y., Gao, J.L., and Murphy, P.M. (2008). Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol* 180, 569-579.
- IWGDF (2012). International Working Group on the Diabetic Foot. In *Pathophysiology of foot ulceration*.
- Jackson, S.P. (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* 17, 1423-1436.
- Jacquemoud, C. (2007). *Caractérisation mécanique et modélisation du comportement jusqu'à rupture de membranes biologiques fibreuses : application à la peau humaine*. (Institut National des Sciences Appliquées de Lyon).
- Jameson, J., and Havran, W.L. (2007). Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunological reviews* 215, 114-122.
- Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., and Havran, W.L. (2002). A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 296, 747-749.
- Janssens, A.S., Heide, R., den Hollander, J.C., Mulder, P.G., Tank, B., and Oranje, A.P. (2005). Mast cell distribution in normal adult skin. *Journal of clinical pathology* 58, 285-289.
- Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., Lee, H.Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Kim, K.H., *et al.* (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nature medicine* 15, 159-168.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., and Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284-1288.
- Jetten, N., Roumans, N., Gijbels, M.J., Romano, A., Post, M.J., de Winther, M.P., van der Hulst, R.R., and Xanthoulea, S. (2014). Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PloS one* 9, e102994.
- Johnstone, C.C., and Farley, A. (2005). The physiological basics of wound healing. *Nursing standard* 19, 59-65; quiz 66.
- Jones, P.H., and Watt, F.M. (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73, 713-724.
- Joo, Y.C., and Oh, D.K. (2012). Lipoxygenases: potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. *Biotechnology advances* 30, 1524-1532.
- Jude, E.B., Blakytyn, R., Bulmer, J., Boulton, A.J., and Ferguson, M.W. (2002). Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 19, 440-447.
- Kadl, A., Meher, A.K., Sharma, P.R., Lee, M.Y., Doran, A.C., Johnstone, S.R., Elliott, M.R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., *et al.* (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation research* 107, 737-746.

- Kainulainen, T., Hakkinen, L., Hamidi, S., Larjava, K., Kallioinen, M., Peltonen, J., Salo, T., Larjava, H., and Oikarinen, A. (1998). Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *J Histochem Cytochem* *46*, 353-360.
- Kakazu, A., He, J., Kenchegowda, S., and Bazan, H.E. (2012). Lipoxin A(4) inhibits platelet-activating factor inflammatory response and stimulates corneal wound healing of injuries that compromise the stroma. *Experimental eye research* *103*, 9-16.
- Kalish, B.T., Kieran, M.W., Puder, M., and Panigrahy, D. (2013). The growing role of eicosanoids in tissue regeneration, repair, and wound healing. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* *104-105*, 130-138.
- Kampfer, H., Brautigam, L., Geisslinger, G., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2003). Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *The Journal of investigative dermatology* *120*, 880-890.
- Kampfer, H., Schmidt, R., Geisslinger, G., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2005). Wound inflammation in diabetic ob/ob mice: functional coupling of prostaglandin biosynthesis to cyclooxygenase-1 activity in diabetes-impaired wound healing. *Diabetes* *54*, 1543-1551.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* *90*, 1085-1095.
- Kanie, N., Matsumoto, T., Kobayashi, T., and Kamata, K. (2003). Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR alpha and PPAR gamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *British journal of pharmacology* *140*, 23-32.
- Kanitakis, J. (1995). Structure histologique de la peau humaine. *Biologie de la peau humaine: Schmidt D. Les éditions INSERM* 1-20.
- Kapoor, M., Kojima, F., Yang, L., and Crofford, L.J. (2007a). Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* *76*, 103-112.
- Kapoor, N., Sankaran, S., Hyer, S., and Shehata, H. (2007b). Diabetes in pregnancy: a review of current evidence. *Current opinion in obstetrics & gynecology* *19*, 586-590.
- Karecla, P.I., Timpl, R., and Watt, F.M. (1994). Adhesion of human epidermal keratinocytes to laminin. *Cell adhesion and communication* *2*, 309-318.
- Katusic, Z.S., Santhanam, A.V., and He, T. (2012). Vascular effects of prostacyclin: does activation of PPARdelta play a role? *Trends in pharmacological sciences* *33*, 559-564.
- Keene, D.R., Sakai, L.Y., Lunstrum, G.P., Morris, N.P., and Burgeson, R.E. (1987). Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* *104*, 611-621.
- Keimowitz, R.M., Pulvermacher, G., Mayo, G., and Fitzgerald, D.J. (1993). Transdermal modification of platelet function. A dermal aspirin preparation selectively inhibits platelet cyclooxygenase and preserves prostacyclin biosynthesis. *Circulation* *88*, 556-561.
- Kempainen, B.W., Urry, D.W., Swaim, S.F., Sartin, E.A., Gillette, R.L., Hinkle, S.H., Coolman, S.L., Luan, C.X., and Xu, J. (2004). Bioelastic membranes for topical application of a thromboxane synthetase inhibitor for protection of skin from pressure injury: a preliminary study. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* *12*, 453-460.
- Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A.T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., and Caligiuri, G. (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS one* *5*, e8852.
- Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., Bhasker, V., Gordillo, G.M., Sen, C.K., and Roy, S. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS one* *5*, e9539.
- Kim, E.H., and Surh, Y.J. (2006). 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochemical pharmacology* *72*, 1516-1528.
- Kim, K.A., Shin, Y.J., Kim, J.H., Lee, H., Noh, S.Y., Jang, S.H., and Bae, O.N. (2012). Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Arch Pharm Res* *35*, 223-234.
- Kis, B., Snipes, J.A., and Busija, D.W. (2005). Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *315*, 1-7.
- Kishi, K., Okabe, K., Shimizu, R., and Kubota, Y. (2012). Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin. *The Keio journal of medicine* *61*, 101-108.
- Kloth, L.C., McCulloch, J.M. (2002). *Wound Healing, Alternatives in Management* (Philadelphia: F. A Davis Company).

- Knighton, D.R., Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B.J., Werb, Z., and Banda, M.J. (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221, 1283-1285.
- Kodelja, V., Muller, C., Politz, O., Hakij, N., Orfanos, C.E., and Goerdts, S. (1998). Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *Journal of immunology* 160, 1411-1418.
- Kooistra, T., Schrauwen, Y., Arts, J., and Emeis, J.J. (1994). Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *International journal of hematology* 59, 233-255.
- Korchak, H.M., Serhan, C.N., and Weissmann, G. (1982). Activation of the human neutrophil: the roles of lipid remodeling and intracellular calcium. *Monogr Pathol*, 83-93.
- Koria, P. (2012). Delivery of growth factors for tissue regeneration and wound healing. *BioDrugs* 26, 163-175.
- Korns, D., Frasnich, S.C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2011). Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Frontiers in immunology* 2, 57.
- Kozak, K.R., Gupta, R.A., Moody, J.S., Ji, C., Boeglin, W.E., DuBois, R.N., Brash, A.R., and Marnett, L.J. (2002). 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonoylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *The Journal of biological chemistry* 277, 23278-23286.
- Krawczyk, W.S. (1971). A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J Cell Biol* 49, 247-263.
- Krieg, T., and Aumailley, M. (2011). The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. *Exp Dermatol* 20, 689-695.
- Kuhn, H., Walther, M., and Kuban, R.J. (2002). Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 263-290.
- Kulidjian, A.A., Inman, R., and Issekutz, T.B. (1999). Rodent models of lymphocyte migration. *Seminars in immunology* 11, 85-93.
- Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R., and Marnett, L.J. (2001). Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Current opinion in structural biology* 11, 752-760.
- Kusnik-Joinville, O., Weill, A., Salanave, B., Ricordeau, P., and Allemand, H. (2008). Prevalence and treatment of diabetes in France: trends between 2000 and 2005. *Diabetes Metab* 34, 266-272.
- Laight, D.W., Carrier, M.J., and Anggard, E.E. (2000a). Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 47, 457-464.
- Laight, D.W., Desai, K.M., Anggard, E.E., and Carrier, M.J. (2000b). Endothelial dysfunction accompanies a pro-oxidant, pro-diabetic challenge in the insulin resistant, obese Zucker rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 402, 95-99.
- Lajtha, L.G. (1979). Stem cell concepts. *Nouv Rev Fr Hematol* 21, 59-65.
- Lammermann, T., Afonso, P.V., Angermann, B.R., Wang, J.M., Kastemuller, W., Parent, C.A., and Germain, R.N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* 498, 371-375.
- Lampugnani, M.G. (1999). Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods in molecular biology* 96, 177-182.
- Landsman, A., Agnew, P., Parish, L., Joseph, R., and Galiano, R.D. (2010). Diabetic foot ulcers treated with becaplermin and TheraGauze, a moisture-controlling smart dressing: a randomized, multicenter, prospective analysis. *J Am Podiatr Med Assoc* 100, 155-160.
- Laplante, A. (2002). Mécanismes de réépithélialisation des plaies cutanées : expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide d'un nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire. (Université Laval).
- Laplante, A.F., Germain, L., Auger, F.A., and Moulin, V. (2001). Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J* 15, 2377-2389.
- Lappin, M.B., Kimber, I., and Norval, M. (1996). The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Archives of dermatological research* 288, 109-121.
- Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R.H., and Heino, J. (1993). Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *The Journal of clinical investigation* 92, 1425-1435.
- Laschke, M.W., Vollmar, B., and Menger, M.D. (2011). The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22, 147-164; discussion 164-147.

- Lavery, L.A., Armstrong, D.G., Wunderlich, R.P., Mohler, M.J., Wendel, C.S., and Lipsky, B.A. (2006). Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care* 29, 1288-1293.
- Lavker, R.M., and Sun, T.T. (1983). Epidermal stem cells. *J Invest Dermatol* 81, 121s-127s.
- Lavker, R.M., Sun, T.T., Oshima, H., Barrandon, Y., Akiyama, M., Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C.A., Dhouailly, D., et al. (2003). Hair follicle stem cells. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* 8, 28-38.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 2, 787-795.
- Lecomte, M., Laneuville, O., Ji, C., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1994). Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *The Journal of biological chemistry* 269, 13207-13215.
- Lee, K.H. (1968). Studies on the mechanism of action of salicylates. 3. Effect of vitamin A on the wound healing retardation action of aspirin. *Journal of pharmaceutical sciences* 57, 1238-1240.
- Lee, K.H., and Tong, T.G. (1969). Studies on the mechanism of action of salicylates. VI. Effect of topical application of retinoic acid on wound-healing retardation action of salicylic acid. *Journal of pharmaceutical sciences* 58, 773-774.
- Lee, S.H., Jeong, S.K., and Ahn, S.K. (2006). An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei medical journal* 47, 293-306.
- Lefevre, L., Gales, A., Olagnier, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., Valentin, A., Auwerx, J., Pipy, B., and Coste, A. (2010a). PPAR gamma Ligands Switched High Fat Diet-Induced Macrophage M2b Polarization toward M2a Thereby Improving Intestinal Candida Elimination. *PloS one* 5.
- Lefevre, L., Gales, A., Olagnier, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., Valentin, A., Auwerx, J., Pipy, B., and Coste, A. (2010b). PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PloS one* 5, e12828.
- Lefevre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olagnier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J.L., et al. (2013). The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38, 1038-1049.
- LeGrand, E.K. (1998). Preclinical promise of becaplermin (rhPDGF-BB) in wound healing. *Am J Surg* 176, 48S-54S.
- Leibovich, S.J., and Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American journal of pathology* 78, 71-100.
- Leigh, I.M., Navsaria, H., Purkis, P.E., McKay, I.A., Bowden, P.E., and Riddle, P.N. (1995). Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *The British journal of dermatology* 133, 501-511.
- Leiter, E.H., Strobel, M., O'Neill, A., Schultz, D., Schile, A., and Reifsnnyder, P.C. (2013). Comparison of Two New Mouse Models of Polygenic Type 2 Diabetes at the Jackson Laboratory, NONcNZO10Lt/J and TALLYHO/JngJ. *Journal of diabetes research* 2013, 165327.
- Leong, J., Hughes-Fulford, M., Rakhlin, N., Habib, A., Maclouf, J., and Goldyne, M.E. (1996). Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Experimental cell research* 224, 79-87.
- Leverve, X. (2003). Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects. *Intensive Care Med* 29, 511-514.
- Levy, B.D. (2006). Myocardial 15-epi-lipoxin A4 generation provides a new mechanism for the immunomodulatory effects of statins and thiazolidinediones. *Circulation* 114, 873-875.
- Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology* 2, 612-619.
- Levy, B.D., Vachier, I., and Serhan, C.N. (2012). Resolution of inflammation in asthma. *Clinics in chest medicine* 33, 559-570.
- Levy, J.J., von Rosen, J., Gassmuller, J., Kleine Kuhlmann, R., and Lange, L. (1995). Validation of an in vivo wound healing model for the quantification of pharmacological effects on epidermal regeneration. *Dermatology* 190, 136-141.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7, 678-689.
- Li, J., Chen, J., and Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 25, 9-18.

- Li, W.Y., Chong, S.S., Huang, E.Y., and Tuan, T.L. (2003). Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society *11*, 239-247.
- Liddiard, K., Rosas, M., Davies, L.C., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2011). Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *European journal of immunology* *41*, 2503-2508.
- Lim, H., and Dey, S.K. (2000). PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *11*, 137-142.
- Limor, R., Sharon, O., Knoll, E., Many, A., Weisinger, G., and Stern, N. (2008). Lipoxygenase-derived metabolites are regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 expression in human vascular smooth muscle cells. *American journal of hypertension* *21*, 219-223.
- Lin, J., and Yan, G. (2007). [Roles of leptin-mediated intracellular signaling pathways on wound healing]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* *21*, 1254-1258.
- Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* *445*, 843-850.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., and Davis, R.J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* *72*, 269-278.
- Lipsky, B.A. (2004). Medical treatment of diabetic foot infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* *39 Suppl 2*, S104-114.
- Liu, M., Saeki, K., Matsunobu, T., Okuno, T., Koga, T., Sugimoto, Y., Yokoyama, C., Nakamizo, S., Kabashima, K., Narumiya, S., *et al.* (2014). 12-Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *The Journal of experimental medicine* *211*, 1063-1078.
- Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., and Lehnert, H. (2002). Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* *45*, 1011-1016.
- Lobmann, R., Pap, T., Ambrosch, A., Waldmann, K., Konig, W., and Lehnert, H. (2006). Differential effects of PDGF-BB on matrix metalloproteinases and cytokine release in fibroblasts of Type 2 diabetic patients and normal controls in vitro. *J Diabetes Complications* *20*, 105-112.
- Lobmann, R., Schultz, G., and Lehnert, H. (2005). Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care* *28*, 461-471.
- Lochner, K., Gaemlich, A., Sudel, K.M., Venzke, K., Moll, I., Knott, A., Stab, F., Wenck, H., Doring, O., Bottger, M., and Gallinat, S. (2007). Expression of decorin and collagens I and III in different layers of human skin in vivo: a laser capture microdissection study. *Biogerontology* *8*, 269-282.
- Lowry, J.C., Bartley, G.B., and Garrity, J.A. (1997). The role of second-intention healing in periocular reconstruction. *Ophthalmic plastic and reconstructive surgery* *13*, 174-188.
- Lu, D., Han, C., and Wu, T. (2013). 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase-derived 15-keto-prostaglandin E2 inhibits cholangiocarcinoma cell growth through interaction with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, SMAD2/3, and TAP63 proteins. *The Journal of biological chemistry* *288*, 19484-19502.
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., Roers, A., and Eming, S.A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *Journal of immunology* *184*, 3964-3977.
- Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* *56*, 16-23.
- MacDonald, K.P., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., *et al.* (2010). An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* *116*, 3955-3963.
- Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *24*, 1015-1022.
- Mackman, N., Tilley, R.E., and Key, N.S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *27*, 1687-1693.
- MacMillan, D.K., Hill, E., Sala, A., Sigal, E., Shuman, T., Henson, P.M., and Murphy, R.C. (1994). Eosinophil 15-lipoxygenase is a leukotriene A4 synthase. *The Journal of biological chemistry* *269*, 26663-26668.

- Maddox, J.F., and Serhan, C.N. (1996). Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *The Journal of experimental medicine* 183, 137-146.
- Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., and Beelen, R.H. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216, 753-762.
- Majed, B.H., and Khalil, R.A. (2012). Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacological reviews* 64, 540-582.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146, 3-15.
- Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., and Zouboulis, C. (2011). An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. *Dermato-endocrinology* 3, 41-49.
- Mancini, J.A., Vickers, P.J., O'Neill, G.P., Boily, C., Falgoutret, J.P., and Riendeau, D. (1997). Altered sensitivity of aspirin-acetylated prostaglandin G/H synthase-2 to inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Molecular pharmacology* 51, 52-60.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 229, 176-185.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.
- Martin, C.J., Peters, K.N., and Behar, S.M. (2014). Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Current opinion in microbiology* 17, 17-23.
- Martin, C.W., and Muir, I.F. (1990). The role of lymphocytes in wound healing. *British journal of plastic surgery* 43, 655-662.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 453-461.
- Maslinska, D., and Gajewski, M. (1998). Some aspects of the inflammatory process. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 36, 199-204.
- Mathis, S.P., Jala, V.R., Lee, D.M., and Haribabu, B. (2010). Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. *Journal of immunology* 185, 3049-3056.
- Matsunaga, Y., Fukuyama, S., Okuno, T., Sasaki, F., Matsunobu, T., Asai, Y., Matsumoto, K., Saeki, K., Oike, M., Sadamura, Y., *et al.* (2013). Leukotriene B4 receptor BLT2 negatively regulates allergic airway eosinophilia. *FASEB J* 27, 3306-3314.
- McAdam, B., Keimowitz, R.M., Maher, M., and Fitzgerald, D.J. (1996). Transdermal modification of platelet function: an aspirin patch system results in marked suppression of platelet cyclooxygenase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 277, 559-564.
- McCance, D.R., Dyer, D.G., Dunn, J.A., Bailie, K.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., and Lyons, T.J. (1993). Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 91, 2470-2478.
- McLafferty, E., Hendry, C., and Alistair, F. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing standard* 27, 35-42.
- McLellan, A.D., Heiser, A., Sorg, R.V., Fearnley, D.B., and Hart, D.N. (1998). Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *J Invest Dermatol* 111, 841-849.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- Meerwaldt, R., Links, T.P., Graaff, R., Hoogenberg, K., Lefrandt, J.D., Baynes, J.W., Gans, R.O., and Smit, A.J. (2005). Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 48, 1637-1644.
- Menghini, R., Uccioli, L., Vainieri, E., Pecchioli, C., Casagrande, V., Stoehr, R., Cardellini, M., Porzio, O., Rizza, S., and Federici, M. (2013). Expression of tissue inhibitor of metalloprotease 3 is reduced in ischemic but not neuropathic ulcers from patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 50, 907-910.
- Mercurio, A.M., Rabinovitz, I., and Shaw, L.M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 13, 541-545.

- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N.S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J.M., Kaya, G., Gonzalez, F.J., Zakany, J., *et al.* (2001). Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *The Journal of cell biology* 154, 799-814.
- Michalik, L., Feige, J.N., Gelman, L., Pedrazzini, T., Keller, H., Desvergne, B., and Wahli, W. (2005). Selective expression of a dominant-negative form of peroxisome proliferator-activated receptor in keratinocytes leads to impaired epidermal healing. *Molecular endocrinology* 19, 2335-2348.
- Michiels, C., Arnould, T., and Remacle, J. (2000). Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* 1497, 1-10.
- Mirza, R., DiPietro, L.A., and Koh, T.J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American journal of pathology* 175, 2454-2462.
- Mirza, R., and Koh, T.J. (2011). Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 56, 256-264.
- Mirza, R.E., Fang, M.M., Ennis, W.J., and Koh, T.J. (2013). Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes* 62, 2579-2587.
- Misery, L., and Gaudillere, A. (1996). [Merkel cell and neuro-cutaneous system]. *Pathol Biol (Paris)* 44, 849-855.
- Mitchell, S., Thomas, G., Harvey, K., Cottell, D., Reville, K., Berlasconi, G., Petasis, N.A., Erwig, L., Rees, A.J., Savill, J., *et al.* (2002). Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *J Am Soc Nephrol* 13, 2497-2507.
- Mizuta, M. (2005). [Oxidative stress in diabetes]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 125, 125-128.
- Moll, I., Paus, R., and Moll, R. (1996). Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol* 106, 281-286.
- Monnier, V.M., Vishwanath, V., Frank, K.E., Elmetts, C.A., Dauchot, P., and Kohn, R.R. (1986). Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med* 314, 403-408.
- Montagner, A., Rando, G., Degueurce, G., Leuenberger, N., Michalik, L., and Wahli, W. (2011). New insights into the role of PPARs. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 85, 235-243.
- Morris, S.M., Jr. (2004). Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 134, 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
- Morykwas, M.J., Faler, B.J., Pearce, D.J., and Argenta, L.C. (2001). Effects of varying levels of subatmospheric pressure on the rate of granulation tissue formation in experimental wounds in swine. *Ann Plast Surg* 47, 547-551.
- Mosior, M., Six, D.A., and Dennis, E.A. (1998). Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *The Journal of biological chemistry* 273, 2184-2191.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8, 958-969.
- Mosteller, R.D. (1987). Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317, 1098.
- Moustafa, M., Bullock, A.J., Creagh, F.M., Heller, S., Jeffcoate, W., Game, F., Amery, C., Tesfaye, S., Ince, Z., Haddow, D.B., and MacNeil, S. (2007). Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers. *Regen Med* 2, 887-902.
- Muller, K.M., Bickel, M., Wiesmann, U.N., and Sporri, B. (2000). Natural killer cells activate human dermal fibroblasts. *Cytokine* 12, 1755-1762.
- Muller-Decker, K., Hirschner, W., Marks, F., and Furstenberger, G. (2002). The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. *J Invest Dermatol* 119, 1189-1195.
- Munoz-Garcia, A., Thomas, C.P., Keeney, D.S., Zheng, Y., and Brash, A.R. (2014). The importance of the lipoxygenase-hexoxilin pathway in the mammalian epidermal barrier. *Biochim Biophys Acta* 1841, 401-408.
- Murad, A., Nath, A.K., Cha, S.T., Demir, E., Flores-Riveros, J., and Sierra-Honigmann, M.R. (2003). Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J* 17, 1895-1897.
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K., and Kudo, I. (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 278, 37937-37947.

- Murawala, P., Tanaka, E.M., and Currie, J.D. (2012). Regeneration: the ultimate example of wound healing. *Seminars in cell & developmental biology* 23, 954-962.
- Murphy, J.E., Tacon, D., Tedbury, P.R., Hadden, J.M., Knowling, S., Sawamura, T., Peckham, M., Phillips, S.E., Walker, J.H., and Ponnambalam, S. (2006). LOX-1 scavenger receptor mediates calcium-dependent recognition of phosphatidylserine and apoptotic cells. *The Biochemical journal* 393, 107-115.
- Myohanen, H., and Vaheri, A. (2004). Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 2840-2858.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.
- Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 274, 21491-21494.
- Nagaya, N. (2010). Orally active prostacyclin analogue for cardiovascular disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 29, 14-18.
- Naito, Y., Takagi, T., and Higashimura, Y. (2014). Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Archives of biochemistry and biophysics* 564C, 83-88.
- Nakamura, H., Hirabayashi, T., Shimizu, M., and Murayama, T. (2006). Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A2alpha directly and by PKC pathway. *Biochemical pharmacology* 71, 850-857.
- Naruhn, S., Meissner, W., Adhikary, T., Kaddatz, K., Klein, T., Watzet, B., Muller-Brusselbach, S., and Muller, R. (2010). 15-hydroxyicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. *Molecular pharmacology* 77, 171-184.
- Nascimento, A.P., and Costa, A.M. (2006). Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr* 96, 1069-1077.
- Nassar, G.M., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd, Lakkis, F.G., and Badr, K.F. (1994). Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *The Journal of biological chemistry* 269, 27631-27634.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852.
- Neefjes, J., Jongasma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* 11, 823-836.
- Nishikawa, T., Kukidome, D., Sonoda, K., Fujisawa, K., Matsuhisa, T., Motoshima, H., Matsumura, T., and Araki, E. (2007). Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes research and clinical practice* 77 Suppl 1, S161-164.
- Nobe, H., Nobe, K., and Paul, R.J. (2003). Fibroblast fiber contraction: role of C and Rho kinase in activation by thromboxane A2. *American journal of physiology. Cell physiology* 285, C1411-1419.
- Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P., and Beschin, A. (2004). Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* 20, 126-133.
- Noli, C., and Miolo, A. (2001). The mast cell in wound healing. *Veterinary dermatology* 12, 303-313.
- Norlen, L. (2006). Stratum corneum keratin structure, function and formation - a comprehensive review. *Int J Cosmet Sci* 28, 397-425.
- Novak, M.L., and Koh, T.J. (2013a). Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 93, 875-881.
- Novak, M.L., and Koh, T.J. (2013b). Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *The American journal of pathology* 183, 1352-1363.
- Nuyttens, B.P., Thijs, T., Deckmyn, H., and Broos, K. (2011). Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis research* 127 Suppl 2, S26-29.
- Oberringer, M., Meins, C., Bubel, M., and Pohlemann, T. (2008). In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J Mol Histol* 39, 37-47.
- Ochoa, O., Torres, F.M., and Shireman, P.K. (2007). Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular* 15, 350-355.

- Olagnier, D., Coste, A., Meunier, E., Lefevre, L., Dardenne, C., Berry, A., and Pipy, B. (2011a). Nrf2-Mediated Cd36 over Expression Independently of Ppar Gamma in Inflammatory Macrophages Improves the Outcome of Severe Malaria. *Inflammation Research* 60, 38-38.
- Olagnier, D., Lavergne, R.A., Meunier, E., Lefevre, L., Dardenne, C., Aubouy, A., Benoit-Vical, F., Ryffel, B., Coste, A., Berry, A., and Pipy, B. (2011b). Nrf2, a PPAR gamma Alternative Pathway to Promote CD36 Expression on Inflammatory Macrophages: Implication for Malaria. *PLoS pathogens* 7.
- Olivares-Corichi, I.M., Ceballos, G., Medina-Santillan, R., Medina-Navarro, R., Guzman-Grenfell, A.M., and Hicks, J.J. (2005). Oxidation by reactive oxygen species (ROS) alters the structure of human insulin and decreases the insulin-dependent D-glucose-C14 utilization by human adipose tissue. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10, 3127-3131.
- OMS (2013). Diabète. In Aide-mémoire N°312, C.d. Médias, ed.
- OpenStax-College (2013). *Anatomy & Physiology*.
- Orr, J.S., Kennedy, A., Anderson-Baucum, E.K., Webb, C.D., Fordahl, S.C., Erikson, K.M., Zhang, Y., Etzerodt, A., Moestrup, S.K., and Hasty, A.H. (2014). Obesity alters adipose tissue macrophage iron content and tissue iron distribution. *Diabetes* 63, 421-432.
- Ortega-Gomez, A., Perretti, M., and Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine* 5, 661-674.
- Ortonne, J.P., Loning, T., Schmitt, D., and Thivolet, J. (1981). Immunomorphological and ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 392, 217-230.
- Oskeritzian, C.A. (2012). Mast Cells and Wound Healing. *Advances in wound care* 1, 23-28.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233.
- Palmer, G.M., Fontanella, A.N., Shan, S., Hanna, G., Zhang, G., Fraser, C.L., and Dewhirst, M.W. (2011). In vivo optical molecular imaging and analysis in mice using dorsal window chamber models applied to hypoxia, vasculature and fluorescent reporters. *Nat Protoc* 6, 1355-1366.
- Pang, S.C., Daniels, W.H., and Buck, R.C. (1978). Epidermal migration during the healing of suction blisters in rat skin: a scanning and transmission electron microscopic study. *The American journal of anatomy* 153, 177-191.
- Papanas, N., and Maltezos, E. (2008). Becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Clin Interv Aging* 3, 233-240.
- Pasparakis, M., Haase, I., and Nestle, F.O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 14, 289-301.
- Paul, A.G., Ahmad, N.W., Lee, H.L., Ariff, A.M., Saranam, M., Naicker, A.S., and Osman, Z. (2009). Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. *Int Wound J* 6, 39-46.
- Paul, B.Z., Jin, J., and Kunapuli, S.P. (1999). Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *The Journal of biological chemistry* 274, 29108-29114.
- Paus, R., Muller-Rover, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmuller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., and Handjiski, B. (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 113, 523-532.
- Penrose, J.F. (1999). LTC4 synthase. Enzymology, biochemistry, and molecular characterization. *Clinical reviews in allergy & immunology* 17, 133-152.
- Peppas, M., and Raptis, S.A. (2008). Advanced glycation end products and cardiovascular disease. *Curr Diabetes Rev* 4, 92-100.
- Peppas, M., and Vlassara, H. (2005). Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)* 4, 28-37.
- Perretti, M., and Solito, E. (2004). Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochemical Society transactions* 32, 507-510.
- Perschel, W.T., Langefeld, T.W., and Federlin, K. (1995). [Susceptibility to infections in diabetes--effects on metabolism]. *Immun Infekt* 23, 196-200.
- Peters, E.J., Lipsky, B.A., Berendt, A.R., Embil, J.M., Lavery, L.A., Senneville, E., Urbancic-Rovan, V., Bakker, K., and Jeffcoate, W.J. (2012). A systematic review of the effectiveness of interventions in the management of infection in the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev* 28 Suppl 1, 142-162.

- Petrova, N., and Edmonds, M. (2006). Emerging drugs for diabetic foot ulcers. *Expert Opin Emerg Drugs* *11*, 709-724.
- Phillips, J.M., Parish, N.M., Raine, T., Bland, C., Sawyer, Y., De La Pena, H., and Cooke, A. (2009). Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. The review of diabetic studies : RDS *6*, 97-103.
- Pickup, J.C., Mattock, M.B., Chusney, G.D., and Burt, D. (1997). NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* *40*, 1286-1292.
- Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* *367*, 243-249.
- Planaguma, A., Pfeffer, M.A., Rubin, G., Croze, R., Uddin, M., Serhan, C.N., and Levy, B.D. (2010). Lovastatin decreases acute mucosal inflammation via 15-epi-lipoxin A4. *Mucosal immunology* *3*, 270-279.
- Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., and Gordon, S. (1996). Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12456-12460.
- Porter, R.M. (2003). Mouse models for human hair loss disorders. *Journal of anatomy* *202*, 125-131.
- Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., and Kang, A.H. (1987). Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* *165*, 251-256.
- Potten, C.S., and Booth, C. (2002). Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol* *119*, 888-899.
- Powell, W.S., and Rokach, J. (2013). The eosinophil chemoattractant 5-oxo-EET and the OXE receptor. *Progress in lipid research* *52*, 651-665.
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., and Ridker, P.M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association* *286*, 327-334.
- Pradhan Nabzdyk, L., Kuchibhotla, S., Guthrie, P., Chun, M., Auster, M.E., Nabzdyk, C., Deso, S., Andersen, N., Gnardellis, C., LoGerfo, F.W., and Veves, A. (2013). Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *J Vasc Surg* *58*, 766-775 e712.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., and McIntyre, T.M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual review of biochemistry* *69*, 419-445.
- Prigent, F. (2002). [The hypodermis belongs to the skin]. *Ann Dermatol Venereol* *129*, 1053.
- Probst, H., Corpataux, J.M., Dusmet, M., and Ris, H.B. (2001). [Revascularization of the diabetic foot]. *Revue medicale de la Suisse romande* *121*, 137-140.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* *17*, 1063-1072.
- Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., and Boehm, N. (2008). [Functional histology of dermis]. *Ann Dermatol Venereol* *135*, 185-20.
- Radmark, O. (2002). Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & other lipid mediators* *68-69*, 211-234.
- Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2007). 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends in biochemical sciences* *32*, 332-341.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* *2*, 1057-1058.
- Raja, Sivamani, K., Garcia, M.S., and Isseroff, R.R. (2007). Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* *12*, 2849-2868.
- Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M.M., and Gilroy, D.W. (2007). Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 20979-20984.
- Rakonjac, M., Fischer, L., Provost, P., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2006). Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 13150-13155.
- Ramasasthy, S.S. (2005). Acute wounds. *Clin Plast Surg* *32*, 195-208.

- Ramirez-Ortiz, Z.G., Pendergraft, W.F., 3rd, Prasad, A., Byrne, M.H., Iram, T., Blanchette, C.J., Luster, A.D., Hacohen, N., El Khoury, J., and Means, T.K. (2013). The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nature immunology* *14*, 917-926.
- Rao, N.L., Dunford, P.J., Xue, X., Jiang, X., Lundeen, K.A., Coles, F., Riley, J.P., Williams, K.N., Grice, C.A., Edwards, J.P., *et al.* (2007). Anti-inflammatory activity of a potent, selective leukotriene A4 hydrolase inhibitor in comparison with the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *321*, 1154-1160.
- Regeants-of-University-of-Michigan-Medical-School. (2012).
- Reinke, J.M., and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* *49*, 35-43.
- Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* *181*, 1857-1862.
- Renne, T., Nieswandt, B., and Gailani, D. (2006). The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood cells, molecules & diseases* *36*, 148-151.
- Rigalleau V, L.J., Gin H. (2007). Étiologie et physiopathologie du diabète de type 2. *Endocrinologie-Nutrition* *10-366-D-10*.
- Rigamonti, E., Zordan, P., Sciorati, C., Rovere-Querini, P., and Brunelli, S. (2014). Macrophage plasticity in skeletal muscle repair. *BioMed research international* *2014*, 560629.
- Rinaldo-Matthis, A., and Haeggstrom, J.Z. (2010). Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. *Biochimie* *92*, 676-681.
- Rodriguez, M., Domingo, E., Municio, C., Alvarez, Y., Hugo, E., Fernandez, N., and Sanchez Crespo, M. (2014). Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals. *Molecular pharmacology* *85*, 187-197.
- Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., and Shim, E.K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* *34*, 1159-1169.
- Roh, C., Tao, Q., Photopoulos, C., and Lyle, S. (2005). In vitro differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* *125*, 1099-1105.
- Romppe, P., Auger, F.A., Germain, L., Bouvard, V., Lopez Valle, C.A., Thibault, J., and Le Duy, A. (1990). Influence of initial collagen and cellular concentrations on the final surface area of dermal and skin equivalents: a Box-Behnken analysis. *In Vitro Cell Dev Biol* *26*, 983-990.
- Rondeau, P. (2009). Stress oxydant et glycation: relation structure et activités biologiques de l'albumine in vitro et in vivo dans le cadre de la pathologie diabétique. (Université de la Réunion).
- Rousselle, P., Keene, D.R., Ruggiero, F., Champliaud, M.F., Rest, M., and Burgeson, R.E. (1997). Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol* *138*, 719-728.
- Rovati, G.E., and Capra, V. (2007). Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *TheScientificWorldJournal* *7*, 1375-1392.
- Rowlinson, S.W., Crews, B.C., Goodwin, D.C., Schneider, C., Gierse, J.K., and Marnett, L.J. (2000). Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5Z,8Z,11Z, 13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesize 15-(R)-hete. *The Journal of biological chemistry* *275*, 6586-6591.
- Ruggeri, Z.M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine* *8*, 1227-1234.
- Rundhaug, J.E., Simper, M.S., Surh, I., and Fischer, S.M. (2011). The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer. *Cancer metastasis reviews* *30*, 465-480.
- Rys-Sikora, K.E., Konger, R.L., Schoggins, J.W., Malaviya, R., and Pentland, A.P. (2000). Coordinate expression of secretory phospholipase A(2) and cyclooxygenase-2 in activated human keratinocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* *278*, C822-833.
- Saga, K. (2001). Histochemical and immunohistochemical markers for human eccrine and apocrine sweat glands: an aid for histopathologic differentiation of sweat gland tumors. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* *6*, 49-53.
- Saga, K. (2002). Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry* *37*, 323-386.
- Saksela, O., Hovi, T., and Vaheri, A. (1985). Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *Journal of cellular physiology* *122*, 125-132.

- Sakurai, T., and Tsuchiya, S. (1988). Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett* 236, 406-410.
- Sandulache, V.C., Parekh, A., Li-Korotky, H.S., Dohar, J.E., and Hebda, P.A. (2006). Prostaglandin E2 differentially modulates human fetal and adult dermal fibroblast migration and contraction: implication for wound healing. *Wound repair and regeneration* : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 14, 633-643.
- Sanyal, D.C., and Maji, N.K. (2001). Thermoregulation through skin under variable atmospheric and physiological conditions. *Journal of theoretical biology* 208, 451-456.
- Sato, K., Kang, W.H., Saga, K., and Sato, K.T. (1989). Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology* 20, 537-563.
- Savill, J. (2000). Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney & blood pressure research* 23, 173-174.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews. Immunology* 2, 965-975.
- Saxena, V., Hwang, C.W., Huang, S., Eichbaum, Q., Ingber, D., and Orgill, D.P. (2004). Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plastic and reconstructive surgery* 114, 1086-1096; discussion 1097-1088.
- Scannell, M., Flanagan, M.B., deStefani, A., Wynne, K.J., Cagney, G., Godson, C., and Maderna, P. (2007). Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *Journal of immunology* 178, 4595-4605.
- Scannell, M., and Maderna, P. (2006). Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. *TheScientificWorldJournal* 6, 1555-1573.
- Schaffer, M., and Barbul, A. (1998). Lymphocyte function in wound healing and following injury. *The British journal of surgery* 85, 444-460.
- Schaloske, R.H., and Dennis, E.A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1246-1259.
- Schaper, N.C., and Havekes, B. (2012). Diabetes: impaired damage control. *Diabetologia* 55, 18-20.
- Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C.N., and Ariel, A. (2011). Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *European journal of immunology* 41, 366-379.
- Schirmer, S., Ritter, R.G., and Fansa, H. (2013). Vascular surgery, microsurgery and supramicrosurgery for treatment of chronic diabetic foot ulcers to prevent amputations. *PloS one* 8, e74704.
- Schroder, K., Sweet, M.J., and Hume, D.A. (2006). Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211, 511-524.
- Schweiger, W. (2014). Ulcus cruris + VAC. In *Gefäßchirurgie - Venen*.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., and Isakson, P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12013-12017.
- Seitz, O., Schurmann, C., Hermes, N., Muller, E., Pfeilschifter, J., Frank, S., and Goren, I. (2010). Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. *Exp Diabetes Res* 2010, 476969.
- Sejersen, H., and Rattan, S.I. (2009). Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts. *Biogerontology* 10, 203-211.
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffmann, E., and Martin, G.R. (1982). Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 92, 584-588.
- Serhan, C.N. (1994). Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim Biophys Acta* 1212, 1-25.
- Serhan, C.N. (1997). Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins* 53, 107-137.
- Serhan, C.N. (2002). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 433-455.
- Serhan, C.N. (2005). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 141-162.

- Serhan, C.N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual review of immunology* 25, 101-137.
- Serhan, C.N. (2011). The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J* 25, 1441-1448.
- Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92-101.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., and Wallace, J.L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 21, 325-332.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* 8, 349-361.
- Serhan, C.N., Dalli, J., Colas, R.A., Winkler, J.W., and Chiang, N. (2014). Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim Biophys Acta*.
- Serhan, C.N., Jain, A., Marleau, S., Clish, C., Kantarci, A., Behbehani, B., Colgan, S.P., Stahl, G.L., Merched, A., Petasis, N.A., *et al.* (2003). Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *Journal of immunology* 171, 6856-6865.
- Serhan, C.N., and Petasis, N.A. (2011). Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chemical reviews* 111, 5922-5943.
- Serhan, C.N., and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* 6, 1191-1197.
- Shen, J.T., and Falanga, V. (2003). Innovative therapies in wound healing. *J Cutan Med Surg* 7, 217-224.
- Shida, Y., Rydz, N., Stegner, D., Brown, C., Mewburn, J., Sponagle, K., Danisment, O., Crawford, B., Vidal, B., Hegadorn, C.A., *et al.* (2014). Analysis of the role of von Willebrand factor, platelet glycoprotein VI-, and alpha2beta1-mediated collagen binding in thrombus formation. *Blood* 124, 1799-1807.
- Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., *et al.* (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *Journal of cell science* 118, 2363-2370.
- Sidhu, G.S., Cassai, N.D., and Rico, M.J. (2000). Composite keratohyaline granules in striate keratoderma. *Ultrastructural pathology* 24, 391-397.
- Silver, F.H., Freeman, J.W., and DeVore, D. (2001). Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* 7, 18-23.
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology* 28, 367-388.
- Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-746.
- Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., and Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84, 1155-1228.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R., and Tobin, D.J. (2005). Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol* 124, 13-21.
- Smith, L.T., Holbrook, K.A., and Madri, J.A. (1986). Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *The American journal of anatomy* 175, 507-521.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* 69, 145-182.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., and DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 271, 33157-33160.
- Smith, W.L., Meade, E.A., and DeWitt, D.L. (1994). Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 744, 50-57.
- Smith, W.L., Urade, Y., and Jakobsson, P.J. (2011). Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chemical reviews* 111, 5821-5865.
- Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 10, 427-439.

- Sorg, H., Krueger, C., and Vollmar, B. (2007). Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *Journal of anatomy* *211*, 810-818.
- Sorrell, J.M., and Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of cell science* *117*, 667-675.
- Spite, M., and Serhan, C.N. (2010). Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res* *107*, 1170-1184.
- Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A.F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* *52*, 812-817.
- Spravchikov, N., Sizyakov, G., Gartsbein, M., Accili, D., Tennenbaum, T., and Wertheimer, E. (2001). Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes* *50*, 1627-1635.
- Stables, M.J., Shah, S., Camon, E.B., Lovering, R.C., Newson, J., Bystrom, J., Farrow, S., and Gilroy, D.W. (2011). Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* *118*, e192-208.
- Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., and Tobin, G.R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* *176*, 26S-38S.
- Steed, D.L. (2006). Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plastic and reconstructive surgery* *117*, 143S-149S; discussion 150S-151S.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* *176*, 287-292.
- Steinstraesser, L., Sorkin, M., Niederbichler, A.D., Becerikli, M., Stupka, J., Daigeler, A., Kesting, M.R., Stricker, I., Jacobsen, F., and Schulte, M. (2010). A novel human skin chamber model to study wound infection ex vivo. *Archives of dermatological research* *302*, 357-365.
- Steinstraesser, L., Vranckx, J.J., Mohammadi-Tabrisi, A., Jacobsen, F., Mittler, D., Lehnhardt, M., Langer, S., Kuhnen, C., Gatermann, S., Steinau, H.U., and Eriksson, E. (2006). A novel titanium wound chamber for the study of wound infections in pigs. *Comp Med* *56*, 279-285.
- Stenn, K.S., and Malhotra (1992). Epithelialization. In *Wound Healing. Biochemical & Clinical Aspects* (Cohen, K. I., Diegelmann, R. F., and Lindblad, W. J., eds) pp. 115-127, W. B. Saunders, Philadelphia.
- Stitham, J., Midgett, C., Martin, K.A., and Hwa, J. (2011). Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Frontiers in pharmacology* *2*, 24.
- Stojadinovic, O., Brem, H., Vouthounis, C., Lee, B., Fallon, J., Stallcup, M., Merchant, A., Galiano, R.D., and Tomic-Canic, M. (2005). Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *The American journal of pathology* *167*, 59-69.
- Strodtbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews* *1*, 43-52.
- Stumpo, R., Kauer, M., Martin, S., and Kolb, H. (1999). Alternative activation of macrophage by IL-10. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* *67*, 245-248.
- Sugimoto, K., Yasujima, M., and Yagihashi, S. (2008). Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Current pharmaceutical design* *14*, 953-961.
- Sundberg, J.P., and King, L.E., Jr. (1996). Mouse mutations as animal models and biomedical tools for dermatological research. *J Invest Dermatol* *106*, 368-376.
- Syeda, M.M., Jing, X., Mirza, R.H., Yu, H., Sellers, R.S., and Chi, Y. (2012). Prostaglandin transporter modulates wound healing in diabetes by regulating prostaglandin-induced angiogenesis. *The American journal of pathology* *181*, 334-346.
- Szondy, Z., Garabuczi, E., Joos, G., Tsay, G.J., and Sarang, Z. (2014). Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications. *Frontiers in immunology* *5*, 354.
- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews. Immunology* *10*, 36-46.
- Tager, A.M., and Luster, A.D. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* *69*, 123-134.
- Takano, T., Fiore, S., Maddox, J.F., Brady, H.R., Petasis, N.A., and Serhan, C.N. (1997). Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *The Journal of experimental medicine* *185*, 1693-1704.

- Tamaki, K., Sugaya, M., Tada, Y., Yasaka, N., Uehira, M., Nishimoto, H., and Nakamura, K. (2001). Epidermal and dermal gamma-delta T cells. *Chemical immunology* 79, 43-51.
- Tan, N.S., Michalik, L., Di-Poi, N., Desvergne, B., and Wahli, W. (2004). Critical roles of the nuclear receptor PPARbeta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta) in skin wound healing. *Biochemical Society transactions* 32, 97-102.
- Tandara, A.A., and Mustoe, T.A. (2004). Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World journal of surgery* 28, 294-300.
- Taniguchi, H., Mohri, I., Okabe-Araori, H., Kanekiyo, T., Kagitani-Shimono, K., Wada, K., Urade, Y., Nakayama, M., Ozono, K., and Taniike, M. (2007). Early induction of neuronal lipocalin-type prostaglandin D synthase after hypoxic-ischemic injury in developing brains. *Neuroscience letters* 420, 39-44.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 275, 32775-32782.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461.
- Thallas-Bonke, V., Thorpe, S.R., Coughlan, M.T., Fukami, K., Yap, F.Y., Sourris, K.C., Penfold, S.A., Bach, L.A., Cooper, M.E., and Forbes, J.M. (2008). Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* 57, 460-469.
- Thangarajah, H., Vial, I.N., Grogan, R.H., Yao, D., Shi, Y., Januszyk, M., Galiano, R.D., Chang, E.I., Galvez, M.G., Glotzbach, J.P., et al. (2010). HIF-1alpha dysfunction in diabetes. *Cell Cycle* 9, 75-79.
- Thangarajah, H., Yao, D., Chang, E.I., Shi, Y., Jazayeri, L., Vial, I.N., Galiano, R.D., Du, X.L., Grogan, R., Galvez, M.G., et al. (2009). The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13505-13510.
- Thivolet, C. (1992). [Immunologic mechanisms implicated in autoimmune destruction of beta cells in type I diabetes]. *Annales d'endocrinologie* 53, 78-81.
- Thompson, W.D., Stirk, C.M., Melvin, W.T., and Smith, E.B. (1996). Plasmin, fibrin degradation and angiogenesis. *Nature medicine* 2, 493.
- Thornalley, P.J. (2002). Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* 50, 37-57.
- Thorp, E., Cui, D., Schrijvers, D.M., Kuriakose, G., and Tabas, I. (2008). Mertk receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoe-/- mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 1421-1428.
- Tiaka, E.K., Papanas, N., Manolakis, A.C., and Maltezos, E. (2012). The role of hyperbaric oxygen in the treatment of diabetic foot ulcers. *Angiology* 63, 302-314.
- Titos, E., and Claria, J. (2013). Omega-3-derived mediators counteract obesity-induced adipose tissue inflammation. *Prostaglandins & other lipid mediators* 107, 77-84.
- Titos, E., Rius, B., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Moran-Salvador, E., Martinez-Clemente, M., Arroyo, V., and Claria, J. (2011). Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *Journal of immunology* 187, 5408-5418.
- Tong, Q., Zheng, L., Li, B., Wang, D., Huang, C., Matuschak, G.M., and Li, D. (2006). Hypoxia-induced mitogenic factor enhances angiogenesis by promoting proliferation and migration of endothelial cells. *Experimental cell research* 312, 3559-3569.
- Toulon, A., Breton, L., Taylor, K.R., Tenenhaus, M., Bhavsar, D., Lanigan, C., Rudolph, R., Jameson, J., and Havran, W.L. (2009). A role for human skin-resident T cells in wound healing. *The Journal of experimental medicine* 206, 743-750.
- Toure, F., Zahm, J.M., Garnotel, R., Lambert, E., Bonnet, N., Schmidt, A.M., Vitry, F., Chanard, J., Gillery, P., and Rieu, P. (2008). Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) modulates neutrophil adhesion and migration on glycosylated extracellular matrix. *The Biochemical journal* 416, 255-261.
- Tucker, K.L., Sage, T., and Gibbins, J.M. (2012). Clot retraction. *Methods in molecular biology* 788, 101-107.
- Ud-Din, S., Volk, S.W., and Bayat, A. (2014). Regenerative healing, scar-free healing and scar formation across the species: current concepts and future perspectives. *Exp Dermatol*.
- Uderhardt, S., Herrmann, M., Oskolkova, O.V., Aschermann, S., Bicker, W., Ipseiz, N., Sarter, K., Frey, B., Rothe, T., Voll, R., et al. (2012). 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity* 36, 834-846.

- Uderhardt, S., and Kronke, G. (2012). 12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. *Journal of molecular medicine* 90, 1247-1256.
- Uozumi, N., and Shimizu, T. (2002). Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 59-69.
- Urade, Y., Fujimoto, N., and Hayaishi, O. (1985). Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthetase. *The Journal of biological chemistry* 260, 12410-12415.
- Usui, M.L., Mansbridge, J.N., Carter, W.G., Fujita, M., and Olerud, J.E. (2008). Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem* 56, 687-696.
- Usui, M.L., Underwood, R.A., Mansbridge, J.N., Muffley, L.A., Carter, W.G., and Olerud, J.E. (2005). Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 13, 468-479.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Vane, J., and Corin, R.E. (2003). Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 26, 571-578.
- Vaughan, R.B., and Trinkaus, J.P. (1966). Movements of epithelial cell sheets in vitro. *Journal of cell science* 1, 407-413.
- Vaughn, D.M., Swaim, S.F., and Milton, J.L. (1989). Elevation of thromboxane in pressure wounds. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 37, 45-50.
- Veves, A., Sheehan, P., and Pham, H.T. (2002). A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Arch Surg* 137, 822-827.
- Vincent, H.K., and Taylor, A.G. (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 30, 400-418.
- Vinik, A.I., Maser, R.E., Mitchell, B.D., and Freeman, R. (2003). Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 26, 1553-1579.
- Viswanathan, V., Jasmine, J.J., Snehalatha, C., and Ramachandran, A. (2002). Prevalence of pathogens in diabetic foot infection in South Indian type 2 diabetic patients. *J Assoc Physicians India* 50, 1013-1016.
- Voegeli, D. (2012). Moisture-associated skin damage: aetiology, prevention and treatment. *Br J Nurs* 21, 517-518, 520-511.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748-754.
- Wagner, E.F., Schonhaler, H.B., Guinea-Viniegra, J., and Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nature reviews. Rheumatology* 6, 704-714.
- Wallace, J.L. (2005). Recent advances in gastric ulcer therapeutics. *Current opinion in pharmacology* 5, 573-577.
- Wang, L.H., and Kulmacz, R.J. (2002). Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 409-422.
- Wang, N.Z., Urry, D.W., Swaim, S.F., Gillette, R.L., Hoffman, C.E., Hinkle, S.H., Coolman, S.L., Luan, C.X., Xu, J., and Kemppainen, B.W. (2004). Skin concentrations of thromboxane synthetase inhibitor after topical application with bioelastic membrane. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 27, 37-43.
- Wang, Q., Ni, H., Lan, L., Wei, X., Xiang, R., and Wang, Y. (2010). Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell research* 20, 701-712.
- Wang, S.B., Hu, K.M., Seamon, K.J., Mani, V., Chen, Y., and Gronert, K. (2012). Estrogen negatively regulates epithelial wound healing and protective lipid mediator circuits in the cornea. *FASEB J* 26, 1506-1516.
- Warner, T.D., and Mitchell, J.A. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 18, 790-804.
- Watanabe, T., Satoh, H., Togoh, M., Taniguchi, S., Hashimoto, Y., and Kurokawa, K. (1996). Positive and negative regulation of cell proliferation through prostaglandin receptors in NIH-3T3 cells. *Journal of cellular physiology* 169, 401-409.
- Watt, F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21, 3919-3926.

- Weber, L., Kirsch, E., Muller, P., and Krieg, T. (1984). Collagen type distribution and macromolecular organization of connective tissue in different layers of human skin. *J Invest Dermatol* 82, 156-160.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112, 1796-1808.
- Weiss, H.J., and Turitto, V.T. (1979). Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 53, 244-250.
- Weitkamp, B., Cullen, P., Plenz, G., Robenek, H., and Rauterberg, J. (1999). Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J* 13, 1445-1457.
- Wen, H., Wu, G., Chen, W., Yang, H., and Fu, J. (2012). [Topical application of leptin promotes burn wound healing in rats]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 32, 703-706.
- Wermeling, F., Chen, Y., Pikkarainen, T., Scheynius, A., Winqvist, O., Izui, S., Ravetch, J.V., Tryggvason, K., and Karlsson, M.C. (2007). Class A scavenger receptors regulate tolerance against apoptotic cells, and autoantibodies against these receptors are predictive of systemic lupus. *The Journal of experimental medicine* 204, 2259-2265.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835-870.
- Wetzler, C., Kampfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 115, 245-253.
- Whalen, G.F., and Zetter, B. R. (1992). *Angiogenesis* (Philadelphia: Cohen, K. I., Diegelmann, R. F., and Lindblad, W. J., eds).
- Wieman, T.J. (1998). Clinical efficacy of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. Becaplermin Gel Studies Group. *Am J Surg* 176, 74S-79S.
- Wiley, J.S., and Gu, B.J. (2012). A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic signalling* 8, 579-586.
- Willenborg, S., and Eming, S.A. (2014). Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 12, 214-221, 214-223.
- Winstead, M.V., Balsinde, J., and Dennis, E.A. (2000). Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1488, 28-39.
- Woessner, J.F., Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5, 2145-2154.
- Wolberg, A.S. (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood reviews* 21, 131-142.
- Wong, V.W., Sorkin, M., Glotzbach, J.P., Longaker, M.T., and Gurtner, G.C. (2011). Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 969618.
- Woodard, H.Q., and White, D.R. (1986). The composition of body tissues. *Br J Radiol* 59, 1209-1218.
- Woodward, D.F., Jones, R.L., and Narumiya, S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacological reviews* 63, 471-538.
- Wrobel, J.S., and Najafi, B. (2010). Diabetic foot biomechanics and gait dysfunction. *J Diabetes Sci Technol* 4, 833-845.
- Wuest, S.J., Crucet, M., Gemperle, C., Loretz, C., and Hersberger, M. (2012). Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 225, 121-127.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 214, 199-210.
- Xiao, Y., Williams, J.S., and Brownell, I. (2014). Merkel cells and touch domes: more than mechanosensory functions? *Exp Dermatol*.
- Xie, Z., Gong, M.C., Su, W., Xie, D., Turk, J., and Guo, Z. (2010). Role of calcium-independent phospholipase A2beta in high glucose-induced activation of RhoA, Rho kinase, and CPI-17 in cultured vascular smooth muscle cells and vascular smooth muscle hypercontractility in diabetic animals. *The Journal of biological chemistry* 285, 8628-8638.
- Xiong, W., Frasca, S.C., Thomas, S.M., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (2013). Induction of TGF-beta1 synthesis by macrophages in response to apoptotic cells requires activation of the scavenger receptor CD36. *PLoS one* 8, e72772.

- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* *112*, 1821-1830.
- Xue, L., Gyles, S.L., Wettestad, F.R., Gazi, L., Townsend, E., Hunter, M.G., and Pettipher, R. (2005). Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *Journal of immunology* *175*, 6531-6536.
- Xue, L., Salimi, M., Panse, I., Mjosberg, J.M., McKenzie, A.N., Spits, H., Klenerman, P., and Ogg, G. (2014). Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* *133*, 1184-1194.
- Yager, D.R., Zhang, L.Y., Liang, H.X., Diegelmann, R.F., and Cohen, I.K. (1996). Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* *107*, 743-748.
- Yamamoto, T., Horikawa, N., Komuro, Y., and Hara, Y. (1996). Effect of topical application of a stable prostacyclin analogue, SM-10902 on wound healing in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* *302*, 53-60.
- Yan, S.F., Ramasamy, R., Naka, Y., and Schmidt, A.M. (2003). Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circulation research* *93*, 1159-1169.
- Yan, Z.Q., Yokota, T., Zhang, W., and Hansson, G.K. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. *Circulation research* *79*, 38-44.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* *2*, 1.
- Yang, X.Y., Wang, L.H., Mihalic, K., Xiao, W., Chen, T., Li, P., Wahl, L.M., and Farrar, W.L. (2002). Interleukin (IL)-4 indirectly suppresses IL-2 production by human T lymphocytes via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activated by macrophage-derived 12/15-lipoxygenase ligands. *The Journal of biological chemistry* *277*, 3973-3978.
- Yang, Y., Gocke, A.R., Lovett-Racke, A., Drew, P.D., and Racke, M.K. (2008). PPAR Alpha Regulation of the Immune Response and Autoimmune Encephalomyelitis. *PPAR research* *2008*, 546753.
- Yaoita, H., Foidart, J.M., and Katz, S.I. (1978). Localization of the collagenous component in skin basement membrane. *J Invest Dermatol* *70*, 191-193.
- Yarrow, J.C., Perlman, Z.E., Westwood, N.J., and Mitchison, T.J. (2004). A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* *4*, 21.
- Yasui, T., Tohno, Y., and Araki, T. (2004). Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry. *Journal of biomedical optics* *9*, 259-264.
- Ye, R.D., Boulay, F., Wang, J.M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C.N., and Murphy, P.M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev* *61*, 119-161.
- Zhang, M.J., and Spite, M. (2012). Resolvins: anti-inflammatory and proresolving mediators derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Annual review of nutrition* *32*, 203-227.
- Zhang, Y., and Daaka, Y. (2011). PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cgamma pathway. *Blood* *118*, 5355-5364.
- Zhou, L.J., Matsui, R., and Ono, I. (2000). Development of a chronic skin defect model and a study of cytokine secretion using the model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* *8*, 304-318.
- Zirra, A.M. (1976). The functional significance of the skin's stratum lucidum. *Morphologie et embryologie* *22*, 9-12.
- Zucker, M.B. (1947). Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats. *The American journal of physiology* *148*, 275-288.

PARTIE 5
ANNEXES

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 984 722

②1 N° d'enregistrement national : 11 62295

⑤1 Int Cl^B : A 61 B 10/00 (2013.01)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 22.12.11.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la demande : 28.06.13 Bulletin 13/26.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRES URGO — FR, SOCIETE DE DEVELOPPEMENT ET DE RECHERCHE INDUSTRIELLE — FR, UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III — FR et INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) — FR.

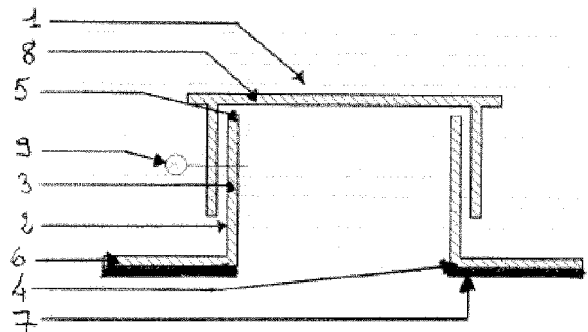
⑦② Inventeur(s) : DARDENNE CHRISTOPHE, PIPY BERNARD et LAMOISE MICHEL.

⑦③ Titulaire(s) : LABORATOIRES URGO, SOCIETE DE DEVELOPPEMENT ET DE RECHERCHE INDUSTRIELLE, UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III I, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE).

⑦④ Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑫④ DISPOSITIF NON-INVASIF, DESTINE A RECUEILLIR LES EXSUDATS D'UNE PLAIE, SON UTILISATION ET KIT COMPRENANT LEDIT DISPOSITIF.

⑫⑤ La présente invention porte sur un dispositif (1) non-invasif permettant de recueillir les exsudats d'une plaie comprenant une chambre (2) ayant une paroi latérale (3), une extrémité inférieure (4) ouverte et une extrémité supérieure (5), une ouverture d'accès étant disposée sur l'extrémité supérieure (5) et/ou sur la paroi latérale (3) de ladite chambre (2), ledit dispositif (1) étant destiné à être en contact avec la peau autour de la plaie lors de son utilisation par l'intermédiaire d'une interface (7); sur ses utilisations et sur un kit comprenant ledit dispositif.



FR 2 984 722 - A1



**DISPOSITIF NON-INVASIF, DESTINE A RECUEILLIR LES EXSUDATS D'UNE
PLAIE, SON UTILISATION ET KIT COMPRENANT LEDIT DISPOSITIF**

Domaine d'application :

La présente invention concerne un dispositif médical permettant de recueillir facilement les exsudats issus d'une plaie afin de les analyser en temps réel, permettant ainsi un suivi cellulaire, biochimique et moléculaire de l'avancée de la cicatrisation de la plaie, et qui permet également d'observer visuellement l'évolution de la cicatrisation d'une plaie.

10 Art Antérieur :

La cicatrisation d'une plaie est un processus physiopathologique naturel, les tissus humains et animaux étant capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leur sont propres.

15 La rapidité et la qualité de la cicatrisation d'une plaie dépendent de l'état général de l'organisme atteint, de l'étiologie de la plaie, de l'état et de la localisation de la plaie, et de la survenue ou non d'une infection, ainsi que des facteurs génétiques prédisposant ou non à des troubles de la cicatrisation.

20 La cicatrisation naturelle d'une plaie se déroule principalement selon trois phases successives, chacune de ces phases étant caractérisée par des activités cellulaires spécifiques qui font progresser le processus de réparation selon des séquences chronologiques précises : la phase inflammatoire, la phase de granulation (ou phase proliférative), et la phase de maturation, donnant l'aspect définitif de la cicatrice.

30 La première phase, la phase inflammatoire, débute dès la rupture des vaisseaux sanguins qui déclenche la formation d'un caillot (coagulation du sang) principalement composé de fibrine et de fibronectine, et qui va constituer une matrice provisoire. Cette matrice comble en partie la lésion et va permettre la migration au sein de la zone lésée des cellules inflammatoires recrutées pour assurer la détersion de la plaie. Les plaquettes présentes vont également libérer des facteurs (par exemple des cytokines, des facteurs de croissance) permettant le recrutement de cellules impliquées dans le processus cicatriciel. Cette phase se caractérise par l'infiltration et l'activation sur le site de

la lésion, de nombreuses cellules inflammatoires (tels les polynucléaires neutrophiles), mais aussi des cellules assurant le nettoyage de la plaie ou déterision (tels les macrophages).

La seconde phase correspond au développement du tissu de granulation. On observe d'abord une colonisation de la blessure par prolifération des fibroblastes. Puis, la migration des cellules endothéliales à partir des vaisseaux sains va permettre la néovascularisation, ou angiogenèse, du tissu lésé. Dans le tissu de granulation, les fibroblastes sont activés et vont se différencier en myofibroblastes présentant des propriétés contractiles importantes, générées par les microfilaments d'actine, permettant la contraction de la plaie. Ces microfilaments sont exprimés par une protéine : l'actine α -musculaire lisse. Ces myofibroblastes jouent donc un rôle majeur dans la formation et la maturation du tissu de granulation qui va conduire à la cicatrisation de la lésion. Il y a ensuite migration des kératinocytes et reconstruction de l'épiderme.

Cette phase est initiée par une diminution de l'état inflammatoire de la lésion s'accompagnant d'une apoptose des cellules inflammatoires.

La troisième phase du processus est une étape principalement de maturation visant à reconstruire un tissu fonctionnel le plus identique possible au tissu d'origine. Le tissu de granulation précédemment formé subit donc un remodelage. Une partie de la matrice extracellulaire est digérée par des protéases (essentiellement des métallo-protéases matricielles et des élastases), et on observe une réorganisation progressive de la matrice extracellulaire. Progressivement, le collagène de type III, majoritaire dans le tissu de granulation, est remplacé par le collagène de type I, principal composant matriciel du derme. A la fin de la phase de maturation, les fibroblastes, myofibroblastes et cellules vasculaires voient leur prolifération et/ou leur activité réduites. Puis, les cellules excédentaires meurent par apoptose. Parallèlement au remodelage de la matrice extracellulaire et à l'apoptose des cellules excédentaires.

La phase inflammatoire est une phase essentielle de la cicatrisation et doit être transitoire. Dans certains cas, elle peut être prolongée par la présence de certains agents infectieux

comme *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* ou par une pathologie préexistante comme le diabète, une déficience immunitaire ou encore une insuffisance veineuse. La résolution de l'inflammation est un point critique qui conditionne l'amorçage de la réparation tissulaire. Une perturbation de cette phase va engendrer un prolongement anormal de la phase inflammatoire et aboutir à la chronicité de la lésion en retardant la réparation tissulaire. La résolution de l'inflammation est un phénomène dynamique qui implique l'apoptose des cellules inflammatoires, leur élimination et l'apparition de médiateurs anti-inflammatoires, chimiotactiques et angiogéniques. Une manière d'évaluer le bon déroulement de cette période critique, qu'est la phase de résolution, est d'analyser les exsudats provenant de la plaie (cellules et médiateurs). En effet, la chronicité inflammatoire se traduit par un afflux plus important de cellules inflammatoires, une production excessive de nombreuses cytokines et chimiokines inflammatoires et de protéases qui dégradent la matrice cellulaire. Inversement la phase de résolution implique l'apparition d'un certain type de macrophages responsables de la phagocytose des cellules inflammatoires apoptotiques. Ces macrophages sont aussi impliqués dans la production de médiateurs favorisant la phase de granulation ainsi que la réparation tissulaire. L'analyse de l'exsudat permettra au médecin d'évaluer la phase inflammatoire et sa résolution, et permettra ainsi de choisir de traiter la plaie par un agent thérapeutique adapté de manière à favoriser une meilleure cicatrisation.

Traditionnellement, les plaies sont recouvertes par un pansement pour empêcher une contamination par des agents infectieux présents dans l'environnement, mais également pour maintenir la plaie dans un milieu humide favorisant la cicatrisation. Cependant, ce système de protection ne permet pas d'analyser les exsudats et de visualiser la cicatrisation en temps réel. De plus, l'exsudat s'accumule dans le pansement et sature le milieu absorbant du pansement. Le pansement doit donc être changé régulièrement pour éviter la macération de la plaie, ce qui implique un risque de contamination de la plaie qui est exposée momentanément à l'air libre. De plus, les pansements peuvent également adhérer, même faiblement à la plaie, et induire ainsi

des lésions à la plaie lors de leur retrait. Ces nouvelles agressions engendrent une poursuite de l'inflammation, qui a pour conséquence de prolonger la phase inflammatoire et donc de modifier de façon substantielle la cinétique de cicatrisation, ce
5 à quoi le dispositif de la demanderesse remédie de façon efficace.

Des chambres implantables ont été mises au point pour étudier la cicatrisation de plaies du derme sur des animaux tels que la souris ou le porc. Cependant, ces chambres implantables sont insérées en partie sous la peau de l'animal et sont maintenues en
10 place par des points de suture. Cette méthode est donc invasive, c'est à dire qu'elle présente comme inconvénient majeur de nécessiter un acte chirurgical et risque donc de provoquer une réaction inflammatoire chez le sujet en question, en créant des agressions tissulaires lors de son implantation. Ces agressions
15 tissulaires auront des conséquences néfastes sur le bon déroulement de la cicatrisation. De plus, elles ont essentiellement été mises au point pour modéliser les mécanismes de cicatrisation chez l'animal.

Enfin, la société ACUEITY, dans son brevet WO 2004/045674,
20 décrit un dispositif pour recueillir l'exsudat provenant des glandes mammaires. Le dispositif en question est constitué d'un réservoir contenant un tampon absorbant qui est en contact avec le mamelon et le dispositif est maintenu en place au-dessus du mamelon par un adhésif. L'exsudat est absorbé par le tampon et ne
25 peut donc pas être analysé en temps réel ; de plus les exsudats récoltés au sein du tampon ne sont pas purs et des risques de perte et/ou de dégradation au moment de leur extraction du tampon peuvent être constatés. Ce dispositif n'est pas muni d'un système d'ouverture et doit donc être enlevé afin de récupérer les
30 exsudats du tampon à des fins d'analyse.

Il existe donc un réel besoin en un dispositif non-invasif permettant de recueillir des exsudats purs à des fins d'analyse en temps réel (notamment afin de contrôler le déroulement de phase inflammatoire et le démarrage de la phase de granulation) et
35 permettant de visualiser la progression de la cicatrisation sans être nécessairement obligé d'ouvrir ledit dispositif, ni de le retirer, assurant ainsi la protection de l'environnement intérieur du dispositif, et donc la protection de la plaie, vis à vis de

l'environnement extérieur (c'est-à-dire vis-à-vis des agents infectieux extérieurs, mais aussi de l'animal lui-même, ou de ses congénères, autrement dit, vis-à-vis du grattage, des morsures, des salissures, des chocs, ou encore des frottements) et vis à vis
5 du dispositif lui-même.

Invention :

Un premier objet de la présente invention est un dispositif non-invasif, permettant de recueillir les exsudats d'une plaie, comprenant une chambre ayant une paroi latérale, une extrémité
10 inférieure ouverte et une extrémité supérieure, une ouverture d'accès étant disposée sur l'extrémité supérieure et/ou sur la paroi latérale de ladite chambre, ledit dispositif étant destiné à être en contact avec la peau et à circonscrire la plaie lors de son utilisation par l'intermédiaire d'une interface.

15 Selon un mode de réalisation préféré, ledit dispositif comprend un moyen de fermeture amovible de la chambre, destiné à être disposé en position fermée, sur l'ouverture d'accès de la chambre.

Selon un mode de réalisation particulier du dispositif,
20 l'interface est un adhésif disposé sur l'extrémité inférieure de la chambre dudit dispositif.

Lors de son utilisation, le dispositif selon l'invention est simplement collé sur la peau saine de façon à circonscrire la plaie du patient grâce à son interface adhésive. Lors de la cicatrisation, la plaie suinte et l'exsudat s'écoule dans le
25 dispositif. Une fois qu'une quantité d'exsudat suffisante pour les analyses a été recueillie dans le dispositif, l'exsudat est prélevé, par exemple en ouvrant le moyen de fermeture. Il est à noter de plus, que lorsque l'exsudat est prélevé régulièrement, la
30 plaie ne macère pas ce qui favorise une cicatrisation rapide.

Ledit dispositif selon l'invention est dépourvu de tout moyen absorbant. Cela permet d'éviter une macération de la plaie due à la saturation dudit moyen absorbant par l'exsudat comme cela peut être le cas avec un pansement. De plus, l'absence de moyen
35 absorbant permet d'éviter tout piégeage ou dégradation des protéines, métabolites et cellules présentes dans l'exsudat, tout ceci dans l'objectif de récupérer des exsudats purs et sans perte de cellules et de métabolites.

Selon un mode de réalisation particulier, le dispositif est étanche au niveau de la zone d'interaction dispositif/peau du sujet. Ainsi, l'exsudat recueilli dans la chambre ne peut pas s'échapper par les bords dudit dispositif. Il est également possible de rajouter une lèvre en matériau semi rigide conformable, éventuellement à mémoire de forme, tel que notamment le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), le POM-C (copolymère de polyacétal), le PEKK (polyéther cétone cétone), le silicone, le polyuréthane ou encore le polyamide, sur la partie inférieure de l'élément de maintien, lèvre qui peut se révéler utile lorsque la surface sur laquelle le dispositif est fixé n'est pas plane, permettant ainsi d'augmenter l'étanchéité dudit dispositif.

Selon un mode de réalisation particulier, le dispositif comprend un moyen de réaliser des échanges gazeux entre l'intérieur dudit dispositif et l'air extérieur afin d'assurer une bonne cicatrisation de la plaie en évitant l'hypoxie et/ou l'anoxie. Ledit moyen de réaliser des échanges gazeux est préférentiellement un filtre qui permet de maintenir l'intérieur du dispositif stérile, c'est-à-dire d'éviter une contamination par l'environnement extérieur. Des exemples de filtres utilisables sur le dispositif selon l'invention peuvent notamment être des filtres réalisés en polyuréthane, des non tissés, des frittés (disques poreux de silice compressée) ou encore une membrane stérile. Le filtre peut notamment être placé sur, sous ou dans le moyen de fermeture, mais aussi sur, sous ou dans les parois latérales de la chambre, la partie externe dudit filtre étant toujours en contact avec l'environnement extérieur au dispositif.

Selon un mode de réalisation particulier, le dispositif comprend un système de graduation pour évaluer la quantité d'exsudat contenue dans le dispositif.

La chambre du dispositif peut notamment être un élément de forme tubulaire, préférentiellement réalisée en matériau rigide tel que le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), le POM-C (copolymère de polyacétal), le PEKK (polyéther cétone cétone) ou le polyamide. Eventuellement, la chambre du dispositif pourra être réalisée en matériau souple tel que notamment le polyuréthane ou le silicone.

La chambre de forme tubulaire doit avoir un volume interne suffisamment élevé pour recueillir tout l'exsudat généré par une plaie soit $5000 \text{ g/m}^2/24\text{h}$. Cependant, afin de ne pas trop déranger le patient, la hauteur du dispositif devrait être
5 préférentiellement inférieure à 1 centimètre. Afin de mieux caractériser cette chambre, il est possible de la décrire par sa contenance maximale en exsudats qui est inférieure à 1mL/cm^2 , préférentiellement inférieure à $700\mu\text{L/cm}^2$, et de façon encore plus préférentielle, inférieure à $500\mu\text{L/cm}^2$.

10 De manière avantageuse, ledit dispositif comprend, en outre, un élément de maintien, éventuellement de forme tubulaire, circonscrit ou inscrit à ladite chambre, ouvert à ses deux extrémités. Par « élément de maintien circonscrit à la chambre », on entend, au sens de la présente invention, un élément de
15 maintien qui entoure par l'extérieur la paroi latérale de la chambre dans sa partie inférieure. Par « élément de maintien inscrit dans la chambre », on entend, au sens de la présente invention, un élément de maintien qui est disposé à l'intérieur de la chambre, à proximité de la paroi latérale et dans la partie
20 inférieure de la chambre.

Selon un mode de réalisation préféré, l'élément de maintien de forme tubulaire est réalisé en matériau semi-rigide à mémoire de forme, tel que notamment le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), le POM-C (copolymère de polyacétal), le PEKK (polyéther cétone
25 cétone), le silicone, le polyuréthane ou le polyamide.

Selon un autre mode de réalisation préféré, l'élément de maintien et la chambre tubulaire sont dotés chacun d'un moyen permettant de les solidariser. Ce moyen peut être un pas de vis, un clip, une goupille, un système de baïonnette, un système de
30 verrouillage et/ou éventuellement de la colle.

Lorsque le dispositif présente un élément de maintien circonscrit à la chambre, la section de la chambre tubulaire est inférieure à la section de l'élément de maintien. Lorsque le dispositif présente un élément de maintien inscrit dans la
35 chambre, la section de la chambre tubulaire est supérieure à la section de l'élément de maintien. Dans l'un ou l'autre de ces modes de réalisation, il importe que la plus petite ouverture de l'extrémité inférieure du dispositif ait une surface supérieure à

celle de la plaie à traiter, de façon à la circonscrire. Dans le cas où l'élément de maintien est inscrit dans la chambre tubulaire, la section de ladite chambre peut se rétrécir au niveau de sa partie supérieure, tel un goulot de bouteille. Dans un autre mode de réalisation, la partie supérieure de ladite chambre pourra avoir un diamètre supérieur à l'élément de maintien, ou bien le même diamètre, auquel cas, la visualisation de la plaie sera complète.

De nombreuses formes peuvent être envisagées, aussi bien pour la section de la chambre tubulaire que pour celle de l'élément de maintien, telles que notamment circulaire, ovale, elliptique, carrée, rectangulaire. Selon un mode de réalisation préféré, la chambre et l'élément de maintien ont la même forme. Cependant, il n'est pas nécessaire que la chambre et l'élément de maintien aient la même forme. On peut, par exemple, envisager d'adapter une chambre tubulaire cylindrique sur un élément de maintien parallélépipédique.

Selon un mode de réalisation préféré, l'extrémité inférieure de la chambre tubulaire et/ou de l'élément de maintien peut notamment présenter une collerette conformable externe réalisée en matériau souple, tel que par exemple du polyuréthane ou du silicone.

Selon un autre mode de réalisation particulier, ladite collerette peut être un élément dissocié de la chambre ou de l'élément de maintien. Elle se caractérise en un élément perforé en matériau souple, matériau souple choisi parmi la liste des matériaux souples tels que définis précédemment, et vient se circonscrire autour de la partie externe de l'ensemble élément de maintien/chambre tubulaire, et ce de façon la plus proximale possible de cet ensemble.

Lorsque le dispositif ne comprend pas d'élément de maintien, l'interface dudit dispositif est un adhésif disposé sur l'extrémité inférieure de la chambre, et notamment sur la collerette si celle-ci est présente. La présence de la collerette permet d'augmenter la surface de contact entre l'interface adhésive du dispositif et la peau du patient améliorant ainsi le maintien du dispositif sur la peau.

Lorsque le dispositif comprend un élément de maintien, l'interface est un adhésif disposé sur une jupe en matériau souple. Ladite jupe en matériau souple est maintenue entre la paroi latérale de la chambre et l'élément de maintien avec un
5 moyen permettant de solidariser ces trois éléments, tels que un pas de vis, un clip, une goupille, un système de verrouillage et/ou éventuellement de la colle. Le matériau souple de la jupe peut notamment être choisi parmi le groupe comprenant des supports souples conformables tels que des films, des mousses, des
10 silicones et des non tissés. Cette souplesse permet d'adapter le dispositif sur des zones non-planes telles que notamment une phalange, un genou ou un coude. Ainsi par jupe, on entend au sens de la présente invention, un élément comprenant une seule perforation, pouvant notamment être évasé et avoir une forme de
15 tronc de cône. L'interface peut notamment être plane lorsqu'elle n'est pas intégrée au dispositif et prendre une forme évasée lorsqu'elle est fixée entre la chambre tubulaire et l'élément de maintien.

L'interface ne doit pas entrer en contact avec la plaie du
20 patient. Elle est fixée au niveau du pourtour des berges de la plaie sur la peau saine du patient, le tout dans un but de circonscription de la plaie. L'interface doit être suffisamment résistante pour que le dispositif puisse tenir plusieurs jours sur la peau sans que l'étanchéité, au niveau de la zone
25 peau/dispositif, du dispositif n'en soit affectée.

La jupe peut avoir différents types de formes possibles, telles que des formes simples, carrées, rondes, rectangulaires, triangulaires, à bords arrondis, ou plus élaborées en forme d'étoiles, ou encore en forme de trèfle, dont les branches peuvent
30 être ou non de même dimensions, afin de pouvoir s'adapter à l'endroit du corps sur lequel le dispositif est fixé. Pour la forme trèfle, celle-ci présente l'avantage de ne pas autoriser de plissures au niveau de ses parties proximales de la chambre, et permet également une conformabilité améliorée selon la position
35 occupée sur la partie du corps du sujet sur laquelle est positionné le dispositif.

Selon un mode de réalisation préféré, la surface libre de l'interface est recouverte d'une barrière protectrice telle que

notamment un film plastique. Cette barrière protectrice préserve les propriétés adhésives du dispositif et empêche une contamination éventuelle par des poussières ou par des germes avant l'utilisation dudit dispositif.

5 On peut également prévoir que l'adhésif constituant ladite interface soit pré-enduit c'est-à-dire que l'adhésif ait été appliqué lors de la fabrication du dispositif ou alors enduit par l'utilisateur au moment de l'utilisation du dispositif, c'est-à-dire une fois que le dispositif est sorti de son emballage de protection. L'enduction peut notamment être effectuée au moyen
10 d'un pinceau, ou encore d'une spatule, c'est-à-dire par enduction manuelle, avant de positionner ledit dispositif sur la peau du sujet.

L'adhésif, constituant l'interface peut notamment être choisi
15 dans le groupe comprenant des colles chirurgicales, des filmogels, de la nitrocellulose, du collodion, du cyanoacrylate, des masses hydrocolloïdes, des adhésifs acryliques, des adhésifs UV ou encore des adhésifs « Hot Melt ».

Le moyen de fermeture amovible dudit dispositif permet
20 d'accéder facilement à la plaie. Ledit moyen de fermeture amovible s'adapte sur la (ou les) ouverture(s) d'accès à la chambre, préférentiellement sur l'extrémité supérieure de la chambre, par un pas de vis, un clip, une goupille, un moyen de sertissage et/ou un système de baïonnette.

25 Ce moyen de fermeture peut préférentiellement être réalisé en matériau semi-rigide ou rigide tel que le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), le POM-C (copolymère de polyacétal), le PEKK (polyéther cétone cétone), le polyamide, le silicone, ou encore par toute matière métallique, telle que l'aluminium.

30 Selon un mode de réalisation particulier, ledit moyen de fermeture amovible est relié à la chambre tubulaire par un moyen de liaison, tel que notamment un lien plastique. Cela permet d'éviter de perdre ledit moyen de fermeture lorsque celui-ci est séparé de la chambre tubulaire. Selon un mode de réalisation
35 particulier le moyen de fermeture peut être facilement retiré afin de photographier ou filmer la plaie et son évolution.

Selon un mode de réalisation préféré, le dispositif comprend un moyen de visualisation de la plaie. Ainsi la chambre tubulaire

et le moyen de fermeture peuvent être réalisés en matériaux transparents. On peut également prévoir une fenêtre transparente, munie éventuellement d'une lentille grossissante, sur le moyen de fermeture du dispositif. L'avantage de ce moyen de visualisation est de pouvoir suivre l'évolution de la cicatrisation ou de toute infection qui pourrait survenir. De plus, cette surveillance est effectuée sans intervenir directement sur la plaie ce qui permet d'éviter toute mauvaise manipulation de la plaie ou sa réouverture. De surcroît, cela permet de visualiser la plaie sans que celle-ci ne soit exposée à l'environnement extérieur qui peut contenir des agents pathogènes, gage de non-contamination de l'intérieur de la chambre tubulaire. Le moyen de fermeture peut également être muni d'un diaphragme. Lorsque le diaphragme est en position ouverte, l'utilisateur peut voir la plaie et lorsque le diaphragme est en position fermée, la plaie n'est plus visible.

Selon un mode de réalisation préféré, le dispositif comprend au moins un septum ou une microvanne destiné à prélever ou injecter du liquide. Ce septum permet notamment de prélever l'exsudat sans enlever le dispositif ce qui préserve la stérilité du milieu interne. Ce septum peut également être utilisé pour injecter une solution afin de nettoyer ou désinfecter la plaie. Le septum peut également être utilisé pour injecter une solution contenant un agent pharmacologique ou un agent thérapeutique tel que notamment un antibiotique, un antidouleur, un anti-infectieux, ou encore un agent cicatrisant. De par l'absence d'un moyen absorbant dans le dispositif, la solution injectée sera en contact direct avec la plaie, contrairement à un pansement. Le septum peut être placé sur le moyen de fermeture ou sur la paroi de la chambre tubulaire et éventuellement de l'élément de maintien. Avantagement, deux canalisations comprenant des moyens de fermeture, tels que des septums ou des microvannes, peuvent être positionnés de part et d'autre de la paroi latérale de la chambre tubulaire afin de faciliter le lavage de la plaie. Ainsi, la solution nettoyante, par exemple, est injectée par un septum, circule dans le dispositif, et est extraite par le deuxième septum.

L'exsudat peut également être collecté dans le dispositif, à des fins d'analyse, par ouverture du moyen de fermeture ou

directement par prélèvement « in situ ». L'exsudat recueilli contient tous les facteurs et métabolites produits lors de la cicatrisation. L'exsudat contient également des cellules vivantes et fonctionnelles qui peuvent éventuellement être remises en culture afin de réaliser des études phénotypiques et fonctionnelles, ex vivo. De surcroît, l'exsudat peut contenir des agents pathogènes, tels que des bactéries, qui peuvent être facilement identifiés après prélèvement ce qui permettra au médecin de prescrire un traitement adapté.

10 Selon un mode de réalisation particulier, le dispositif comprend un moyen de modifier la pression à l'intérieur dudit dispositif, tel que notamment une ventouse ou bien un système tubulaire relié à une pompe. Cette pression, si elle est négative dans la chambre tubulaire, permet de favoriser la cicatrisation. 15 Il est également possible d'obtenir une légère surpression créée par un apport en oxygène supplémentaire, dans le cadre des thérapies à l'oxygène (Oxygénothérapie hyperbare dans le traitement des ulcères ischémiques. Sang Thrombose Vaisseaux, Vol 9 N°8 p497-503, oct. 1997).

20 On peut également combiner un ou plusieurs modes de réalisation du dispositif selon l'invention. Ainsi, par exemple, l'invention peut porter sur un dispositif qui comprend au moins un septum ou une microvanne, destiné à prélever ou injecter du liquide et/ou un moyen apte à réaliser des échanges gazeux entre 25 l'intérieur dudit dispositif et l'extérieur et/ou moyen apte à modifier la pression à l'intérieur dudit dispositif.

L'invention sera mieux comprise à la lumière des figures suivantes qui ne sont qu'illustratives et ne sauraient en rien limiter l'invention.

30 La figure 1 est une vue en coupe transversale d'un des modes de réalisation de l'invention. Le dispositif (1) est constitué d'une chambre tubulaire (2) comprenant une paroi latérale (3), et deux extrémités, inférieure (4) et supérieure (5), ouvertes. Ladite extrémité inférieure (4) de la chambre tubulaire (2) 35 présente une collerette (6) externe en matériau souple. L'interface (7) du dispositif (1) est constituée d'une couche mince de colle chirurgicale, appliquée sur la surface inférieure de la collerette (6) de la chambre tubulaire (2). Un moyen de

fermeture (8) du dispositif (1) est fixé à la partie supérieure de la chambre tubulaire (2) au moyen d'une goupille (9).

La figure 2 représente une photographie d'un mode de réalisation d'un dispositif (21) comprenant une chambre tubulaire (22) ayant une paroi latérale (23) et deux extrémités, inférieure (24) et supérieure, ouvertes. L'extrémité inférieure (24) présente une collerette (26) externe. Un moyen de fermeture (28) est fixé à la partie supérieure de la chambre tubulaire (22) au moyen d'un clip (non représenté ici).

La figure 3 est une représentation schématique éclatée d'un dispositif (31) selon l'invention constitué d'une chambre tubulaire (32) de forme cylindrique et d'un élément de maintien (39) ayant une section de diamètre inférieur au diamètre de la chambre tubulaire (32). Ledit élément de maintien (39) est donc inscrit dans l'extrémité inférieure (34) de ladite chambre tubulaire (32) et maintenu par un clip. La paroi latérale (33) de la chambre tubulaire (32) est munie de deux septums (40 et 41) diamétralement opposés, qui permettent de réaliser un lavage facile de la plaie. Le deuxième septum (41) étant situé au niveau de l'élément de maintien (39), ce dernier est donc muni d'une ouverture ayant sensiblement la même taille que celle du septum (41). L'interface (37), est constituée d'un adhésif disposé sur la surface inférieure d'une jupe (42) en matériau souple qui a pour forme un élément comprenant une seule perforation, évasé, en forme de tronc de cône. Ladite jupe est fixée entre l'élément de maintien (39) et la paroi latérale (33) de la chambre tubulaire (32) ce qui permet de maintenir la jupe en place. La surface libre de l'interface (37) adhésive est protégée par un film protecteur (43). Un moyen de fermeture (38) est fixé à la partie supérieure de la chambre tubulaire (32) par un pas de vis (non visible ici).

La figure 4 représente une photographie d'un autre mode de réalisation dudit dispositif selon l'invention. Ce dispositif (51) se compose d'une chambre tubulaire (52), d'un élément de maintien inscrit dans la chambre tubulaire (52) et fixé au moyen d'un clip (non visible ici). L'interface est constituée d'un adhésif disposé sur la surface inférieure d'une jupe (62) en matériau souple qui est maintenue en place entre l'élément de maintien et la paroi latérale de la chambre tubulaire (52). La surface libre de

l'interface est protégée par un film protecteur (non visible ici). Un moyen de fermeture (58) s'adapte sur la partie supérieure de la chambre tubulaire (52) par un pas de vis. Ledit moyen de fermeture (58) est muni en son centre d'un septum (60) qui est utilisé pour
5 prélever l'exsudat à l'intérieur du dispositif (51) sans avoir à ouvrir le dispositif.

La figure 5 est une vue en coupe transversale d'un dispositif (71) selon l'invention, constitué d'une chambre tubulaire (72) comprenant une paroi latérale (73), et deux extrémités, inférieure
10 (74) et supérieure (75), ouvertes. Un élément de maintien (79) est inscrit dans l'extrémité inférieure (74) de ladite chambre tubulaire (72) et est maintenu en place par un clip (84). L'interface (77) du dispositif est constituée d'un adhésif disposé sur la surface inférieure d'une jupe (82) en matériau souple
15 correspondant à un élément tubulaire en forme de tronc de cône, c'est-à-dire que son ouverture supérieure présente un diamètre plus petit que son ouverture inférieure. Ladite ouverture supérieure de la jupe est fixée entre l'élément de maintien (39) et la paroi latérale (33) de la chambre tubulaire (32) par un clip
20 (84) ce qui permet de maintenir la jupe en place. La surface inférieure libre de l'interface (77) adhésive est protégée par un film protecteur (83). Un moyen de fermeture (78) du dispositif (71) est fixé à la chambre tubulaire au moyen d'un pas de vis (85). Ledit moyen de fermeture est réalisé en matériau transparent
25 afin de visualiser la plaie et il est muni en son centre d'un septum (80) afin de recueillir l'exsudat.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation du dispositif décrit précédemment pour suivre l'évolution de la cicatrisation d'une plaie. En effet, le dispositif permet de recueillir et
30 d'analyser l'exsudat issu d'une plaie. Pour suivre l'évolution de la cicatrisation d'une plaie, il convient de positionner le dispositif au-dessus de la plaie. Il faut alors attendre qu'une quantité suffisante d'exsudat s'accumule dans le dispositif. Afin d'optimiser la récupération des facteurs et médiateurs produits
35 ainsi que des cellules pouvant adhérer à la plaie, un lavage de la plaie à l'aide d'une solution physiologique peut être envisagé. On peut alors prélever l'exsudat contenu dans le dispositif par ouverture du dispositif ou à l'aide d'une seringue au travers du

septum. L'exsudat ainsi prélevé peut être analysé pour connaître l'état d'avancement de la phase inflammatoire et de la cicatrisation en général ou savoir si un agent infectieux est présent dans la plaie.

5 Selon un mode d'utilisation particulier dudit dispositif, une solution est injectée dans le dispositif après son application sur la peau. Cette solution peut contenir un agent désinfectant et/ou nettoyant qui permet de rendre la plaie et le milieu intérieur du dispositif, propres et stériles. Cette solution peut également
10 contenir un agent thérapeutique ou un agent pharmacologique, tel que notamment un antibiotique, un antidouleur, un anti-infectieux ou encore un agent cicatrisant.

 Selon un mode d'utilisation particulier dudit dispositif, les exsudats prélevés dans ce dispositif pourront permettre leur
15 analyse en temps réel.

 Selon un mode d'utilisation particulier dudit dispositif, l'exsudat est prélevé à travers un septum ou une microvanne, présent sur le dispositif. Ce prélèvement permet de recueillir l'exsudat sans enlever le dispositif et sans intervenir
20 directement sur la plaie.

 Enfin, selon un autre mode d'utilisation particulier dudit dispositif, celui-ci pourra permettre de laver la plaie.

 Un autre objet de l'invention concerne une trousse ou kit pour recueillir l'exsudat des plaies comprenant :

- 25 - au moins un dispositif tel que décrit précédemment ;
 - au moins un dispositif de récupération, tel qu'une micro-pompe, un réservoir, ledit réservoir pouvant être éventuellement muni d'une canalisation qui le relie au dispositif de prélèvement, ou une seringue ;
30 - optionnellement une aiguille.

 Selon un mode de réalisation préféré, le kit comprend au moins une solution à injecter dans ledit dispositif. La solution à injecter comprend un principe actif désinfectant et/ou nettoyant et/ou un agent thérapeutique. Cette solution permet de stériliser
35 l'environnement de la plaie et/ou traiter une infection et/ou la plaie.

L'invention va être décrite plus en détails à l'aide des exemples suivants qui sont donnés à titre purement illustratif et non limitatif.

Exemples:

5 **Exemple 1 : Dispositif pour recueillir l'exsudat issu d'une plaie**

Le dispositif est tel que celui de la figure 5, et comprend :

- une chambre (72) de section circulaire de 0,5 cm de hauteur et 1 cm de diamètre en polyméthacrylate de méthyle ;
- 10 - un élément de maintien (79) à section circulaire de 0,2 cm de hauteur et 0,9 cm de diamètre en polyéther cétone cétone qui est inscrit dans la chambre (79) ;
- une interface (77) constituée d'un adhésif acrylique pré-enduit sur la surface inférieure d'une jupe (82) en film
- 15 souple ;
- un clip (84) permettant de fixer l'élément de maintien (79) et la jupe (82) en film souple à la chambre (72) tubulaire
- un film protecteur (83) en plastique protégeant la surface
- 20 libre de l'interface adhésive;
- un moyen de fermeture (78) à section circulaire en polyuréthane transparent, afin de pouvoir visualiser la plaie, qui est fixé à la chambre (72) tubulaire par un pas de vis (85) et qui comprend un septum (80) destiné à
- 25 prélever l'exsudat.

Exemple 2 : Utilisation du dispositif sur une plaie de 0,75 cm²

On souhaite suivre la cicatrisation d'une plaie d'environ 0,75 cm² présente sur l'avant-bras gauche d'un patient.

Pour cela, on utilise le dispositif de l'exemple 1.

- 30 On ouvre le système de fermeture (78) du dispositif afin de visualiser la partie basse de la chambre (72) tubulaire et de l'élément de maintien (79). On enlève le film protecteur (83) de l'interface (77) adhésive. On positionne l'interface (77) adhésive sur l'avant-bras gauche du patient autour de sa plaie, en prenant
- 35 garde à ce que l'interface (77), la chambre (72) tubulaire et l'élément de maintien (79) n'entrent pas en contact avec la plaie. On exerce une légère pression pendant 2 à 3 minutes pour assurer

un bon maintien sur l'avant-bras. On visse le moyen de fermeture (78) sur la chambre. A un temps déterminé, on injecte une solution de lavage par le septum (80) du moyen de fermeture (78) de la chambre (72) tubulaire puis on prélève l'exsudat par le septum 5 grâce à une seringue munie d'une aiguille. On analyse l'exsudat afin de vérifier qu'aucun agent infectieux n'est présent dans la plaie.

Exemple 3 : Kit

Le kit contient le dispositif selon l'exemple 1 ainsi que 10 deux seringues, deux aiguilles, une solution de lavage et un flacon stérile. Le dispositif stérile est mis en place comme dans l'exemple 2 et stérilisé grâce à la solution de lavage qui est injectée à travers le septum par une seringue munie d'une aiguille selon l'exemple 2. La deuxième seringue et la deuxième aiguille 15 permettent d'évacuer la solution désinfectante après le lavage de la plaie. L'exsudat prélevé est transféré dans le flacon stérile en vue d'analyses biologiques.

REVENDEICATIONS

1. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) non invasif permettant de recueillir les exsudats d'une plaie comprenant une chambre (2, 22, 32, 52, 72) ayant une paroi latérale (3, 23, 33, 73), une
5 extrémité inférieure (4, 24, 34, 74) ouverte et une extrémité supérieure (5, 75), une ouverture d'accès étant disposée sur l'extrémité supérieure (5, 75) et/ou sur la paroi latérale (3, 23, 33, 73) de ladite chambre (2, 22, 32, 52, 72), ledit dispositif (1, 21, 31, 51, 71) étant destiné à être en contact avec la peau
10 et à circonscrire la plaie lors de son utilisation par l'intermédiaire d'une interface (7, 37, 77).

2. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen de fermeture (8, 28, 38, 58, 78) amovible de la chambre (2, 22, 32, 52, 72), destiné à être
15 disposé en position fermée, sur l'ouverture d'accès de la chambre (2, 22, 32, 52, 72).

3. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'interface (7, 37, 77) est un adhésif disposé sur l'extrémité inférieure (4, 24, 34, 74) de la chambre
20 (2, 22, 32, 52, 72).

4. Dispositif (31, 51, 71) selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, un élément de maintien (39, 79), éventuellement de forme tubulaire, circonscrit ou inscrit à ladite chambre (32, 52, 72), ouvert à ses deux
25 extrémités.

5. Dispositif (31, 51, 71) selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'interface (37, 77) est un adhésif disposé sur une jupe (42, 62, 82) en matériau souple, ladite jupe (42, 62, 82) étant maintenue entre la paroi latérale (33, 73) de la chambre
30 (32, 52, 72) et l'élément de maintien (39, 79).

6. Dispositif (31, 51, 71) selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit matériau souple de la jupe (42, 62, 82) est choisi dans le groupe comprenant des supports souples conformables tels que des films, des mousses, des silicones et des
35 non tissés.

7. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que l'adhésif constituant

ladite interface (7, 37, 77) est pré-enduit ou enduit au moment de l'utilisation.

8. Dispositif (31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que l'élément de maintien (39, 79) et la chambre (32, 52, 72) tubulaire sont dotés chacun d'un moyen permettant de les solidariser.

9. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'extrémité inférieure (4, 24, 34, 74) de la chambre (2, 22, 32, 52, 72) et/ou de l'élément de maintien (39, 79) comprend une collerette (6, 26) conforme en matériau souple.

10. Dispositif (31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications 3 à 9, caractérisé en ce que ledit élément de maintien (39, 79) est en matériau semi-rigide à mémoire de forme.

11. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit moyen de fermeture (8, 28, 38, 58, 78) amovible s'adapte sur la (ou les) ouverture(s) d'accès de la chambre (2, 22, 32, 52, 72) par un pas de vis (85), un clip, une goupille (9), un moyen de sertissage et/ou un système de baïonnette.

12. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un septum (40, 41, 60, 80), ou une microvanne, destiné à prélever ou injecter du liquide et/ou un moyen apte à réaliser des échanges gazeux entre l'intérieur dudit dispositif (1, 21, 31, 51, 71) et l'extérieur et/ou moyen apte à modifier la pression à l'intérieur dudit dispositif (1, 21, 31, 51, 71).

13. Dispositif (1, 21, 31, 51, 71) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen de visualisation de la plaie.

14. Utilisation du dispositif (1, 21, 31, 51, 71) tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour surveiller la cicatrisation d'une plaie, et/ou pour analyser les exsudats de la plaie en temps réel.

15. Kit pour recueillir l'exsudat des plaies comprenant :
- au moins un dispositif (1, 21, 31, 51, 71) tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 13 ;

- au moins un dispositif de récupération, tel qu'une micro-pompe, un réservoir, ledit réservoir pouvant être éventuellement muni d'une canalisation qui le relie au dispositif (1, 21, 31, 51, 71), ou une seringue ;
- 5
- optionnellement une aiguille.

1/3

Fig. 1

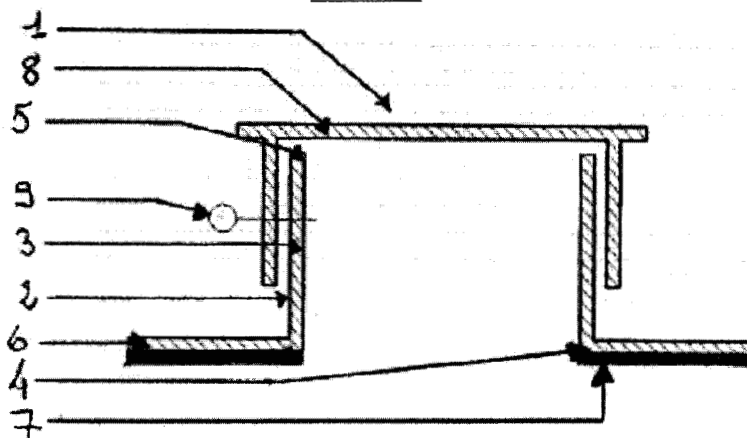
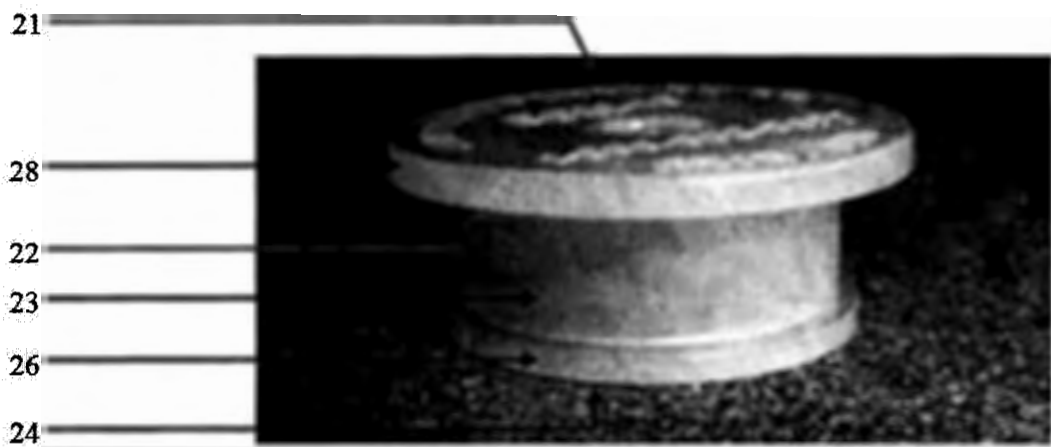


Fig. 2



2/3

Fig. 3

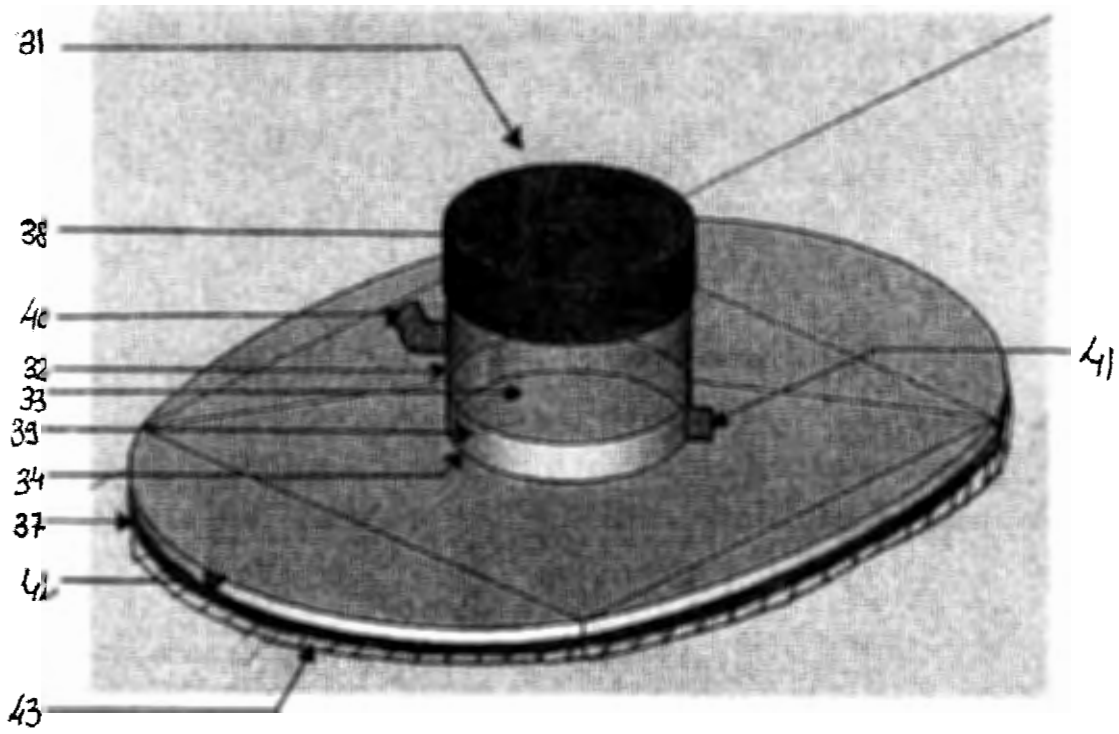


Fig. 4

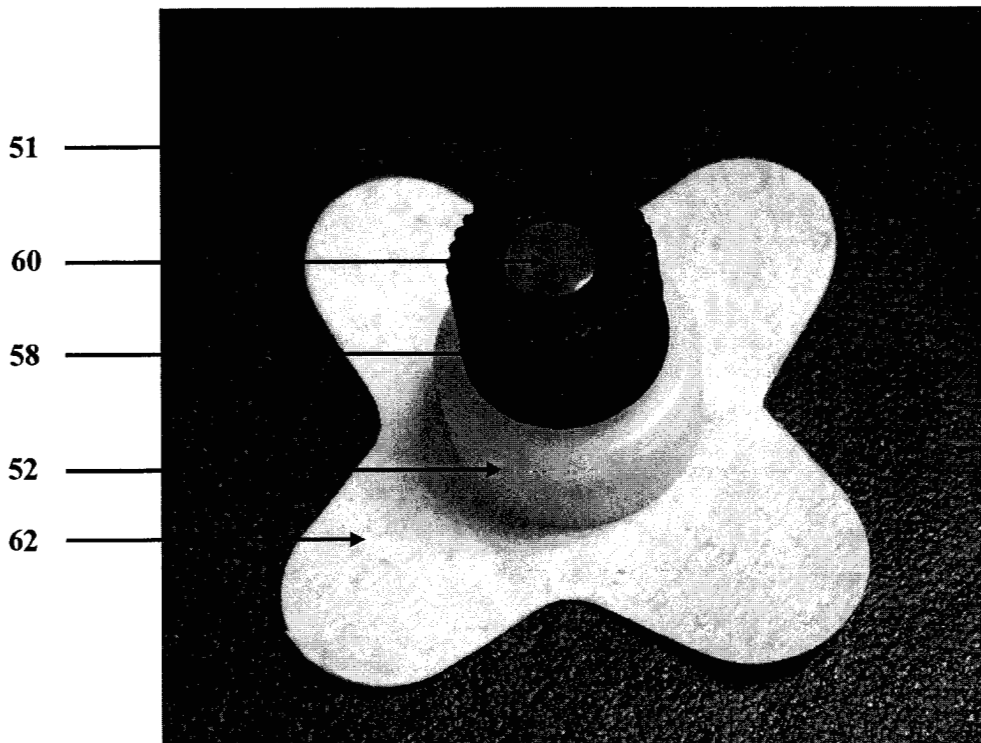
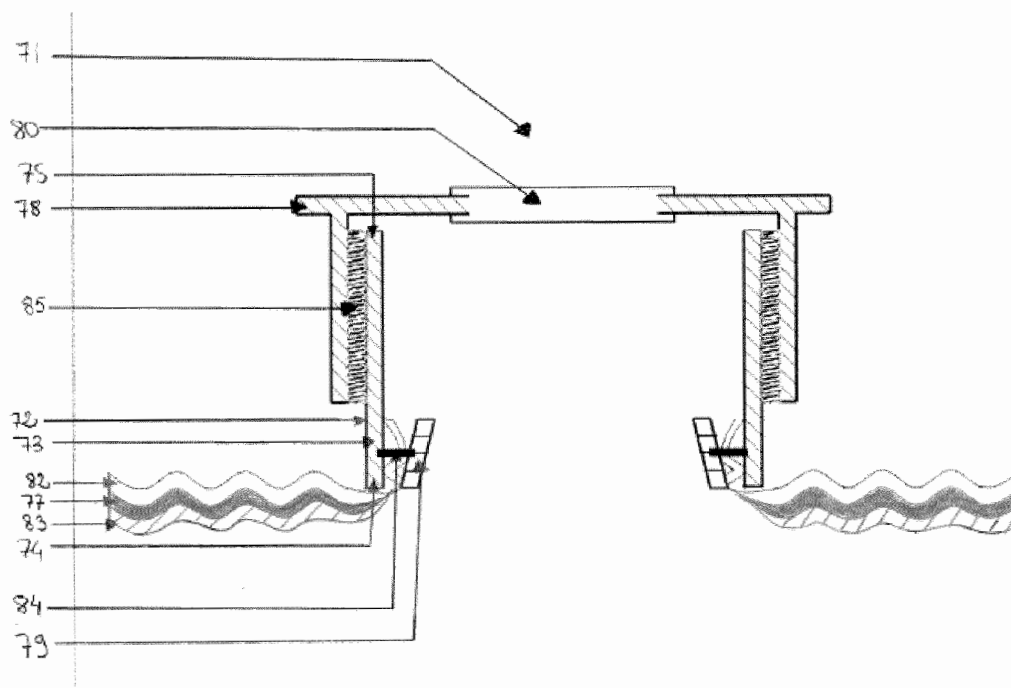


Fig. 5





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 761594
FR 1162295

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2007/191754 A1 (AALI ADEL [US]) 16 août 2007 (2007-08-16) * alinéas [0079], [0080], [0089] - [0091], [0104]; revendication 11; figures 9,10,17,35 *	1-15	A61B10/00
X	US 2010/256545 A1 (AALI ADEL [US] ET AL) 7 octobre 2010 (2010-10-07) * alinéas [0042] - [0046], [0093]; figures 1a.1b,10 *	1-15	
X	US 2005/222544 A1 (WESTON RICHARD S [US] WESTON RICHARD SCOTT [US]) 6 octobre 2005 (2005-10-06) * alinéas [0032], [0036], [0037], [0043], [0044]; figures 1a,2a *	1-3,7,9, 12,14,15	
X	US 2005/222528 A1 (WESTON RICHARD S [US] WESTON RICHARD SCOTT [US]) 6 octobre 2005 (2005-10-06) * alinéas [0026] - [0029], [0033]; figures 1,5 *	1-3,7, 11,12, 14,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	DE 10 2008 041785 A1 (PISTOR GERT [DE]) 4 mars 2010 (2010-03-04) * alinéas [0064], [0066], [0068], [0073]; figures 1,2 *	1-3, 7-10,13, 14	A61F A61M A61B
X	US 3 486 504 A (AUSTIN LAWTHAN M JR) 30 décembre 1969 (1969-12-30) * le document en entier *	1-3,7,9, 12,14	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 août 2012		Louka, Maria	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1162295 FA 761594**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **21-08-2012**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2007191754 A1	16-08-2007	AU 2007215213 A1	23-08-2007
		CA 2642259 A1	23-08-2007
		EP 1986584 A2	05-11-2008
		US 2007191754 A1	16-08-2007
		US 2011034888 A1	10-02-2011
		WO 2007095180 A2	23-08-2007
		-----	-----
US 2010256545 A1	07-10-2010	AU 2010236874 A1	27-10-2011
		CA 2757272 A1	21-10-2010
		CN 102448415 A	09-05-2012
		EP 2413858 A1	08-02-2012
		KR 20120025456 A	15-03-2012
		US 2010256545 A1	07-10-2010
		US 2012191026 A1	26-07-2012
WO 2010120470 A1	21-10-2010		
-----	-----	-----	-----
US 2005222544 A1	06-10-2005	US 2005222544 A1	06-10-2005
		US 2010274207 A1	28-10-2010
-----	-----	-----	-----
US 2005222528 A1	06-10-2005	US 2005222528 A1	06-10-2005
		US 2010160879 A1	24-06-2010
		US 2010174251 A1	08-07-2010
-----	-----	-----	-----
DE 102008041785 A1	04-03-2010	AUCUN	
-----	-----	-----	-----
US 3486504 A	30-12-1969	AUCUN	
-----	-----	-----	-----

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 984 719

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 11 62344

⑤1 Int Cl^B : A 61 B 5/00 (2013.01), A 61 B 10/00, G 01 N 33/48

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 22.12.11.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.06.13 Bulletin 13/26.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES URGO — FR,
SOCIETE DE DEVELOPPEMENT ET DE
RECHERCHE INDUSTRIELLE — FR, UNIVERSITE
PAUL SABATIER TOULOUSE III — FR et INSERM
(INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE) — FR.

⑦2 Inventeur(s) : DARDENNE CHRISTOPHE, PIPY
BERNARD, COSTE AGNES, BOUSCHBACHER
MARIELLE et LAURENSOU CHRISTELLE.

⑦3 Titulaire(s) : LABORATOIRES URGO, SOCIETE DE
DEVELOPPEMENT ET DE RECHERCHE INDUS-
TRIELLE, UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE
III, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE).

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤4 METHODE D'ANALYSE DE LA PROGRESSION DE LA CICATRISATION D'UNE PLAIE A DES NIVEAUX
MICROSCOPIQUES ET MACROSCOPIQUES.

⑤7 La présente invention porte sur une méthode non-in-
vasive d'analyse de la progression de la cicatrisation d'une
plaie, comprenant les étapes suivantes:
- fixer un dispositif non invasif de prélèvement sur le
pourtour de la plaie;
- faire une observation macroscopique de la plaie et/ou
de l'exsudat et/ou
- prélever l'exsudat contenu dans ledit dispositif et ana-
lyser ledit exsudat.

FR 2 984 719 - A1



**METHODE D'ANALYSE DE LA PROGRESSION DE LA CICATRISATION D'UNE
PLAIE A DES NIVEAUX MICROSCOPIQUES ET MACROSCOPIQUES.**

Domaine d'application :

La présente invention concerne une méthode d'analyse de la
5 progression de la cicatrisation d'une plaie en temps réel grâce à
un dispositif médical, non invasif et adapté, qui protège la plaie
et permet d'observer macroscopiquement la progression de la
cicatrisation d'une plaie ainsi que de recueillir les exsudats de
la plaie afin de réaliser un suivi cellulaire, mais aussi des
10 analyses biochimiques et moléculaires des métabolites et des
microorganismes contenus dans lesdits exsudats.

Art Antérieur :

La cicatrisation d'une plaie est un processus
physiopathologique naturel, les tissus humains et animaux étant
15 capables de réparer des lésions localisées par des processus de
réparation et de régénération qui leur sont propres.

La rapidité et la qualité de la cicatrisation d'une plaie
dépendent de l'état général de l'organisme atteint, de l'étiologie
de la plaie, de l'état et de la localisation de la plaie, et de la
20 survenue ou non d'une infection, ainsi que des facteurs génétiques
prédisposant ou non à des troubles de la cicatrisation.

La cicatrisation naturelle d'une plaie se déroule
principalement selon trois phases successives, chacune de ces
phases étant caractérisée par des activités cellulaires
25 spécifiques qui font progresser le processus de réparation selon
des séquences chronologiques précises : la phase inflammatoire, la
phase de granulation (ou phase proliférative), et la phase de
maturation, donnant l'aspect définitif de la cicatrice.

La première phase, la phase inflammatoire, débute dès la
30 rupture des vaisseaux sanguins qui déclenche la formation d'un
caillot (coagulation du sang) principalement composé de fibrine et
de fibronectine, et qui va constituer une matrice provisoire.
Cette matrice comble en partie la lésion et va permettre la
migration au sein de la zone lésée des cellules inflammatoires
35 recrutées pour assurer la détersion de la plaie. Les plaquettes
présentes vont également libérer des facteurs (par exemple des
cytokines, des facteurs de croissance) permettant le recrutement

de cellules impliquées dans le processus cicatriciel. Cette phase se caractérise par l'infiltration et l'activation sur le site de la lésion, de nombreuses cellules inflammatoires (tels les polynucléaires neutrophiles), mais aussi des cellules assurant le nettoyage de la plaie ou déterision (tels les macrophages).

La seconde phase correspond au développement du tissu de granulation. On observe d'abord une colonisation de la blessure par prolifération des fibroblastes. Puis, la migration des cellules endothéliales à partir des vaisseaux sains va permettre la néovascularisation, ou angiogenèse, du tissu lésé. Dans le tissu de granulation, les fibroblastes sont activés et vont se différencier en myofibroblastes présentant des propriétés contractiles importantes, générées par les microfilaments d'actine, permettant la contraction de la plaie. Ces microfilaments sont exprimés par une protéine : l'actine α -musculaire lisse. Ces myofibroblastes jouent donc un rôle majeur dans la formation et la maturation du tissu de granulation qui va conduire à la cicatrisation de la lésion. Il y a ensuite migration des kératinocytes et reconstruction de l'épiderme.

Cette phase est initiée par une diminution de l'état inflammatoire de la lésion s'accompagnant d'une apoptose des cellules inflammatoires.

La troisième phase du processus est une étape principalement de maturation visant à reconstruire un tissu fonctionnel le plus identique possible au tissu d'origine. Le tissu de granulation précédemment formé subit donc un remodelage. Une partie de la matrice extracellulaire est digérée par des protéases (essentiellement des métallo-protéases matricielles et des élastases), et on observe une réorganisation progressive de la matrice extracellulaire. Progressivement, le collagène de type III, majoritaire dans le tissu de granulation, est remplacé par le collagène de type I, principal composant matriciel du derme. A la fin de la phase de maturation, les fibroblastes, myofibroblastes et cellules vasculaires voient leur prolifération et/ou leur activité réduites. Puis, les cellules excédentaires meurent par apoptose. Parallèlement au remodelage de la matrice extracellulaire et à l'apoptose des cellules excédentaires.

La phase inflammatoire est une phase essentielle de la cicatrisation et doit être transitoire. Dans certains cas, elle

peut être prolongée par la présence de certains agents infectieux comme *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* ou par une pathologie préexistante comme le diabète, une déficience immunitaire ou encore une insuffisance veineuse. La résolution de l'inflammation est un point critique qui conditionne l'amorçage de la réparation tissulaire. Une perturbation de cette phase va engendrer un prolongement anormal de la phase inflammatoire et aboutir à la chronicité de la lésion en retardant la réparation tissulaire. La résolution de l'inflammation est un phénomène dynamique qui implique l'apoptose des cellules inflammatoires, leur élimination et l'apparition de médiateurs anti-inflammatoires, chimiotactiques et angiogéniques. Une manière d'évaluer le bon déroulement de cette période critique, qu'est la phase de résolution, est d'analyser les exsudats provenant de la plaie (cellules, médiateurs et métabolites). En effet, la chronicité inflammatoire se traduit par un afflux plus important de cellules inflammatoires, une production excessive de nombreuses cytokines et chimiokines inflammatoires et de protéases qui dégradent la matrice cellulaire. Inversement la phase de résolution implique l'apparition d'un certain type de macrophages responsables de la phagocytose des cellules inflammatoires apoptotiques. Ces macrophages sont aussi impliqués dans la production de médiateurs favorisant la phase de granulation ainsi que la réparation tissulaire. L'analyse de l'exsudat permettra au médecin d'évaluer la phase inflammatoire et sa résolution, et permettra ainsi de choisir de traiter la plaie par un agent thérapeutique adapté de manière à favoriser une meilleure cicatrisation.

Traditionnellement, les plaies sont recouvertes par un pansement pour empêcher une contamination par des agents infectieux présents dans l'environnement, mais également pour maintenir la plaie dans un milieu humide favorisant la cicatrisation. Cependant, ce système de protection ne permet pas d'analyser les exsudats et de visualiser la cicatrisation en temps réel. De plus, l'exsudat s'accumule dans le pansement et sature le milieu absorbant du pansement. Le pansement doit donc être changé régulièrement pour éviter la macération de la plaie, ce qui implique un risque de contamination de la plaie qui est exposée momentanément à l'air libre. De plus, les pansements peuvent

également adhérer, même faiblement à la plaie, et induire ainsi des lésions à la plaie lors de leur retrait. Ces nouvelles agressions engendrent une poursuite de l'inflammation, qui a pour conséquence de prolonger la phase inflammatoire et donc de
5 modifier de façon substantielle la cinétique de cicatrisation.

Des chambres implantables ont été mises au point pour étudier la cicatrisation de plaies du derme sur des animaux de laboratoires tels que la souris ou le porc. Cependant, ces chambres implantables sont insérées en partie sous la peau de
10 l'animal et sont maintenues en place par des points de suture. Cette méthode est donc invasive, c'est à dire qu'elle présente comme inconvénient majeur de nécessiter un acte chirurgical d'implantation de la chambre en partie sous la peau de l'animal et risque donc de provoquer une réaction inflammatoire chez le sujet
15 en question, en créant des agressions tissulaires lors de son implantation. Ces agressions tissulaires auront des conséquences néfastes sur le bon déroulement de la cicatrisation de l'animal. De plus, elles ont essentiellement été mises au point pour modéliser les mécanismes de cicatrisation chez l'animal comme par
20 exemple, une souris ou le porc. Ainsi, avec de telles chambres invasives, il est impossible de réaliser un suivi visuel, cellulaire, biochimique et moléculaire fiable des plaies notamment durant les premiers jours qui suivent l'implantation de ces chambres.

25 Il existe donc un réel besoin en une méthode non-invasive de prélèvement d'exsudats purs à des fins d'analyse en temps réel utilisant un dispositif non invasif et permettant de visualiser la progression de la cicatrisation sans être nécessairement obligé d'ouvrir ledit dispositif, ni de le retirer.

30 Invention :

Un premier objet de la présente invention est une méthode non-invasive d'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie qui met en œuvre un dispositif tel que décrit dans la demande de brevet N°FR 11 62295 déposée le 22 décembre 2011.

35 Ledit dispositif comprend notamment: une chambre ayant une paroi latérale, une extrémité inférieure ouverte et une extrémité supérieure, une ouverture d'accès étant disposée sur l'extrémité

supérieure et/ou sur la paroi latérale de ladite chambre, ledit dispositif étant destiné à être en contact avec la peau et à circonscrire la plaie lors de son utilisation par l'intermédiaire d'une interface.

5 Préférentiellement, ledit dispositif comprend un moyen de fermeture amovible de la chambre, destiné à être disposé en position fermée, sur l'ouverture d'accès de la chambre.

Cette méthode comprend les étapes suivantes:

- 10 - fixer le dispositif non invasif sur le pourtour de la plaie ;
- faire une observation macroscopique de la plaie et/ou de l'exsudat ; et/ou
- prélever l'exsudat contenu dans ledit dispositif et analyser ledit exsudat.

15 Dans la première étape de mise en œuvre de cette méthode, le dispositif de prélèvement est positionné de manière à circonscrire la plaie, ainsi ledit dispositif est fixé sur la peau saine autour de la plaie, par exemple grâce à une interface qui est adhésive. L'interface adhésive peut consister en un adhésif qui est appliqué
20 soit directement sur le dispositif juste avant de le positionner autour de la plaie, soit sur une jupe en matériau souple conformable, ou bien le dispositif ou la jupe peuvent être pré-enduits par un adhésif lors de leur fabrication. Dans ce cas, l'interface adhésive est avantageusement protégée par une barrière
25 protectrice qui devra être enlevée avant de positionner le dispositif autour de la plaie.

 Une fois le dispositif positionné au-dessus de la plaie, il convient d'exercer une pression suffisante sur la partie supérieure du dispositif jusqu'à la prise complète de l'adhésif et
30 à la fixation totale du dispositif autour de la plaie.

 Lors de l'étape de positionnement, et afin d'améliorer la tenue du dispositif autour de la plaie, on peut éventuellement enduire le pourtour de l'interface du dispositif ainsi que la peau au voisinage de la plaie et à proximité du dispositif par de
35 l'adhésif.

 Afin de faciliter l'étape de positionnement, il est préférable de visualiser la plaie afin de placer le dispositif sur la peau saine autour de la plaie. Pour cela, on peut notamment

retirer le moyen de fermeture du dispositif avant de positionner ce dernier. En effet, le dispositif de prélèvement utilisé dans la méthode selon l'invention comprend un moyen de fermeture qui permet d'accéder facilement à la plaie sans avoir à retirer le
5 dispositif. Ledit moyen de fermeture est fixé sur la partie supérieure de la chambre du dispositif ou sur la paroi latérale de la chambre du dispositif, notamment par un pas de vis, un clip, une goupille, un moyen de sertissage et/ou un système de baïonnette. Une fois que le dispositif est fixé sur la peau autour
10 de la plaie par son interface adhésive, le moyen de fermeture du dispositif est replacé sur la chambre dudit dispositif, par exemple en le vissant ou à l'aide d'une goupille insérée dans des orifices adaptés placés sur le moyen de fermeture et sur la chambre du dispositif.

15 La visualisation de la plaie permettant un bon positionnement du dispositif peut également être réalisée sans ouvrir le dispositif, en regardant à travers le moyen de fermeture dudit dispositif, notamment lorsque le moyen de fermeture est réalisé en matériau transparent et/ou est muni d'une lentille transparente,
20 éventuellement grossissante.

Cette étape de positionnement du dispositif permet de le fixer autour de la plaie de manière temporaire et non-invasive. Le dispositif doit être fixé à la peau de manière suffisante pendant toute la durée de la cicatrisation. Il est à noter de plus que le
25 dispositif est étanche au niveau de la zone d'interaction dispositif/peau du sujet. Ainsi, l'exsudat recueilli dans la chambre ne peut pas s'échapper par les bords dudit dispositif.

La deuxième étape de la méthode selon l'invention est l'observation macroscopique de la plaie et/ou de l'exsudat.

30 Par observation macroscopique, la demanderesse entend toute analyse réalisée de manière externe, c'est-à-dire de manière non-invasive ou encore sans intervention sur le site en question, de la plaie et/ou de l'exsudat.

Selon un mode de réalisation préféré, l'observation macroscopique
35 de la plaie et/ou de l'exsudat comprend la détermination des paramètres physico-chimiques de ladite plaie et/ou dudit exsudat. Par paramètres physico-chimiques, on entend, au sens de la présente invention, différentes caractéristiques sensorielles de la plaie et/ou de l'exsudat, telles que notamment l'aspect de la

plaie (couleur, texture, profondeur, superficie, odeur) et/ou l'aspect de l'exsudat (couleur, odeur, limpidité, viscosité).

L'observation macroscopique de la plaie peut ainsi consister en un suivi visuel, voire olfactif, de l'état et de la progression de la cicatrisation de la plaie. Ainsi, une observation simple de la plaie pourra être effectuée à l'aide d'un appareil photographique, d'une caméra vidéo, ou bien tout simplement grâce à l'œil humain. Une observation grossie pourra quant à elle être réalisée à l'aide d'une loupe, d'un dermoscope ou bien dans un autre registre, via une application pour « smartphone » comme par exemple l'application MOWA (« Mobile Wound Analyser »). Enfin, une observation offrant encore de meilleures résolutions visuelles pourra être mise en œuvre à l'aide d'une microscopie biphotonique, d'une diffusion Raman, d'une microscopie confocale, d'un IRM, d'une échographie haute fréquence, ou encore par capillaroscopie. Ce dernier type de technologies permet une observation en profondeur de la plaie, de l'ordre de quelques centaines de micromètres, ce qui est impossible à l'œil nu. Il est à noter que des moyens de suivi étalons seront envisagés pour chaque type de technique de visualisation macroscopique utilisé. Un des modes de réalisation préféré de la présente invention réside en une prise de photographie qui peut notamment être effectuée sans ouvrir le dispositif lorsque celui-ci est réalisé en matériau transparent et/ou est muni d'une lentille transparente, éventuellement grossissante. Ce mode de réalisation est particulièrement aisé à mettre en œuvre. Dans le cas contraire, la prise de photographie est réalisée après avoir retiré le moyen de fermeture du dispositif, ledit moyen de fermeture étant remis en position fermée sur le dispositif une fois la photographie prise. La fréquence de la prise de photographie peut notamment être d'une photographie par jour, ce qui permet de visualiser la cinétique de la progression de la cicatrisation de la plaie.

Les différentes photographies sont préférentiellement prises avec les mêmes réglages afin de pouvoir comparer les photographies entre elles. Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, l'appareil photographique est positionné à la même distance de la plaie et avec le même angle pour chaque photographie, en utilisant par exemple un banc de photographie.

Selon un mode de réalisation préféré, la prise de la photographie peut être suivie ou simultanée à une comparaison avec un ou des moyens de suivi macroscopiques étalons. Ainsi, avant de prendre la photographie, on peut positionner à proximité du dispositif un moyen d'étalonnage tel que notamment un objet
5 comprenant des graduations, et/ou un nuancier de teintes bien définies. Une fois les différentes photographies prises, le moyen d'étalonnage permet notamment de comparer les photographies, même lorsque les réglages de l'appareil photographique diffèrent, et de
10 réaliser des mesures de la plaie sur les photographies.

Selon un mode de réalisation préféré, des analyses biologiques sont réalisées sur l'exsudat pour caractériser et/ou quantifier les différentes populations cellulaires contenues. Il est également possible de déterminer la présence mais aussi de
15 quantifier les métabolites et/ou les microorganismes contenus dans ledit exsudat.

Afin de réaliser ces analyses pour le suivi de la progression de la plaie grâce à la méthode selon l'invention, l'exsudat contenu dans le dispositif peut être prélevé et ledit exsudat est
20 analysé. L'analyse peut notamment être une évaluation plus spécifique des paramètres physico-chimiques de l'exsudat prélevé par rapport aux mêmes paramètres observés sans prélèvement de l'exsudat. Ainsi on pourra déterminer avec plus de précision le volume d'exsudat produit par la plaie, mais aussi tous les
25 paramètres ayant trait aux propriétés propres dudit exsudat (pH, T°C, couleur, odeur, limpidité, viscosité).

Ledit prélèvement de l'exsudat peut notamment être effectué au moyen d'une pipette, munie d'un moyen d'aspiration tel qu'un cône, et/ou d'une seringue, soit après ouverture du moyen de
30 fermeture du dispositif, soit au travers d'un septum positionné sur la paroi latérale de la chambre du dispositif ou sur le moyen de fermeture du dispositif. Le prélèvement de l'exsudat au travers du septum permet de conserver la stérilité du milieu interne du dispositif vis-à-vis du milieu extérieur dudit dispositif.

Lorsque l'exsudat contenu dans le dispositif est trop visqueux pour pouvoir être facilement prélevé à la seringue, on peut avantageusement rendre l'exsudat moins visqueux en injectant dans le dispositif une solution physiologique, comme par exemple du sérum physiologique ou encore une solution diluée de chlorure
35

de sodium. Selon un mode de réalisation préféré, on peut aspirer et réinjecter plusieurs fois la solution composée d'exsudat dilué par la solution physiologique afin de bien laver le site de la plaie et de récupérer le maximum de cellules, métabolites et/ou
5 microorganismes afin de faciliter les analyses ultérieures.

Par métabolite, la demanderesse entend tous les composés organiques susceptibles d'être retrouvés dans une plaie, tels que par exemple, des protéines (protéines inflammatoires ou anti-inflammatoires, des facteurs de croissance, des protéines de la
10 matrice extracellulaire comme le collagène ou la fibrine), des lipides (tels que des acides gras, des leucotriènes), de acides aminés, des hormones, de l'albumine, de l'urée.

Par microorganismes, la demanderesse entend tous les microorganismes susceptibles d'être retrouvés sur une plaie,
15 infectée ou non, tels que par exemple, des bactéries (telles que celles composées par le genre *Staphylococcus* comme par exemple, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, par le genre *Enterococcus*, comme par exemple *E.faecalis*, par le genre *Pseudomonas*, comme par exemple *P.aeruginosa*, par la famille des Entérobactéries, du type
20 *E.coli*, *Enterobacter species*, *Proteus species*, *Serratia species*, ou encore par des bactéries du type anaérobique, comme *Clostridium species* ou *Bacteroides species*), des levures (*Candida albicans*), des virus (rétrovirus, adénovirus), ou encore des parasites (ectoparasites, endoparasites, mesoparasites),

25 Par cellules, la demanderesse entend toutes les cellules susceptibles d'être retrouvées sur une plaie, telles que notamment des cellules inflammatoires (granulocytes), des fibroblastes, ou encore des kératinocytes.

L'exsudat prélevé est alors transféré dans un contenant
30 adapté, tel que notamment un tube à essai ou un flacon muni d'un septum. Selon un mode de réalisation particulier, lorsque le prélèvement de l'exsudat dans le dispositif est réalisé au travers d'un septum et que l'exsudat est transféré dans un flacon muni d'un septum, l'exsudat n'est pas en contact avec l'air libre ce
35 qui empêche sa contamination par des agents pathogènes extérieurs.

Si le moyen de fermeture a été retiré pour réaliser le prélèvement de l'exsudat, ledit moyen de fermeture est remis en position fermée sur le dispositif après le prélèvement.

Les analyses biologiques qui peuvent être réalisées sur l'exsudat sont multiples et variées. Ainsi, dès le premier jour de la mise en œuvre de la méthode selon l'invention, on peut effectuer un suivi phénotypique et fonctionnel des populations cellulaires, telles que notamment les cellules inflammatoires ou les cellules cutanées. Ces analyses, réalisées notamment à l'aide de la cytométrie en flux, permettent de suivre les différentes étapes de la cicatrisation dont plus particulièrement la phase inflammatoire, bien que le suivi de la deuxième phase, dite phase de granulation ou d'épidermisation (appelée également phase de prolifération) puisse également être réalisé. Ces analyses permettent de vérifier que la phase de granulation commence et que la phase inflammatoire ne persiste pas dans le temps, ce qui pourrait nuire à une bonne cicatrisation. Ainsi si l'on réalise un suivi par cytométrie en flux du nombre de granulocytes présents dans l'exsudat, on verra, au tout début de la phase inflammatoire que les granulocytes sont majoritaires. Si la phase inflammatoire se déroule correctement, quelques jours après la survenue de la plaie, le nombre de granulocytes aura fortement diminué, avec parallèlement une augmentation du nombre de monocytes et de fibroblastes qui permettent la formation du tissu de granulation. Si l'on constate que les granulocytes sont encore très nombreux trois jours après la survenue de la plaie, il est possible que la plaie présente un défaut dans la phase de résolution de l'inflammation qui peut trouver sa cause dans une infection bactérienne par exemple. Si le type de bactérie est identifié par l'analyse appropriée, le médecin pourra alors prescrire un traitement antibiotique, qui sera avantageusement injecté dans le dispositif afin d'être en contact avec la plaie et d'éliminer l'infection avant que des complications n'apparaissent.

Les analyses réalisées sur l'exsudat peuvent également permettre d'établir un suivi des médiateurs produits pendant la cicatrisation, tels que notamment les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL12, IL1- β , IL6...) et anti-inflammatoires (TGF- β et IL-10), les médiateurs lipidiques comme les leucotriènes, les prostaglandines ou encore les facteurs de croissance (VEGF, PDGF). Ces médiateurs peuvent notamment être quantifiés par un dosage ELISA. L'analyse de métabolites, et plus particulièrement de médiateurs contenus dans l'exsudat permet également de suivre

l'avancée de la cicatrisation. Ainsi, par exemple, si l'exsudat contient un taux anormalement élevé en quantité de cytokines inflammatoires, cela indique que la phase inflammatoire n'est pas terminée ce qui peut nuire à la bonne cicatrisation de la plaie.

5 En effet, la présence prolongée de cytokines inflammatoires dans la plaie peut provoquer la dégradation de la matrice cellulaire et induire une chronicité de la plaie.

La méthode selon l'invention peut également comprendre une étape supplémentaire de lavage de la plaie, par exemple par une
10 solution physiologique classique du type sérum physiologique, Chlorure de Sodium, eau stérile, eau savonneuse, ou encore une solution de Lacate de Ringer mais aussi éventuellement par une solution comprenant un agent antibactérien et/ou un agent thérapeutique, auquel cas, la mise en contact de ces solutions sur
15 le site cicatriciel sera prolongée, en comparaison à la mise en contact d'une solution de lavage dite classique sur le site cicatriciel. Ainsi, si l'on souhaite nettoyer la plaie, on peut mettre au contact de la plaie une solution physiologique classique, par exemple après l'étape de positionnement du
20 dispositif. On laisse la solution agir quelques minutes et on l'enlève du dispositif. D'une autre façon, si l'on souhaite traiter la plaie, on peut mettre au contact de la plaie une solution contenant un agent thérapeutiquement actif, par exemple tous les jours après l'étape d'observation macroscopique de la
25 plaie et/ou de l'exsudat ou bien éventuellement après l'étape d'analyse de l'exsudat. On laisse la solution agir plusieurs minutes voire heures ou encore jours et on l'enlève ensuite du dispositif si et seulement si la solution n'a pas été totalement absorbée au niveau de la plaie.

30 Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, la méthode comprend une étape supplémentaire dans laquelle une solution de lavage ou une solution comprenant un ou plusieurs agents thérapeutiquement actifs est mise en contact avec la plaie à l'aide dudit dispositif. Ainsi, le dispositif utilisé dans la
35 méthode permet de tester de nouveaux actifs, notamment des actifs cicatrisants ou antimicrobiens, directement au contact de la plaie. Ainsi, il sera possible d'utiliser diverses formes galéniques d'actifs, telles que notamment des solutions d'actifs permettant une action plus localisée sur la lésion, et plusieurs

concentrations d'actifs. Ceci permettra donc de tester l'efficacité de certains actifs ainsi que de tester la tolérance de la plaie par rapport à la concentration de chacun des actifs. L'avantage majeur résidant bien évidemment dans la possibilité de
 5 tester une forme galénique particulière et atypique sur le site cicatriciel, c'est-à-dire non envisageable en temps normal sans l'aide dudit dispositif de la demanderesse, telle qu'une solution liquide d'agents actifs. De manière générale, les actifs sont choisis parmi :

10 -les antibactériens tels que la polymyxine B, les pénicillines, l'acide clavulanique, les tétracyclines, la minocycline, la chlorotétracycline, les aminoglycosides, l'amikacine, la gentamicine, la néomycine, l'argent et ses sels (sulfadiazine argentique).

15 -les antiseptiques tels que le mercuriothiolate de sodium, l'éosine, la chlorhexidine, le borate de phénylmercure, l'eau oxygénée, la liqueur de Dakin, le triclosan, le biguanide, l'hexamidine, le thymol, le lugol, la povidone iodée, le merbromine, le chlorure de benzalkonium et de benzéthonium,
 20 l'éthanol et l'isopropanol.

-les antiviraux tels l'acyclovir, la famciclovir, le ritonavir.

-les antifongiques tels que les polyènes, le nystatin, l'amphotéricine B, la natamycine, les imidazolés (miconazole, ketoconazole, clotrimazole, éconazole, bifonazole, butoconazole, fenticonazole, isoconazole, oxiconazole, sertconazole, sulconazole, thiabendazole, tioconazole), les triazolés, les allylamines, la terbinafine, l'amorolfine, la naftifine, la buténafine.
 25

30 -les antidouleurs tels que le paracétamol, la codéine, le dextropropoxyphène, le tramadol, la morphine et ses dérivés, les corticoïdes et ses dérivés.

- les cicatrisants : le KSOS, le sucralfate, l'allantoïne, le collagène ou l'acide hyaluronique.

35 Un autre objet de l'invention est une méthode d'analyse de la cicatrisation d'une plaie chez un animal comprenant les étapes suivantes:

- créer une plaie;

- fixer le dispositif de prélèvement sur le pourtour de la plaie ;
 - faire une observation macroscopique de la plaie et/ou de l'exsudat ; et/ou
- 5 - prélever l'exsudat contenu dans ledit dispositif et analyser ledit exsudat.

La présente méthode, de même que la méthode précédemment décrite supra, sont réalisées sur l'animal. Par animal, on entend, au sens de la présente invention, un animal ou l'être humain.

10 L'animal chez lequel on veut étudier la progression de la cicatrisation peut notamment être une souris, un porc et/ou un rat. Il peut également s'agir de l'être humain, en particulier des personnes souffrant d'un trouble métabolique ou d'une pathologie

(tel que un diabète, une immunodéficience, une malnutrition, ou

15 encore une insuffisance veineuse) qui influence le phénomène de cicatrisation.

Dans le cas du murin, avant de créer la plaie, ledit animal doit être préparé pour l'opération. Ainsi, on procède tout d'abord à l'anesthésie locale ou générale de l'animal. L'anesthésie peut

20 notamment être réalisée par injection d'une solution anesthésiante pouvant être un mélange de kétamine et de xylazine. Après anesthésie de l'animal, on attend le temps nécessaire pour que l'anesthésie fasse effet. Si besoin, l'animal est ensuite tondu sur la zone où l'on souhaite créer la plaie. Cette étape-là est

25 une étape dont on peut s'affranchir dans le cas de l'être humain. Néanmoins, selon les cas, elle peut être adaptée, et ceci au moyen d'une anesthésie locale de la zone de création de la plaie.

On procède alors à la création d'une plaie sur l'animal. La plaie peut notamment être superficielle ou profonde c'est-à-dire

30 qu'elle va jusqu'à l'hypoderme ou jusqu'au tissu musculaire.

Qu'elles soient superficielles ou profondes, la littérature décrit déjà plusieurs manières de réaliser une plaie. Les plaies peuvent être de natures différentes selon les domaines d'études qui sont privilégiés.

35 Dans la méthode selon l'invention, la plaie est créée mécaniquement, chimiquement, thermiquement et/ou par rayonnement. La plaie peut être créée mécaniquement à l'aide d'outils tels que des ciseaux, un emporte-pièce ou « biopsy punch ». Dans ce cas-là,

on peut tracer la délimitation de la future lésion cutanée, en utilisant par exemple un marqueur et un patron. La peau de l'animal peut alors être pincée pour être coupée au ciseau ou à l'aide d'un scalpel, en suivant la ligne délimitant la lésion cutanée ou alors la peau peut être tendue afin d'y exercer une pression à l'aide d'un emporte-pièce ou « biopsy punch ». Des plaies superficielles peuvent également être créées mécaniquement. On peut notamment faire un « stripping » en apposant un adhésif puis en le retirant de la future zone de création de la plaie. En répétant l'opération plusieurs fois, il est ainsi possible de créer une lésion plus ou moins superficielle à la surface de la peau. D'une manière semblable, il est également possible d'effectuer un frottement prolongé sur l'épiderme à l'aide d'outils tel qu'une râpe. D'autres moyens de création de lésion peuvent également être considérés tels que notamment les produits chimiques. Une solution caustique (soude, acide nitrique...) peut être déposée sur la partie de la peau à léser. La concentration de l'agent utilisé ainsi que la durée d'exposition détermineront la profondeur des plaies. Ce type de blessure s'apparente aux brûlures (source chaude et/ou froide, électrique, rayonnement...) qu'il est également possible de reproduire. Ainsi, tout comme l'emploi de produits chimiques, la profondeur et l'étendue de la brûlure dépendra essentiellement de la durée et des propriétés physico-chimiques des outils ou solutions employés. De manière plus particulière, des systèmes de dépression pourront être employés afin de produire des décollements (bulles de succion) ou phlyctènes. On peut également envisager des procédures d'écrasement de la peau, mais aussi des procédures de ligature ou de section vasculaire, afin d'obtenir des plaies ischémiques. Il sera également possible de créer une plaie avec un appareil émettant un rayonnement, tel que le LASER ou des rayons ionisants de type β ou gamma.

Le dispositif de prélèvement est alors fixé sur la peau saine autour de la plaie au moyen de son interface adhésive comme décrit précédemment.

L'observation macroscopique de la plaie est réalisée de façon préférentielle en prenant des photographies de la plaie comme décrit précédemment. Le suivi biologique de la plaie par prélèvement de l'exsudat contenu dans le dispositif et son analyse

est réalisé comme décrit précédemment. Ainsi, on peut notamment réaliser le suivi phénotypique et fonctionnel de diverses populations cellulaires, telles que notamment les granulocytes, les lymphocytes, les monocytes, les fibroblastes, et/ou réaliser le suivi de métabolites contenus dans l'exsudat tels que notamment les cytokines, les médiateurs lipidiques, les facteurs de croissance, voire également le suivi de microorganismes, tel que décrit précédemment.

De plus, il peut être intéressant d'étudier l'influence de divers facteurs pathologiques ou physiologiques sur la cicatrisation de la plaie sur l'animal. Ainsi, on peut comparer la cicatrisation d'un animal présentant un état physiologique particulier par rapport à celle d'un animal sain. De plus, puisque la méthode selon l'invention met en œuvre un dispositif non-invasif, on peut réaliser un suivi fiable des médiateurs et des métabolites produits dès la création de la plaie chez l'animal, ce qui n'était pas possible avec les dispositifs invasifs implantés sous la peau de l'art antérieur.

La méthode selon l'invention peut également comprendre une étape supplémentaire de lavage de la plaie par une solution physiologique comprenant un agent antibactérien et/ou un agent thérapeutique, telle que décrite précédemment. Ainsi, si l'on souhaite nettoyer la plaie, on peut mettre au contact de la plaie une solution comprenant un agent antibactérien, par exemple après l'étape de positionnement du dispositif. On laisse la solution agir quelques minutes et on l'enlève du dispositif. Au contraire, si l'on souhaite traiter la plaie, on peut mettre au contact de la plaie une solution contenant un agent thérapeutiquement actif, par exemple plusieurs minutes voire heures ou encore jours et ce tous les jours après l'étape de prise de la photographie et/ou après l'étape d'analyse de l'exsudat. On laisse la solution agir sur le site cicatriciel et on l'enlève du dispositif si et seulement si elle n'a pas été totalement absorbée au niveau de la plaie. Cette étape supplémentaire peut notamment permettre d'étudier l'influence et l'efficacité d'un agent thérapeutiquement actif sur la cicatrisation de la plaie de l'animal.

Il sera ainsi possible, par exemple, d'appliquer la méthode selon l'invention à deux groupes d'animaux, un groupe de contrôle d'animaux qui n'est pas traité par un agent thérapeutiquement

actif et un groupe test d'animaux qui reçoit un traitement avec agent thérapeutiquement actif, et ce tous les jours. En comparant les photographies prises entre les deux groupes d'animaux, et/ou en comparant les analyses biologiques des exsudats, on pourra
5 vérifier si l'agent thérapeutiquement actif améliore la cicatrisation des plaies et adapter le dosage ou la fréquence d'administration du traitement.

L'invention sera mieux comprise à la lumière des figures suivantes qui ne sont qu'illustratives et ne sauraient en rien
10 limiter l'invention.

La figure 1 est une vue en coupe transversale d'un dispositif permettant la mise en œuvre de l'invention.

La figure 2 est une photographie d'une souris sur laquelle on a créé une plaie dorsale.

15 La figure 3 est une photographie de la souris de la figure 2 sur laquelle on a fixé la chambre d'un dispositif de prélèvement sur la peau saine autour de la plaie par un adhésif.

La figure 4 est une photographie de la souris de la figure 3 sur laquelle on a fixé le moyen de fermeture sur la chambre du
20 dispositif au moyen d'une goupille.

La figure 5 représente différentes photographies d'une plaie sur une souris saine, les photographies étant prises à différents intervalles de temps à partir du jour de la création de la plaie (J0) jusqu'au 14ème jour après la création de la plaie (J14).

25 La figure 6 représente les différents résultats de l'analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires contenues dans l'exsudat issu d'une plaie sur une souris saine, les analyses étant réalisées à différents intervalles de temps à partir du 1er jour après la création de la plaie (J1) jusqu'au 7ème jour après
30 la création de la plaie (J7).

La figure 7 est un graphique représentant la quantité d'une cytokine anti-inflammatoire (TGF- β), mesuré par dosage ELISA, contenues dans les exsudats issus de plaies dorsales chez des souris saines.

35 L'invention va être décrite plus en détails à l'aide des exemples suivants qui sont donnés à titre purement illustratif et non limitatif.

Exemples:**Exemple 1 : Création d'une plaie et mise en place du dispositif sur la plaie dorsale de la souris.**

Afin de créer une plaie sur une souris telle que photographiée sur la Figure 2, la souris est d'abord anesthésiée par injection d'un mélange de kétamine et de xylazine par voie intra-péritonéale. Ensuite, on coupe la peau de la souris avec un ciseau, sur sa partie dorsale.

On va placer sur la souris le dispositif (1) de la figure 1. Le dispositif (1) est constitué d'une chambre tubulaire (2) comprenant une paroi latérale (3), et deux extrémités, inférieure (4) et supérieure (5), ouvertes. Ladite extrémité inférieure (4) de la chambre tubulaire (2) présente une collerette (6) externe en matériau souple. L'interface (7) du dispositif (1) est constituée d'une couche mince de colle chirurgicale, appliquée sur la surface inférieure de la collerette (6) de la chambre tubulaire (2). Un moyen de fermeture (8) du dispositif (1) est fixé à la partie supérieure de la chambre tubulaire (2) au moyen d'une goupille (9).

On retire le moyen de fermeture du dispositif en le dégoupillant. On enlève la goupille (9) afin de retirer le moyen de fermeture (8) du dispositif (1). On enduit la surface inférieure de la collerette (6) de la chambre tubulaire (2) d'une couche mince de colle chirurgicale afin de constituer l'interface (7) du dispositif. Le dispositif (1) est positionné au-dessus de la plaie de manière à la circonscrire. On exerce une pression suffisante sur la partie supérieure du dispositif (1) jusqu'à la prise complète de l'adhésif sur la peau de la souris selon la figure 2. On enduit la surface extérieure et le pourtour de la collerette (6) du dispositif (1) ainsi que la peau à proximité du dispositif de colle chirurgicale jusqu'à prise complète de l'adhésif tel que photographié sur la figure 3. On replace le moyen de fermeture (8) sur le dispositif en insérant une goupille (9) et en l'insérant dans des orifices placés sur la chambre (2) du dispositif (1) et sur le moyen de fermeture (8) afin de maintenir ces deux éléments ensemble. Le dispositif (1) est alors fixé sur le dos de la souris tel que photographié sur la figure 3.

Exemple 2 : Suivi photographique de l'avancée de la cicatrisation d'une plaie dorsale chez la souris.

On réalise l'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie chez une souris saine sur laquelle on a créé une plaie selon l'exemple 1 et positionné un dispositif (1) toujours selon l'exemple 1. La souris est anesthésiée avec un gaz et disposée sur un banc de photographie comprenant des graduations régulières afin de réaliser un étalonnage. On enlève la goupille (9) afin de retirer le moyen de fermeture (8) du dispositif (1). On prend la photographie avec un appareil photographique classique, que l'on peut trouver dans le commerce. On replace le moyen de fermeture (8) sur le dispositif en chauffant une goupille (9) et en l'insérant dans des orifices placés sur la chambre (2) du dispositif (1) et sur le moyen de fermeture (8) afin de maintenir ces deux éléments ensemble. Une photographie par jour est prise, et ce dès le jour de la création de la plaie et pendant 14 jours. Les différentes photographies prises sont présentées sur la figure 4. Comme on l'observe sur les photographies, de J0 à J5, correspondant à la phase inflammatoire et au démarrage de la phase proliférative, la taille de la plaie ne varie pas mais l'on assiste à la formation d'un tissu de granulation recouvrant progressivement le fascia musculaire mis à nu lors de l'excision du tissu cutané. De J5 à J14 la taille de la plaie diminue grâce au développement du tissu de granulation contenant les myofibroblastes permettant la contraction de la plaie. A J14, la plaie est quasiment refermée.

Exemple 3 : Suivi cellulaire de l'avancée de la cicatrisation d'une plaie dorsale chez une souris saine.

On réalise l'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie sur une souris saine sur laquelle on a créé une plaie selon l'exemple 1 et positionné un dispositif de prélèvement toujours selon l'exemple 1. Avant de prélever l'exsudat, la souris est anesthésiée avec un gaz. Une solution physiologique est injectée à la seringue au travers d'un septum placé sur le moyen de fermeture du dispositif. On aspire et on réinjecte à la seringue trois fois l'exsudat dilué par la solution physiologique afin de bien laver le site de la plaie et de récupérer le maximum de cellules pour l'analyse.

L'exsudat dilué est prélevé à la pipette et est transféré dans un flacon muni d'un septum.

Afin de déterminer la cinétique d'infiltration des granulocytes, caractérisés par l'expression des antigènes Ly6G et 7/4 à leur surface, les cellules sont incubées durant 15 minutes avec des anticorps anti-souris Ly6g et 7/4 chacun couplés à des fluorochromes. Enfin les cellules de l'exsudat sont de nouveau lavées. Les populations cellulaires de l'exsudat sont analysées par cytométrie en flux. Les données sont acquises par un cytomètre FACScalibur (BD Biosciences) en utilisant le logiciel CellQuest Pro.

Le prélèvement de l'exsudat et son analyse par cytométrie en flux sont réalisés 24 heures après la création de la plaie et répétés chaque jour pendant une semaine. Les résultats, présentant les différentes intensités de fluorescence pour chaque anticorps, sont regroupés sur la figure 6. A J1 post-lésion, on observe un exsudat composé essentiellement de granulocytes, représentés par un fort marquage Ly6G et 7/4. Dès J2 post-lésion, on observe une diminution progressive du marquage Ly6G jusqu'à sa disparition totale, tandis que le marquage 7/4 est conservé. Cette analyse des populations cellulaires composant l'exsudat permet de suivre la progression de la phase inflammatoire, caractérisée par l'infiltration des granulocytes, puis par leur disparition lors du démarrage de la phase proliférative.

Exemple 4 : Comparaison du nombre de cytokines anti-inflammatoires contenues dans l'exsudat issu d'une plaie dorsale d'une souris saine

On réalise le suivi de l'avancée de la cicatrisation d'une plaie sur un groupe de 2 souris saines. Sur chacune des deux souris, on crée une plaie selon l'exemple 1 et on positionne un dispositif de prélèvement toujours selon l'exemple 1. Avant de prélever l'exsudat, chaque souris est anesthésiée avec un gaz. Une solution physiologique de volume connu est injectée à la seringue au travers d'un septum placé sur la chambre du dispositif. On aspire et on réinjecte à la seringue trois fois l'exsudat dilué par la solution physiologique afin de bien laver le site de la plaie, d'homogénéiser l'exsudat. L'exsudat dilué est prélevé à la seringue et est transféré dans un flacon muni d'un septum puis

centrifugée afin de ne récupérer que le surnageant contenant les cytokines. Les cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires contenues dans l'exsudat sont analysées par dosage ELISA et sont réalisés 48 heures après la création de la plaie et répétés chaque

5 jour pendant une semaine. Le dosage de la cytokine TGF- β est représenté sur la figure 6. On observe une forte progression du taux de cytokines anti-inflammatoires du type TGF- β dès J2 post-lésion. Cette surproduction de cette cytokine anti-inflammatoire atteint son maximum à J5 post lésion, date de la fin de la phase

10 inflammatoire, avant de revenir à un stade normal, à la fin du processus de cicatrisation.

REVENDEICATIONS

1. Méthode non-invasive d'analyse de la progression de la cicatrisation d'une plaie, comprenant les étapes suivantes:
- 5 - fixer un dispositif non invasif de prélèvement sur le pourtour de la plaie ;
 - faire une observation macroscopique de la plaie et/ou de l'exsudat et/ou
 - prélever l'exsudat contenu dans ledit dispositif et analyser ledit exsudat.
- 10 2. Méthode d'analyse de la progression d'une plaie chez un animal comprenant les étapes suivantes:
- créer une plaie;
 - fixer un dispositif non invasif de prélèvement sur le pourtour de la plaie ;
 - 15 - faire une observation macroscopique de la plaie et/ou de l'exsudat et/ou
 - prélever l'exsudat contenu dans ledit dispositif et analyser ledit exsudat.
- 20 3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit dispositif de prélèvement est fixé à la peau autour de la plaie au moyen d'une interface.
4. Méthode selon l'une quelconque des revendications 2 et 3, caractérisée en ce que la plaie est créée mécaniquement, chimiquement, thermiquement et/ou par rayonnement.
- 25 5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'observation macroscopique de la plaie et/ou de l'exsudat comprend la détermination des paramètres physico-chimiques de ladite plaie ou dudit exsudat.
- 30 6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'observation macroscopique est suivie ou simultanée à une comparaison avec un ou des moyens de suivi macroscopiques étalons.
- 35 7. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'exsudat est prélevé au travers d'un septum positionné sur le dispositif de prélèvement.

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'analyse de l'exsudat permet de déterminer les métabolites, les composants cellulaires, et/ou les microorganismes contenus dans ledit exsudat et comprend la
5 détermination des paramètres physico-chimiques dudit exsudat.

FIGURES

Figure 1

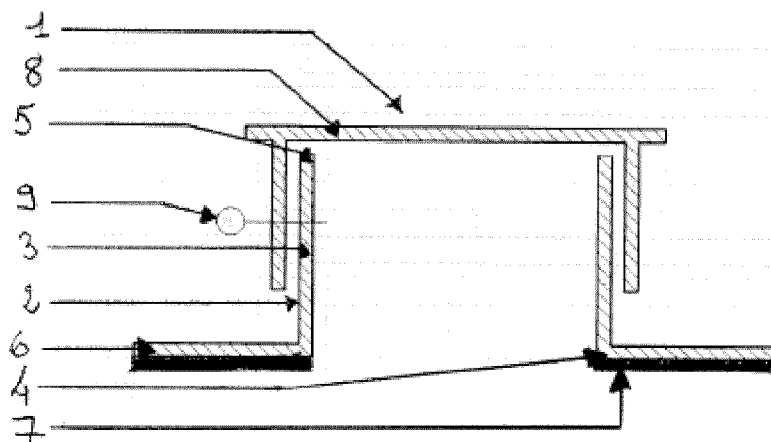


Figure 2

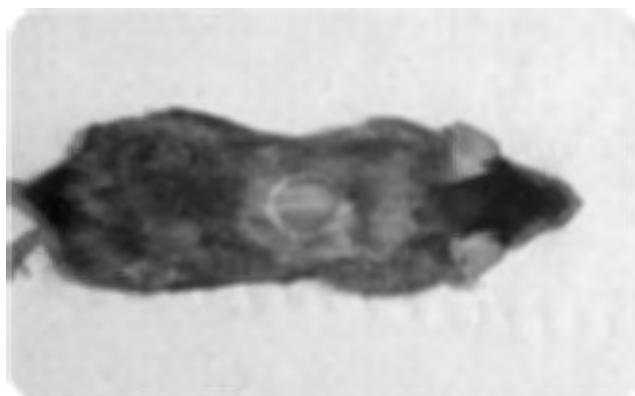


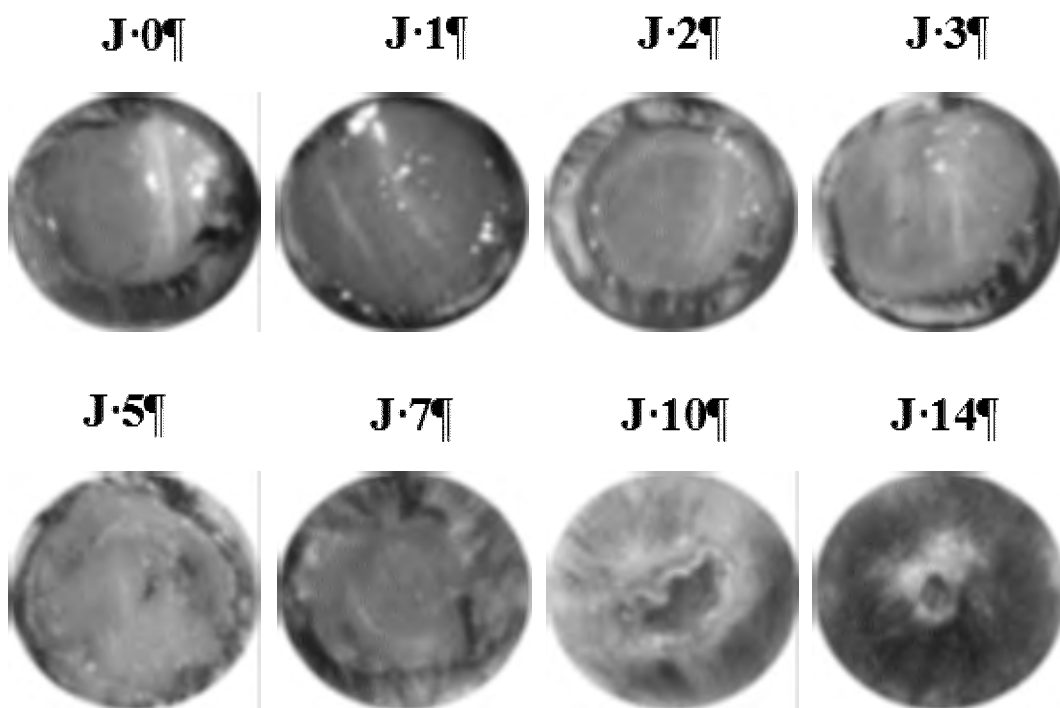
Figure 3



Figure 4



Figure 5



3/3

Figure 6

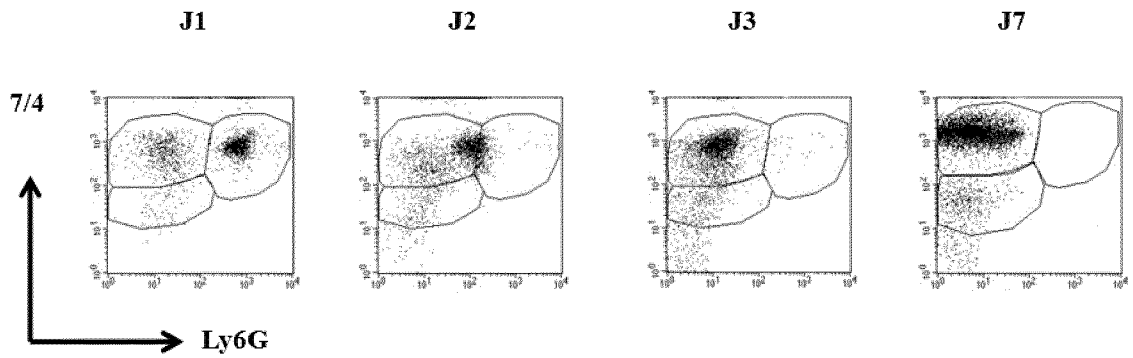
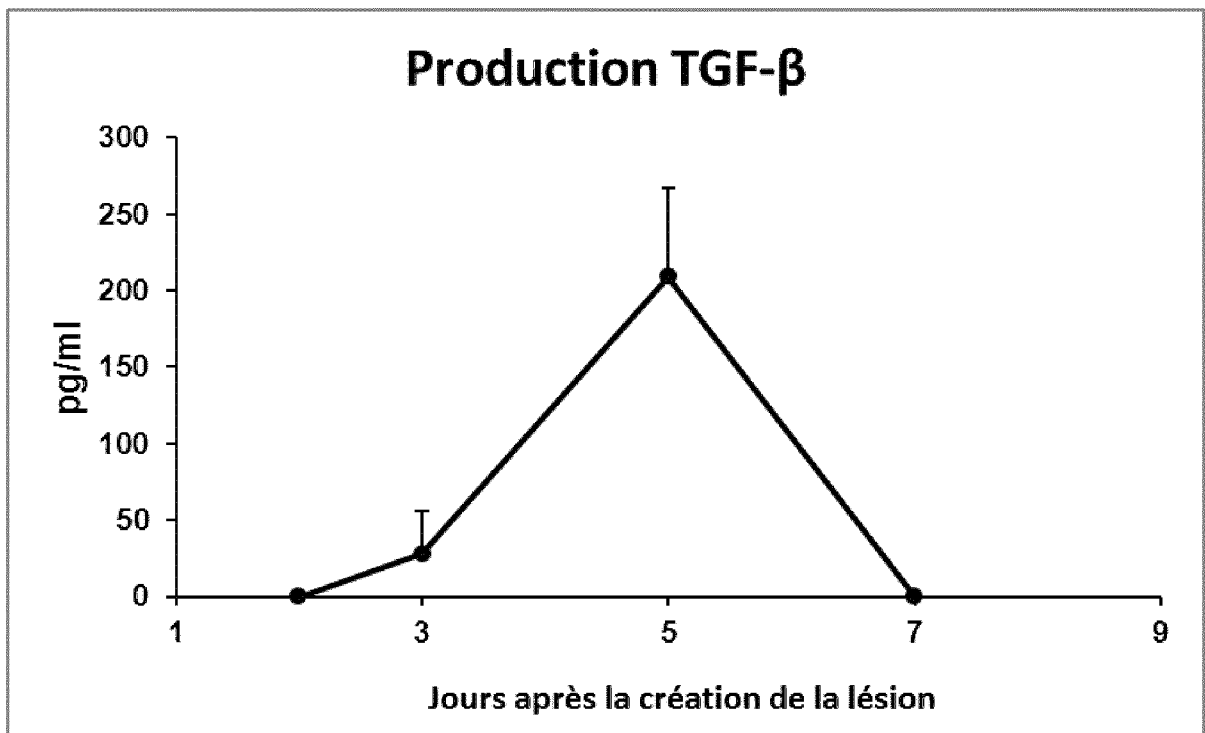


Figure 7





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche
voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 761597
FR 1162344

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2011/015591 A1 (HANSON HEATHER S [US] ET AL) 20 janvier 2011 (2011-01-20) * abrégé * * alinéa [0002] * * alinéa [0014] - alinéa [0032] * * revendications 29-30 * * figure 1 *	1,3,5-8	A61B5/00 A61B10/00 G01N33/48
A	----- US 2010/256545 A1 (AALI ADEL [US] ET AL) 7 octobre 2010 (2010-10-07) * abrégé * * alinéa [0079] - alinéa [0080] * * alinéa [0089] - alinéa [0091] * * alinéa [0104] * * figures 9,10,17,35 * -----	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61B A61F A61M
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 septembre 2012		Marteau, Frédéric	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 761597
FR 1162344

Revendications susceptibles de faire l'objet de recherches complètes:
1

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:
3, 5-8

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:
2, 4

Raison pour la limitation de la recherche (invention(s) non brevetable(s)):

L'objet des revendications 2 à 8 - les revendications 3 à 8 étant considérées en combinaison avec la revendication 2 -, ainsi que l'objet de la revendication 1 en combinaison avec les revendications 3 et 4 constitue une méthode chirurgicale appliquée au corps humain et/ou animal vivant et par conséquent constitue une exception à la brevetabilité. En effet, la revendication indépendante 2, ainsi que la revendication résultant de la combinaison des revendications 1, 3 et 4 a pour objet une méthode comprenant une étape de création d'une plaie et constitue par conséquent une méthode chirurgicale.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1162344 FA 761597**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **21-09-2012**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2011015591 A1	20-01-2011	AUCUN	

US 2010256545 A1	07-10-2010	AU 2010236874 A1	27-10-2011
		CA 2757272 A1	21-10-2010
		CN 102448415 A	09-05-2012
		EP 2413858 A1	08-02-2012
		KR 20120025456 A	15-03-2012
		US 2010256545 A1	07-10-2010
		US 2012191026 A1	26-07-2012
		WO 2010120470 A1	21-10-2010



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche
voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 761597
FR 1162344

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2011/015591 A1 (HANSON HEATHER S [US] ET AL) 20 janvier 2011 (2011-01-20) * abrégé * * alinéa [0002] * * alinéa [0014] - alinéa [0032] * * revendications 29-30 * * figure 1 *	1,3,5-8	A61B5/00 A61B10/00 G01N33/48
A	----- US 2010/256545 A1 (AALI ADEL [US] ET AL) 7 octobre 2010 (2010-10-07) * abrégé * * alinéa [0079] - alinéa [0080] * * alinéa [0089] - alinéa [0091] * * alinéa [0104] * * figures 9,10,17,35 * -----	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61B A61F A61M
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 septembre 2012		Marteau, Frédéric	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 761597
FR 1162344

Revendications susceptibles de faire l'objet de recherches complètes:
1

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:
3, 5-8

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:
2, 4

Raison pour la limitation de la recherche (invention(s) non brevetable(s)):

L'objet des revendications 2 à 8 - les revendications 3 à 8 étant considérées en combinaison avec la revendication 2 -, ainsi que l'objet de la revendication 1 en combinaison avec les revendications 3 et 4 constitue une méthode chirurgicale appliquée au corps humain et/ou animal vivant et par conséquent constitue une exception à la brevetabilité. En effet, la revendication indépendante 2, ainsi que la revendication résultant de la combinaison des revendications 1, 3 et 4 a pour objet une méthode comprenant une étape de création d'une plaie et constitue par conséquent une méthode chirurgicale.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1162344 FA 761597**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **21-09-2012**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2011015591 A1	20-01-2011	AUCUN	

US 2010256545 A1	07-10-2010	AU 2010236874 A1	27-10-2011
		CA 2757272 A1	21-10-2010
		CN 102448415 A	09-05-2012
		EP 2413858 A1	08-02-2012
		KR 20120025456 A	15-03-2012
		US 2010256545 A1	07-10-2010
		US 2012191026 A1	26-07-2012
		WO 2010120470 A1	21-10-2010

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 999 936

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 12 62644

⑤1 Int Cl⁸ : A 61 K 31/60 (2013.01), A 61 P 17/02

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.12.12.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 27.06.14 Bulletin 14/26.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES URGO Société ano-
nyme — FR, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) — FR,
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPE-
MENT (IRD) Etablissement public — FR et UNIVER-
SITE PAUL SABATIER TOULOUSE III Etablissement
public à caractère scientifique et culturel — FR.

⑦2 Inventeur(s) : COSTE AGNES, DARDENNE CHRIS-
TOPHE et PIPY BERNARD.

⑦3 Titulaire(s) : LABORATOIRES URGO ,INSERM (INS-
TITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE),INSTITUT DE
RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT (IRD),
UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤4 UTILISATION D'ACIDE ACETYLSALICYLIQUE POUR LA PREVENTION ET/OU LE TRAITEMENT DES PLAIES
DU DIABÉTIQUE.

⑤7 La présente invention concerne l'acide acétylsalicy-
lique ou l'un de ses sels, à une concentration comprise entre
200 et 4800 μ M, pour son utilisation pour la prévention et/ou
le traitement des plaies du diabétique.

FR 2 999 936 - A1



Utilisation d'acide acétylsalicylique pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique

L'objet de la présente invention consiste en une nouvelle utilisation topique d'acide acétylsalicylique, à une concentration comprise entre 200 et 4800 μM , dans la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique.

La cicatrisation d'une plaie est un processus physiopathologique naturel, les tissus humains et animaux étant capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leur sont propres.

La cicatrisation naturelle d'une plaie se déroule principalement selon trois séquences chronologiques majeures. Chacune de ces séquences est caractérisée par des activités cellulaires spécifiques et est contrôlée par une multitude de signaux de régulation (aussi bien positifs que négatifs) qui, collectivement, orchestrent et encadrent la progression du processus de réparation. On distingue ainsi:

- la phase inflammatoire ;
- la phase de prolifération (qui comprend la phase de granulation et d'épithélialisation); et
- la phase de remodelage.

La première phase, la phase inflammatoire, débute dès la rupture des vaisseaux sanguins, évènement qui déclenche la formation d'un caillot (coagulation du sang) principalement composé de fibrine et de fibronectine, et qui va constituer une matrice provisoire. Cette matrice comble en partie la lésion et va permettre la migration au sein de la zone lésée des cellules inflammatoires recrutées pour assurer la détersion de la plaie. Les plaquettes présentes vont également libérer des facteurs (par exemple des cytokines et/ou des facteurs de croissance) permettant le recrutement de cellules

impliquées dans le processus cicatriciel. Cette phase se caractérise par l'infiltration et l'activation, sur le site de la lésion, de nombreuses cellules inflammatoires (polynucléaires, macrophages) assurant la défense de l'organisme contre d'éventuels micro-organismes étrangers ainsi que le nettoyage de la plaie ou détersion.

La seconde phase correspond au développement du tissu de granulation. On observe d'abord une colonisation de la blessure par migration et prolifération des fibroblastes. Puis, la migration des cellules endothéliales à partir des vaisseaux sains va permettre la néovascularisation, ou angiogenèse, du tissu lésé. Dans le tissu de granulation, les fibroblastes sont activés et vont se différencier en myofibroblastes présentant des propriétés contractiles importantes, propriétés générées par les microfilaments d'actine, permettant ainsi une contraction de la plaie. Ces microfilaments sont exprimés par une protéine : l' α -actine du muscle lisse. Ces myofibroblastes jouent un rôle majeur dans la formation et la contraction du tissu de granulation qui va conduire à la cicatrisation de la lésion. Il y a ensuite migration des kératinocytes à partir des berges de la plaie puis différenciation de ces derniers, aboutissant à la reconstruction de l'épiderme.

Cette phase de développement du tissu de granulation est initiée suite à une diminution préalable de l'état inflammatoire général de la lésion, à la disparition progressive des polynucléaires neutrophiles et à l'apparition de macrophages dont des macrophages dits réparateurs. Cette transition entre la phase inflammatoire et la phase de prolifération/réparation est appelée phase de résolution de l'inflammation.

La troisième phase du processus est une étape principalement de remodelage visant à reconstruire un tissu fonctionnel, afin que le tissu néoformé retrouve les

caractéristiques et les propriétés initiales du tissu d'origine. Une partie de la matrice extracellulaire est digérée par des protéases (essentiellement des métalloprotéases matricielles et des élastases), et on observe une réorganisation de la matrice extracellulaire. Progressivement, le collagène de type III, majoritaire dans le tissu de granulation, est remplacé par le collagène de type I, principal composant matriciel du derme. A la fin de la phase de maturation, les fibroblastes, myofibroblastes et cellules vasculaires voient leur prolifération et/ou leur activité réduites. Puis, les cellules excédentaires meurent par apoptose parallèlement au remodelage de la matrice extracellulaire.

Néanmoins, certains types de plaies ne cicatrisent pas correctement, les 3 étapes clés du processus se déroulant de manière anormale et ce, malgré la mise en place des meilleures conditions physico-chimiques et biologiques possibles. En effet la rapidité et la qualité de la cicatrisation d'une plaie dépendent de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Ce processus de réparation peut donc être anormalement prolongé selon :

- l'étiologie de la plaie ;
- son état et sa localisation ;
- la survenue d'une infection causée par la présence de certains agent infectieux comme *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* ;
- l'existence d'une pathologie préexistante (comme le diabète, une déficience immunitaire, une insuffisance veineuse, etc...) ;
- l'environnement extérieur ; ou
- des facteurs génétiques prédisposant ou non à des troubles de la cicatrisation.

Parmi ces plaies, on retrouve les plaies chroniques telles que les ulcères veineux, les escarres ou les plaies

caractéristiques des sujets diabétiques, et plus particulièrement les plaies du pied diabétique.

Les plaies chroniques se définissent par une absence de cicatrisation après un délai de 6 semaines à compter de l'apparition de la plaie et ce quelque soit le traitement appliqué. Les plaies du diabétique sont caractérisées comme étant un type particulier et à part de plaies chroniques.

En effet, la cause première de l'absence de cicatrisation de ces plaies diabétiques est liée à une biodisponibilité du glucose exacerbée. Celle-ci induit de nombreuses modifications physiologiques et métaboliques, telles qu'un épaissement de la peau, un stress oxydatif important conduisant à une neuropathie et à une artériopathie. L'artériopathie et la neuropathie sont deux facteurs de risque majeurs de chronicisation et donc de retard de la cicatrisation des plaies diabétiques, et plus particulièrement des plaies du pied diabétique. Les autres types de plaies chroniques les plus connus, tels que les escarres ou les ulcères veineux, artériels ou mixtes, ne découlent pas de la même pathologie. Par exemple, c'est l'insuffisance veineuse qui est à l'origine de la formation, de la chronicisation et donc du retard de cicatrisation des ulcères veineux. Les escarres, quant à eux, sont des plaies consécutives à des cycles d'ischémie/reperfusion suite à une pression et une friction excessives et prolongées, exercées sur les tissus cutanés.

C'est ainsi que tous les patients diabétiques atteints de plaies sont exposés à des complications qui sont bien souvent responsables de la morbidité et de la mortalité dudit patient. Plusieurs problèmes majeurs viennent perturber le bon déroulement de la cicatrisation chez ce type de sujets. Un premier retard de cicatrisation s'opère dès la phase inflammatoire : le passage de la phase inflammatoire à la phase de prolifération est perturbé. On parle d'un problème au niveau de la résolution de l'inflammation. La phase

inflammatoire est une phase essentielle de la cicatrisation mais doit être transitoire. La résolution de l'inflammation est un point critique qui conditionne l'amorçage des autres phases de la cicatrisation. Ce phénomène dynamique implique la
5 disparition des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles) et l'apparition des macrophages. Il y a alors production de médiateurs anti-inflammatoires chimiotactiques et angiogéniques permettant notamment la migration et la différenciation des fibroblastes, cellules clés de la phase de
10 granulation.

Une perturbation de cette phase inflammatoire, comme cela est le cas chez les sujets précités, va engendrer un prolongement anormal de la phase inflammatoire et aboutir à la chronicité de la lésion en retardant ainsi toutes les étapes
15 ultérieures de la cicatrisation.

A terme, la phase de fermeture de la plaie, notamment lors de l'épithélialisation, s'en trouve retardée, voire, et ce dans la majorité des cas, non aboutie.

L'aspirine ou acide acétylsalicylique est connu depuis
20 longtemps pour être considérée comme un remède efficace à bien des symptômes ou pathologies. Son mode d'action le plus répandu est une action ancestrale visant à soulager la douleur, ou encore à faire baisser la fièvre. Elle est également utilisée à faible dose pour son action préventive
25 contre la survenue de troubles cardio-vasculaires (action anti-thrombotique).

En effet, les propriétés antiagrégants permettent de lutter efficacement contre la formation de caillot de sang dans les vaisseaux sanguins. Cependant, il semblerait que
30 cette action soit davantage bénéfique dans le cadre d'un acte préventif suivant un premier désordre vasculaire, plus qu'en prévention primaire, où la réelle efficacité de cette substance apparaît intangible.

Il s'agit ici dans chacun des cas évoqués *supra*, d'une administration d'aspirine par voie orale. Des applications d'aspirine par voie topique existent également. En effet, l'aspirine est aussi connue par application topique pour avoir une action bénéfique sur les cicatrices hypertrophiques et notamment sur l'amélioration de l'esthétique de ces cicatrices (cf. Wound Repair Regen., 2012 Nov 5., Epub ahead of print, Topical application of a film-forming emulgel dressing that controls the release of stratifin and acetylsalicylic acid and improves/prevents hypertrophic scarring par Rahmani-Neishaboor E, Jallili R, Hartwell R, Leung V, Carr N, Ghahary A., Department of Surgery, Division of Plastic Surgery, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada).

De plus, l'action positive de l'acide acétylsalicylique ou aspirine, ou d'un de ses dérivés, sur la cicatrisation d'une plaie normale, ainsi que sur la douleur de la plaie, est également connue, nonobstant l'activité antiagrégant de cette dernière, qui pourrait paraître antinomique à la destinée d'une action pro-cicatrisante.

En effet, la demande de brevet EP 1 581 252 de la société Kimberly Clark décrit une composition comprenant de l'aspirine pour stimuler la prolifération cellulaire, et plus particulièrement celle des fibroblastes et des kératinocytes. Cette composition améliore la cicatrisation d'une plaie grâce à la stimulation de la prolifération cellulaire. Ce document révèle que l'effet de l'aspirine est dose-dépendant pour des concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-6} M, les doses les plus efficaces se trouvant dans les concentrations les plus faibles. La composition finale décrite comprend une concentration d'aspirine entre 1 μ M et 5 mM. La stimulation de la prolifération cellulaire, à savoir celle des fibroblastes et celle des kératinocytes, ainsi que la stimulation de la production de collagène, sont des processus importants de la cicatrisation, intervenant dans les étapes de

prolifération ainsi que dans la phase très tardive de remodelage.

Le demande de brevet EP 0 784 975 de la société Japonaise Teikoku décrit quant à elle une préparation pharmaceutique à base d'aspirine pour une application topique destinée à 5 traiter des blessures de peau, mimées notamment par des modèles de rats présentant des escarres. Il est à noter que ces modèles sont des modèles d'animaux sains. En effet, aucun des rats de l'étude ne présente de troubles métaboliques de 10 type diabète. Dans cette demande, la préparation a pour but d'augmenter la vitesse de formation du tissu de granulation mais aussi celle de la restauration de l'épiderme chez des animaux sains et présentant une ou plusieurs plaies. Ainsi cette demande s'attache à relancer le processus cellulaire de 15 la cicatrisation dans ses phases les plus tardives.

Aucun de ces documents ne s'intéresse à la première étape de la cicatrisation, à savoir la phase inflammatoire et sa résolution, la phase inflammatoire étant pourtant une étape primordiale et indispensable puisque qu'elle initie le 20 processus global de cicatrisation. En effet, les plaies du diabétique nécessitent une prise en charge ou une intervention plus précoce dans la cinétique du processus cicatriciel.

C'est pourquoi la Demanderesse a constaté qu'il existait un réel besoin dans la réalisation d'un traitement précoce, 25 efficace, et ciblé des plaies du diabétique.

De façon tout à fait surprenante, la Demanderesse a pu constater que l'utilisation de l'aspirine permettait de rétablir une phase inflammatoire contrôlée, que l'on pourrait également qualifier de normale (non prolongée et non 30 exacerbée) mais aussi d'accélérer la résolution de l'inflammation, permettant par conséquent d'aboutir à une fermeture de la plaie plus précoce et plus rapide, chez les sujets diabétiques.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation, topique, d'acide acétylsalicylique ou d'un de ses sels, à une concentration comprise entre 200 et 4800 μM , pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique.

Ainsi la présente invention a pour objet l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels, à une concentration comprise entre 200 et 4800 μM , pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant de l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels, dont la concentration est comprise entre 200 et 4800 μM , pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique.

Par « plaie du diabétique », on entend une plaie survenant chez un sujet diabétique de type I ou diabétique de type II, notamment choisie parmi les plaies des membres inférieurs, et de préférence les plaies du pied diabétique.

Par « sel d'acide acétylsalicylique », on entend un sel d'acide acétylsalicylique avec un cation pharmaceutiquement acceptable, de préférence l'acétylsalicylate de lysine ou l'acétylsalicylate de sodium.

Par « dose efficace », on entend, au sens de la présente invention, une quantité d'acide acétylsalicylique ou d'un de ses sels comprise entre $7,2 \cdot 10^{-3}$ et 0.173 mg par plaie. Cette quantité d'acide acétylsalicylique ou d'un de ses sels est celle mise au contact direct de la plaie. Il s'agit d'une plaie que l'on pourrait définir comme avoisinant 1 cm^2 de surface. Néanmoins, la dose efficace d'acide acétylsalicylique ou d'un de ses sels varie en fonction de nombreux paramètres tels que, par exemple, la taille de la plaie, le poids, l'âge, le sexe, la sensibilité et le type d'individu (Humain ou animal) à traiter. En conséquence, la dose efficace optimale

devra être déterminée en fonction des paramètres jugés pertinents, par le spécialiste en la matière.

Par « chronicisation », on entend tout retard dans la cicatrisation desdites plaies.

5 Par « traiter » les plaies du diabétique, on entend une cicatrisation et une fermeture desdites plaies.

Par « prévenir » les plaies du diabétique, on entend empêcher le retard de cicatrisation ou chronicisation desdites plaies.

10

L'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est utilisé dans l'invention à une concentration efficace. En effet, utilisé à une concentration inférieure à 200 μM , par exemple à 100 μM , l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels n'a pas
15 d'effet sur l'accélération de la vitesse de cicatrisation des plaies du diabétique.

De même, à une concentration supérieure ou égale à 5000 μM l'acide acétylsalicylique n'a plus d'action bénéfique sur l'accélération de la cicatrisation des plaies diabétiques,
20 voire même une action néfaste sur la viabilité de certaines cellules présentes au niveau de la plaie, comme par exemple les macrophages.

Selon un mode de mise en œuvre préféré, l'acide
25 acétylsalicylique ou l'un de ses sels est utilisé à une concentration comprise entre 300 et 1000 μM .

De préférence, la concentration définie d'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est la concentration dispensée au contact de la plaie.

30 De préférence, l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est utilisé pour le traitement de la chronicisation des plaies du diabétique. En particulier, l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels permet de rétablir une phase inflammatoire dite contrôlée (non prolongée et non

exacerbée), d'accélérer la résolution de l'inflammation, et par voie de conséquence d'accélérer la cinétique de fermeture de la plaie.

De préférence, l'acide acétylsalicylique ou un de ses sels selon l'invention est formulé dans un milieu physiologiquement acceptable, afin d'obtenir une composition pharmaceutique. Par « milieu physiologiquement acceptable », on entend un milieu compatible avec la peau, les plaies, les muqueuses et les phanères.

De préférence, l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est associé à un lipide, ou à un de ses dérivés. Ledit lipide peut être formulé dans la composition pharmaceutique comprenant déjà l'acide acétylsalicylique ou un de ses sels, ou bien peut être administré indépendamment de l'acide acétylsalicylique ou un de ses sels. De préférence, le lipide est un acide gras de type Omega-3 ou Omega-6 ou une association des deux.

Par « Omega-3 » on entend tout composé choisi parmi la liste non limitative constituée de l'acide α -linoléique, l'acide eicosapentaénoïque ou encore de l'acide docosahexaénoïque.

Par « Omega-6 » on entend tout composé choisi parmi la liste non limitative constituée de l'acide linoléique, l'acide γ -linoléique, l'acide eicosadiénoïque, l'acide dihomo- γ -linoléique, l'acide arachidonique, l'acide docosadiénoïque, l'acide docosatétraénoïque ou encore de l'acide docosapentaénoïque.

L'acide acétylsalicylique ou un de ses sels, et la composition pharmaceutique les comprenant, sont de préférence administrés par voie locale, appelée également voie topique. L'administration par voie locale ou topique implique que le principe actif, en l'occurrence l'acide acétylsalicylique ou un de ses sels, agisse de manière locale après absorption par la peau, la plaie ou les muqueuses. Diverses formes galéniques

existent, telles que des solutions, des émulsions, des crèmes, des pommades, des lotions, des patchs, des gels, des pansements, des microcapsules, des microfibres, des sprays, des poudres ou des nanofibres.

5 De préférence, l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est compris dans une composition (pharmaceutique) choisie parmi les pansements, les microcapsules, les microfibres, les nanofibres, les solutions, les lotions, les gels, les patchs, les émulsions, les crèmes, les pommades, les poudres et les
10 sprays.

Lorsque la composition pharmaceutique selon l'invention est sous forme d'une émulsion, elle comprend au moins une phase aqueuse et/ou une phase huileuse, et un agent tensio-actif. En
15 effet, les émulsions classiques sont des systèmes instables quasi-homogènes de deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre sous forme de fines gouttelettes (micelles). Cette dispersion est stabilisée grâce à l'action d'agents tensio-actifs qui modifient la structure et le
20 rapport des forces au niveau de l'interface, et donc augmentent la stabilité de la dispersion en diminuant l'énergie de tension interfaciale.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut également se présenter sous forme de gel ; elle comprend alors
25 un ou plusieurs composés gélifiants.

Lorsque la composition pharmaceutique se présente sous forme de solution, elle comprend, outre l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels, une solution aqueuse ou huileuse, et
30 éventuellement un ou plusieurs solvants et/ou propénétrants de l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels.

La composition pharmaceutique selon l'invention pourra en outre comprendre des additifs inertes ou des combinaisons de ces additifs, tels que :

- des agents épaississants ou émulsifiants ;
- 5 - des agents régulateurs de pH;
- des filtres UV-A et UV-B;
- et des antioxydants.

Les agents épaississants ou émulsifiants peuvent être
10 choisis parmi la liste non limitative de composés comprenant notamment la gomme de xanthane ou encore la famille des tensioactifs.

Les agents régulateurs de pH peuvent être choisis parmi la liste non limitative de composés comprenant notamment les
15 carbonates.

Les filtres UV-A et UV-B peuvent être choisis parmi la liste non limitative de composés comprenant les filtres chimiques et minéraux. Parmi les filtres chimiques, on trouve l'octocrylène, les benzophénones, le drométrizole trisiloxane
20 ou encore l'avobenzone. Parmi les filtres minéraux, on trouve l'oxyde de zinc ou le dioxyde de titane.

Les antioxydants peuvent être choisis parmi la liste non limitative de composés comprenant notamment l'acétate de tocophérol ou l'acide ascorbique.
25

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir le ou les éventuels composés à ajouter à ces compositions pharmaceutiques de telle manière que les propriétés avantageuses attachées intrinsèquement à la présente invention
30 ne soient pas ou substantiellement pas altérées par l'addition envisagée.

Ces additifs peuvent être présents dans la composition de 0,001 à 20% en poids par rapport au poids total de la composition.

Il va être maintenant donné, à titre d'illustration et sans aucun caractère limitatif, les exemples suivants.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront plus clairement à la lecture de la description qui suit d'un mode de réalisation préféré de l'invention, donnée à titre d'exemple, dont voici les légendes des figures :

10

Figure 1 : Cinétique de fermeture de la plaie des souris « contrôle » et diabétiques (HFD, figure 1A, et db/db, figure 1B).

15 Figure 2 : Evaluation de l'exsudat et quantification du nombre de cellules dans l'exsudat des souris « contrôle » et diabétiques (HFD et db/db). Les légendes du tableau sont les suivantes :

Absence d'exsudat :-

Suintement : +/-

20 Exsudation faible : +

Exsudation modérée : ++

Exsudation forte : +++

Figure 3 : Quantification du nombre total de polynucléaires neutrophiles (figure 3A) et de macrophages (figure 3B) dans l'exsudat des souris « contrôle » et diabétiques (HFD).

Figure 4 : Cinétique de fermeture de la plaie des souris « témoin » et diabétiques (db/db) traitées par l'acide acétylsalicylique.

30 Figure 5 : Cinétique de fermeture de la plaie des souris « témoin » et diabétiques (db/db) traitées par l'acide acétylsalicylique.

Figure 6 : Viabilité des macrophages *in vitro* en présence d'acide acétylsalicylique.

Figure 7 : Cinétique d'infiltration cellulaire dans la plaie des souris « témoin » et diabétiques (HFD) traitées par l'acide acétylsalicylique.

5 EXEMPLES

MATERIEL & METHODES

Souris db/db :

10 Les souris homozygotes db/db présentent une mutation ponctuelle dans le gène du récepteur à la leptine, hormone qui contrôle notamment le phénomène de satiété. Les souris db/db, deviennent hyperphagiques et spontanément obèses à partir de leurs 3^{ème}/4^{ème} semaines de vie. Ces animaux sont caractérisés
15 par une hyperglycémie, une résistance à l'insuline et une hypertriglycéridémie, faisant alors de ces souris des modèles diabétiques d'origine génétique de premier choix. Les souris du groupe « contrôle » des souris db/db sont les souris hétérozygotes db/+.

20

Souris HFD :

Les souris HFD sont des modèles murins de diabète induit réalisés avec des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines. Ces souris suivent un régime alimentaire hypercalorique
25 (hyperlipidique) durant 16 semaines. Elles présentent une forte prise de poids due à l'augmentation de leur tissu adipeux et développent également une intolérance au glucose ainsi qu'une résistance à l'insuline. Contrairement aux souris db/db, l'état diabétique de ces animaux n'est pas d'origine
30 génétique. Les souris du groupe « contrôle » des souris HFD sont des souris sous régime standard, également connues sous l'abréviation « NC ».

Tous les animaux sont maintenus selon un cycle journalier divisé en 12 heures d'obscurité suivi de 12h de luminosité à

22°C avec un accès perpétuel à l'eau et à la nourriture. La mise en place du diabète chez les souris est validée selon deux tests permettant d'évaluer le métabolisme du glucose : le test de tolérance au glucose (IPGTT) et le test de sensibilité à l'insuline (IPIST).

Suivi de la cinétique de cicatrisation :

La souris est anesthésiée à l'aide d'isofluorane (gaz anesthésique halogéné). La partie dorsale et les flancs de la souris sont tondus, désinfectés et une excision circulaire proche de 1 cm² est effectuée. Le tissu connectif situé à l'interface du tissu musculaire est supprimé sans endommager le fascia musculaire. Cette excision totale de la peau ainsi réalisée va jusqu'au panniculus carnosus.

La plaie ainsi réalisée est protégée par un dispositif tel que décrit dans les demandes de brevets déposées par les Laboratoires Urgo FR 11 62295 et FR 11 62344, permettant à la fois de protéger la plaie, ainsi que d'observer et d'évaluer la cinétique de la cicatrisation et la récolte des exsudats.

Le processus de cicatrisation des plaies est observé de 0 à 30 jours post lésion. Pour chaque animal, entre 3-5 photographies numériques standardisées à très grande résolution sont prises. Le pourcentage de fermeture des plaies est basé sur les changements d'aires calculés pour la même blessure, sur la même souris, et pour les points de temps indiqués. Ainsi, la moyenne calculée pour la cicatrisation des plaies (en pourcentage) parmi les 3 souris dans un groupe est obtenue indépendamment, et les statistiques sont calculées à partir de 3 groupes de 3 expériences indépendantes.

Les cellules de l'exsudat sont récupérées de J1 post lésion jusqu'à ce que plus d'exsudats ne soient sécrétés par la plaie. Afin de déterminer la cinétique d'infiltration des

polynucléaires neutrophiles, les cellules de l'exsudat de la lésion sont caractérisées par un immuno-marquage portant sur les récepteurs membranaires Ly6G, 7/4 (pour les polynucléaires) et F4/80 (pour les macrophages) en cytométrie en flux. Un total de 10 000 événements est analysé pour chaque échantillon. Tous les résultats sont rapportés sous forme de pourcentage d'expression.

RESULTATS OBTENUS

10

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm la SEM. La SEM désigne l'écart standard de la moyenne. Elle représente l'écart de la moyenne de l'échantillon par rapport à la moyenne de la vraie population. Elle est calculée en divisant l'écart type par la racine carrée de la taille de l'échantillon. Les analyses statistiques sont réalisées selon la méthode de comparaison multiple, test de Bonferroni-Dunnet portant au minimum sur 3 sujets pour chaque groupe (n=3). $P < 0,05$ (*) est considéré comme statistiquement significatif.

20

A. *Suivi de la cicatrisation*

Cinétique de fermeture de la plaie (figures 1A et 1B) :

Chez les souris « contrôle », on observe la fermeture totale de la lésion en 14 jours. En revanche chez les souris HFD, cette fermeture n'est totale qu'après une durée de 18 jours, soit 4 jours de retard effectif (figure 1A).

Chez les souris db/db, la fermeture totale de la plaie n'est effective qu'entre J26 à J28, soit 10 à 12 jours de retard de cicatrisation par rapport à leur contrôle respectif (figure 1B).

Il y a donc un retard significatif de la fermeture de la plaie chez les souris diabétiques (HFD et db/db).

Observation macroscopique de la cicatrisation (exsudats + tissu de granulation) (figure 2):

5 Chez les souris « contrôle », suite à la création de la lésion cutanée, on observe la mise en place d'un tissu de granulation qui apparaît progressivement au niveau de la plaie. Son expansion n'est pas homogène mais prend son origine en différents points des berges de la plaie pour la combler
10 entièrement en 5 jours. Ce tissu s'épaissit au fur et à mesure de la progression de la cicatrisation.

Les souris diabétiques présentent un net retard dès le deuxième jour post-lésion dans la mise en place de ce tissu de granulation. Le comblement total de la lésion n'intervient
15 seulement qu'après 7 jours post-lésion chez les souris diabétiques, soit deux jours supplémentaires en comparaison aux souris « contrôle ».

Chez les souris diabétiques, la mise en place du tissu de granulation s'accompagne d'un phénomène d'exsudation. Ce
20 liquide, riche en cellules et médiateurs, est produit dès la création de la lésion. Chez les souris « contrôle », le pic de production est atteint dès J3 post lésion.

En revanche, les souris diabétiques (HFD et db/db) présentent une exsudation beaucoup plus importante en termes
25 de volumes dès J2 post lésion mais surtout qui perdure dans le temps (figure 2).

Il y a un donc un retard significatif dans la mise en place du tissu de granulation chez les souris diabétiques
30 accompagné d'une exsudation plus importante et persistante.

B. Analyse des populations cellulaires présentes dans l'exsudat (Figures 2, 3A et 3B)

Les souris « contrôle » présentent de manière générale un volume d'exsudat faible et l'infiltration cellulaire dans cet exsudat est limitée. Une infiltration cellulaire dans l'exsudat est constatée le deuxième jour post lésion et ce jusqu'à 5 jours post-lésion. Un pic d'infiltration cellulaire est constaté à J3 post-lésion (figure 2)

La cinétique d'infiltration cellulaire dans l'exsudat des souris diabétiques est différente de celle observée chez les souris « contrôle ». En effet on observe une infiltration cellulaire, plus importante qui persiste dans le temps jusqu'à J7 post-lésion (figure 2).

La différence d'infiltration cellulaire que l'on constate en fonction du temps s'explique par la persistance des polynucléaires neutrophiles sur le site de la lésion des souris diabétiques. En effet, chez les souris « contrôle », les polynucléaires neutrophiles disparaissent au bout de 5 jours post-lésion alors que chez les souris diabétiques, cette population cellulaire persiste dans le temps, jusqu'à J7 post-lésion (figure 3A). Ainsi, il apparaît clairement que le pourcentage de polynucléaires infiltrant la lésion cutanée est beaucoup plus important pour le groupe diabétique que pour le groupe « contrôle ».

Les souris diabétiques présentent une infiltration cellulaire plus importante prenant son origine dans la persistante de polynucléaires neutrophiles sur le site de la lésion.

Les macrophages arrivent sur le site de la lésion dès J3 post-lésion chez les souris « contrôle ». A l'opposé, cette infiltration de cellules n'est que faiblement visible à J3 post-lésion chez les souris diabétiques, sans augmenter durant la poursuite de la mise en place du tissu de granulation (figure 3B).

Les souris diabétiques présentent une infiltration cellulaire plus importante qui s'explique :

- Par la persistante de polynucléaires neutrophiles sur le site de la lésion ;
- Par un retard dans le recrutement des macrophages ; et
- Par un défaut de disparition de ces polynucléaires.

5

RESULTATS OBTENUS CHEZ LES SOURIS TRAITÉES AVEC L'ACIDE ACÉTYLSALICYLIQUE

10 *A.Suivi de la cinétique de cicatrisation de souris diabétiques en présence d'acide acétylsalicylique utilisé à différentes concentrations*

Cinétique de fermeture de la plaie (figures 4, 5 et 6) :

15

Comme déjà décrit précédemment, la souris est anesthésiée à l'aide d'isofluorane. La partie dorsale et les flancs de la souris sont tondus, désinfectés et une excision circulaire proche de 1 cm² est effectuée. Le tissu connectif situé à l'interface du tissu musculaire est supprimé sans endommager le fascia musculaire. Cette excision totale de la peau ainsi réalisée va jusqu'au panniculus carnosus.

Entre temps, la solution de référence d'acide acétylsalicylique est préparée à 5 mM. Cette solution sera utilisée pour préparer les solutions aux concentrations 100 µM, 200µM, 300 µM, 1 mM, 4,8 mM et 5 mM.

Des solutions à des concentrations de 100 µM, 200µM, 300 µM, 1 mM, 4,8 mM, et 5mM d'acide acétylsalicylique sont testées.

30 Par souci de précision, un tableau de correspondance entre les concentrations d'acide acétylsalicylique et les doses administrées au niveau de la plaie est établi, voir *infra*. Ces doses administrées au niveau de la plaie correspondent à un mode de réalisation particulier de l'invention.

Table 1 :

Concentration en acide acétylsalicylique testée sur la plaie (pour une plaie avoisinant 1 cm ²)	Dose d'acide acétylsalicylique administrée sur la plaie (pour une plaie avoisinant 1 cm ²)
100 μ M	0.0036 mg
200 μ M	0.0072 mg
300 μ M	0.0108 mg
1 mM	0.036 mg
4,8 mM	0.173 mg
5 mM	0.2 mg

A partir de chaque solution, un volume compris entre 50 et 500 μ L est prélevé, et mis au contact de la plaie par l'intermédiaire d'un dispositif tel que décrit au travers des demandes de brevets déposées par les Laboratoires Urgo FR 11 62295 et FR 11 62344.

Il est à noter que cette mise en contact d'une concentration prédéfinie d'acide acétylsalicylique sur le site cicatriciel est réalisée à compter du troisième jour post-lésion. En effet, c'est à cette période que le retard de cicatrisation apparaît chez les souris diabétiques, comparativement aux souris « contrôle » (figure 1A et 1B). Par ailleurs, dans le cadre du traitement de patients diabétiques, les plaies traitées seront déjà formées et stagnantes en phase inflammatoire. Aucune plaie chronique, et plus particulièrement les plaies du diabétique, ne sont traitées dès leur apparition. De plus, la phase inflammatoire est une phase indispensable à la cicatrisation, puisqu'elle permet le nettoyage de la zone lésée et sa détersion grâce à l'infiltration de cellules inflammatoires comme les polynucléaires neutrophiles. Il est donc nécessaire de

conserver une inflammation afin d'initier une cicatrisation efficace, et donc de ne pas bloquer complètement cette phase. C'est pourquoi le traitement par l'acide acétylsalicylique n'est proposé qu'à partir de J3 post-lésion.

5 La figure 4 décrit les cinétiques de cicatrisation des plaies de souris diabétiques après application alternativement d'une solution de NaCl (correspondant à notre « témoin »), ou d'une solution à 300 μM ou à 1000 μM d'acide acétylsalicylique.

10 Les souris diabétiques traitées à 300 μM et 1000 μM d'acide acétylsalicylique présentent des cinétiques de cicatrisation totalement différentes de celles des souris « témoin ». Alors que chez les souris diabétiques « témoin » la fermeture de la plaie se conclue en 26 jours, les souris
15 diabétiques traitées avec 300 μM et 1000 μM d'acide acétylsalicylique voient leurs plaies se refermer aux alentours de vingt jours post-lésion.

De plus, nous pouvons observer que l'accroissement de la vitesse de fermeture des plaies traitées par les solutions
20 d'acide acétylsalicylique à 300 μM et 1000 μM se fait par l'intermédiaire d'une accélération dans la phase précoce de la cicatrisation (phase inflammatoire) à savoir entre J3 et J7 post-lésion, visible sur la figure 4. Cette accélération de la cicatrisation entre J3 et J7 post-lésion est à corrélérer avec
25 une vitesse de résolution de l'inflammation accélérée. Ainsi la vitesse de cicatrisation, et donc la vitesse de fermeture de la plaie des souris sur lesquelles sont administrées lesdites solutions d'acide acétylsalicylique sont fortement accélérées par rapport aux souris « témoin ».

30 En résumé l'administration topique de solutions à 300 μM et 1000 μM d'acide acétylsalicylique rétablit une phase inflammatoire contrôlée et induit une très nette accélération de la résolution de l'inflammation permettant ainsi une augmentation de la vitesse de fermeture de la plaie (environ à

J20 post-lésion) comparativement aux souris diabétiques « témoin ».

La figure 5 décrit les cinétiques de cicatrisation des plaies de souris diabétiques après application alternativement d'une solution de NaCl (correspondant à notre « témoin »), ou d'une solution à 100 μM ou à 5000 μM d'acide acétylsalicylique.

Les cinétiques de cicatrisation des souris diabétiques « témoin » et des souris diabétiques traitées à 100 μM et à 5000 μM d'acide acétylsalicylique sont similaires et ne présentent pas de différences significatives. On ne constate pas le moindre effet suite à l'introduction de telles concentrations d'acide acétylsalicylique au contact de la plaie sur la cinétique de cicatrisation par rapport aux souris diabétiques « témoin », et surtout pendant la phase inflammatoire ainsi que pendant la mise en place du tissu de granulation.

En résumé, l'administration topique de solutions d'acide acétylsalicylique à 100 μM et 5000 μM sur les plaies de souris diabétiques ne fait preuve d'aucune efficacité sur le rétablissement d'une phase inflammatoire contrôlée ni sur l'accélération de la résolution de l'inflammation et ne permettant pas ainsi une augmentation de la vitesse de fermeture de la plaie.

De plus des tests de viabilité cellulaire sont réalisés pour différentes concentrations en acide acétylsalicylique sur des macrophages (figure 6).

Cette méthode d'analyse comprend l'utilisation de monocytes dérivés de sang périphérique humain qui sont mis en culture dans du milieu RPMI dans lequel est additionné du M-CSF à 10 ng/ml pendant 24 heures afin de les différencier en macrophages. L'acide acétylsalicylique est ajouté dans le milieu de culture à raison de 1000 μM ou 5000 μM final.

La mortalité cellulaire est analysée après 72 heures d'incubation par cytométrie en flux, par mesure de l'incorporation cytoplasmique d'iodure de propidium.

Le but d'un tel test de viabilité cellulaire réalisé *in vitro* est de vérifier la nocivité de la dose administrée sur les cellules retrouvées au niveau de la plaie, et de façon préférentielle dans le présent cas sur les macrophages, cellules considérées comme un type de cellules effectrices dans la cicatrisation de la lésion étudiée. En effet, une telle étude est impossible sur les polynucléaires neutrophiles du fait de leur mortalité basale trop importante *in vitro*.

La figure 6 révèle une très nette perte de viabilité cellulaire pour une dose de 5000 μM d'acide acétylsalicylique administrée sur les cellules *in vitro* à 72h, avec une valeur de viabilité qui se trouve diminué de 20 %, et donc que l'on peut caractériser comme nocive.

A l'inverse, l'application d'une dose de 1000 μM ne révèle aucune toxicité cellulaire.

Ainsi la solution à une concentration de 5 mM administrée sur la plaie est d'une part non efficace sur la cinétique de cicatrisation (figure 5) et en plus se révèle nocive pour les cellules présentes sur le site cicatriciel (figure 6).

B. Analyse des populations cellulaires présentes dans l'exsudat (figure 7)

La figure 7 décrit la cinétique d'infiltration cellulaire réalisée sur des souris diabétiques « témoin » ou sur lesquelles se trouvent appliquée une solution de 1000 μM d'acide acétylsalicylique.

A J7 post-lésion, on remarque que le traitement à l'acide acétylsalicylique permet de diminuer significativement le nombre de cellules infiltrées sur le site de la lésion chez les souris diabétiques traitées.

On peut donc conclure à la lecture de l'ensemble des résultats précédents que le traitement à base d'aspirine à une concentration comprise entre 100 μM et 4800 μM (administrées 5 dès J3 post-lésion) permet de diminuer l'infiltration cellulaire chez les souris diabétiques, de restaurer une phase inflammatoire contrôlée, et d'accélérer la résolution de l'inflammation pour permettre à terme d'augmenter la vitesse de fermeture de la plaie.

10 L'acide acétylsalicylique a donc un rôle crucial dans le processus de résolution de l'inflammation et par voie de conséquence sur la vitesse de fermeture de la plaie de l'individu diabétique.

Revendications

- 5 1) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels, à une concentration comprise entre 200 et 4800 μM , pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique.
- 10 2) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration d'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est comprise entre 300 et 1000 μM .
- 15 3) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'administration de ladite concentration est réalisée sous forme topique.
- 20 4) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le sel d'acide acétylsalicylique est choisi parmi l'acétylsalicylate de lysine et l'acétylsalicylate de sodium.
- 25 5) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est compris dans une composition choisie parmi les pansements, les microcapsules, les microfibres, les nanofibres, les solutions et les sprays.
- 30 6) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation l'une quelconque des revendications

précédentes, pour le traitement de la chronicisation des plaies du diabétique.

- 5 7) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation l'une quelconque des revendications précédentes, pour accélérer la résolution de l'inflammation.
- 10 8) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels est associé à un lipide ou à un de ses dérivés.
- 15 9) Acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels pour son utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le lipide ou un de ses dérivés est un acide gras de type Omega-3 ou Omega-6, ou une association des deux.
- 20 10) Composition pharmaceutique comprenant de l'acide acétylsalicylique ou l'un de ses sels, dont la concentration est comprise entre 200 et 4800 μM , pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement des plaies du diabétique.

Figure 1A

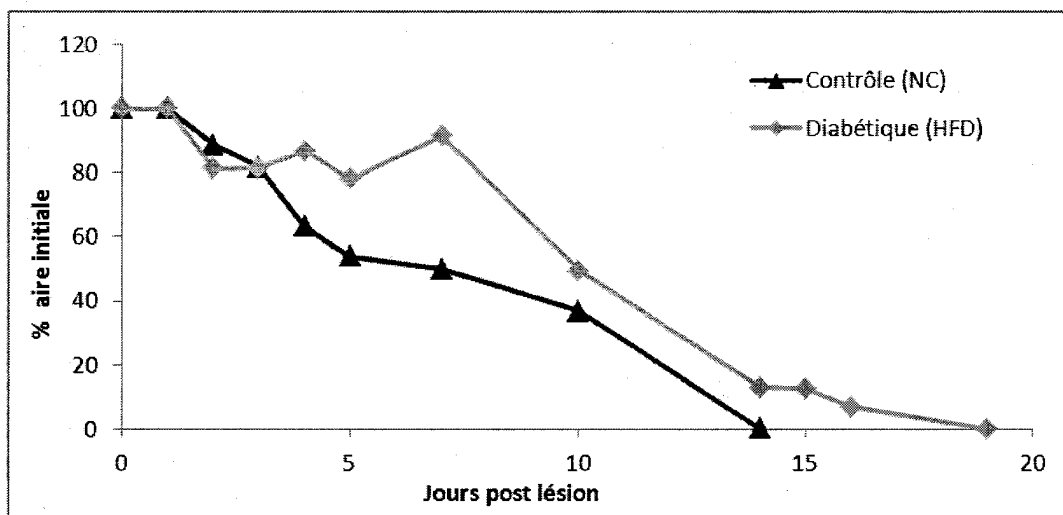


Figure 1B

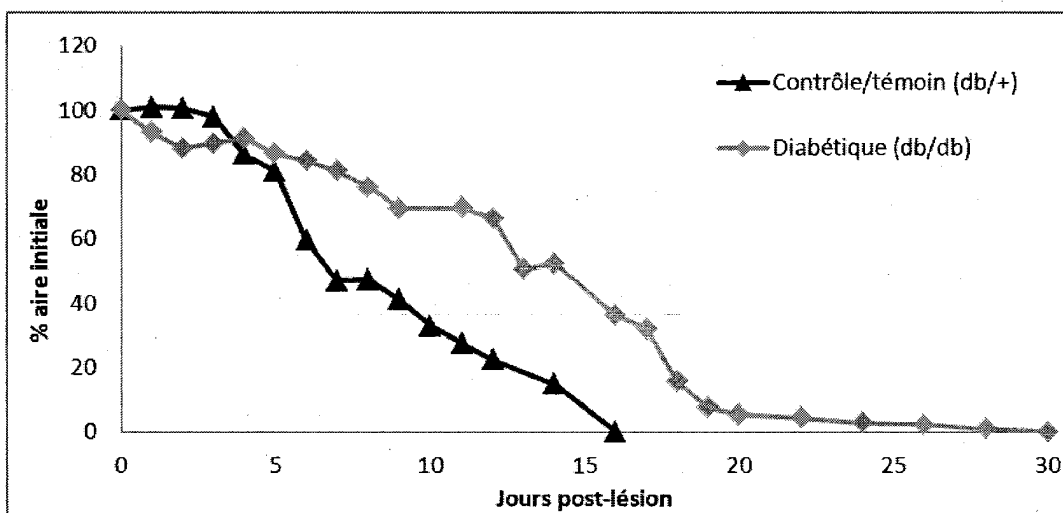


Figure 2

Conditions		J1	J2	J3	J4	J5	J7
Contrôle	Exsudat	+	+	++	+	+	+/-
	Nombre cellules	$0,5 \times 10^6$	$0,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
db/db	Exsudat	+	++	+++	+++	+++	+
	Nombre cellules	$0,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
HFD	Exsudat	+	++	+++	+++	+++	+
	Nombre cellules	$0,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$

Figure 3A

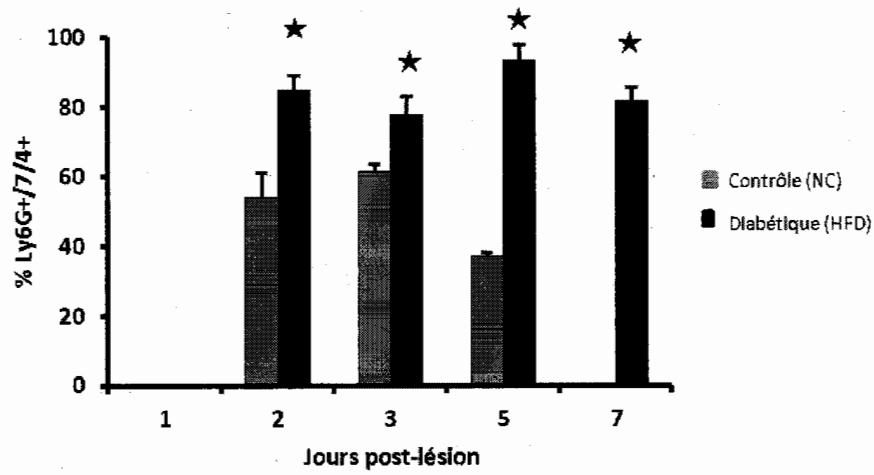
% de polynucléaires neutrophiles présents dans l'exsudat

Figure 3B

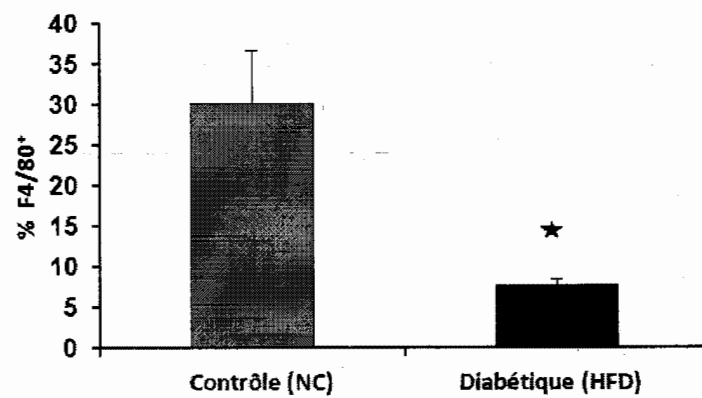
% de macrophages présents dans l'exsudat à J3

Figure 4

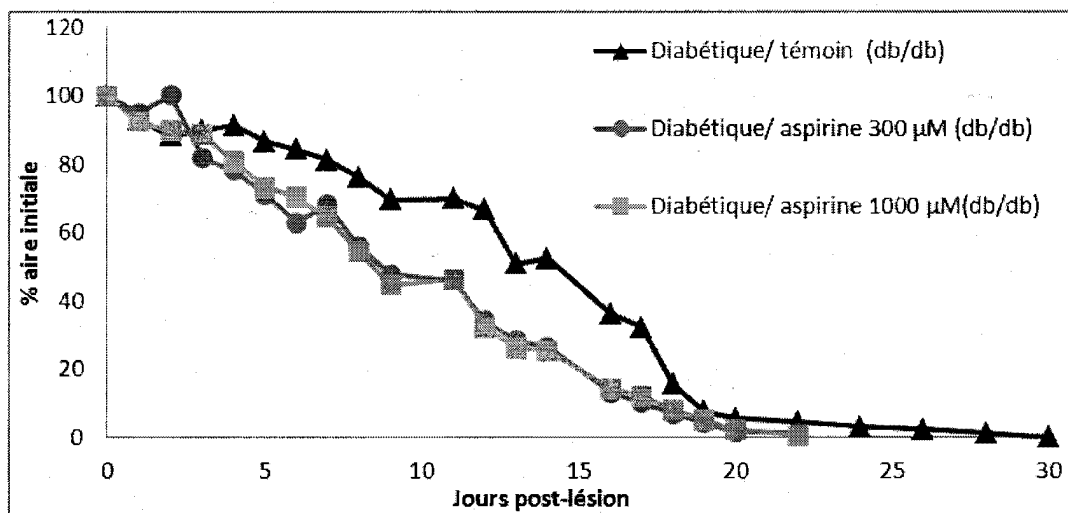


Figure 5

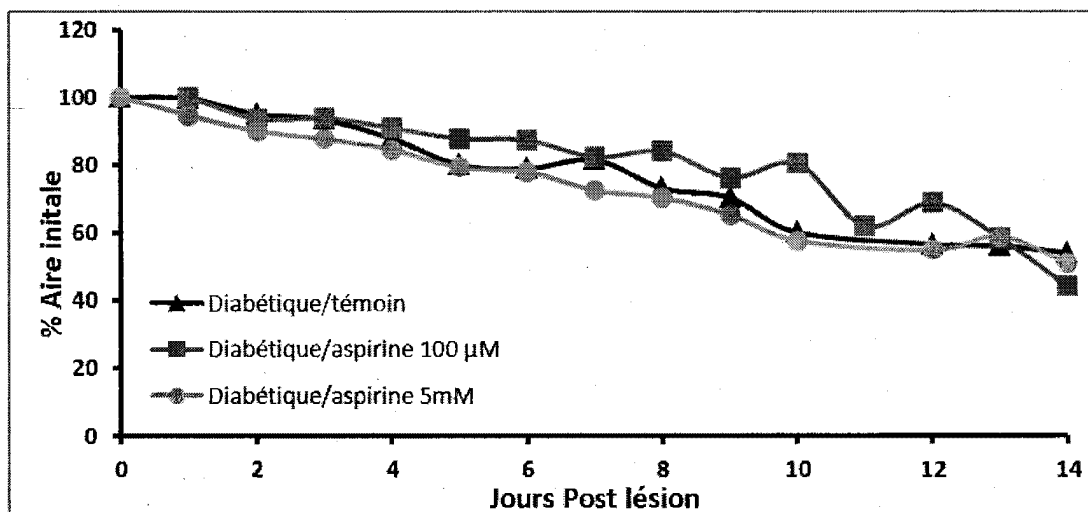


Figure 6

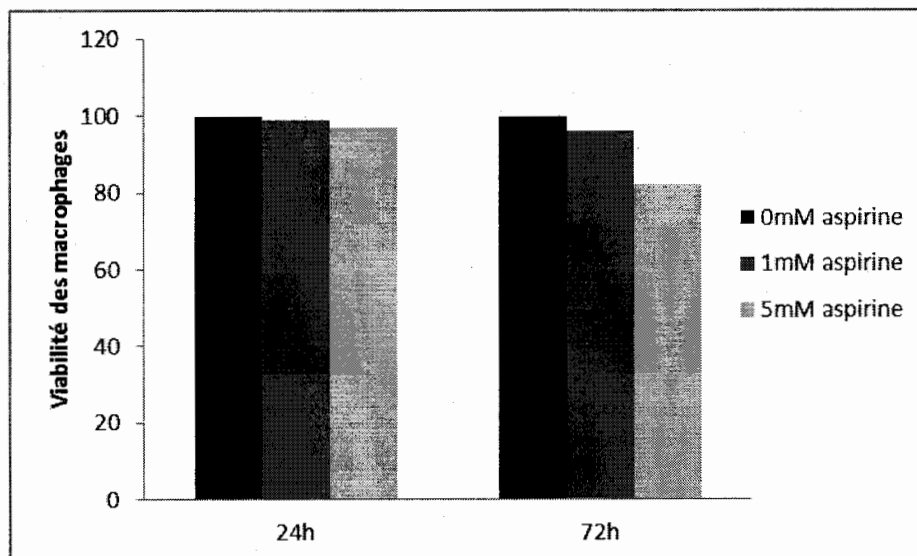
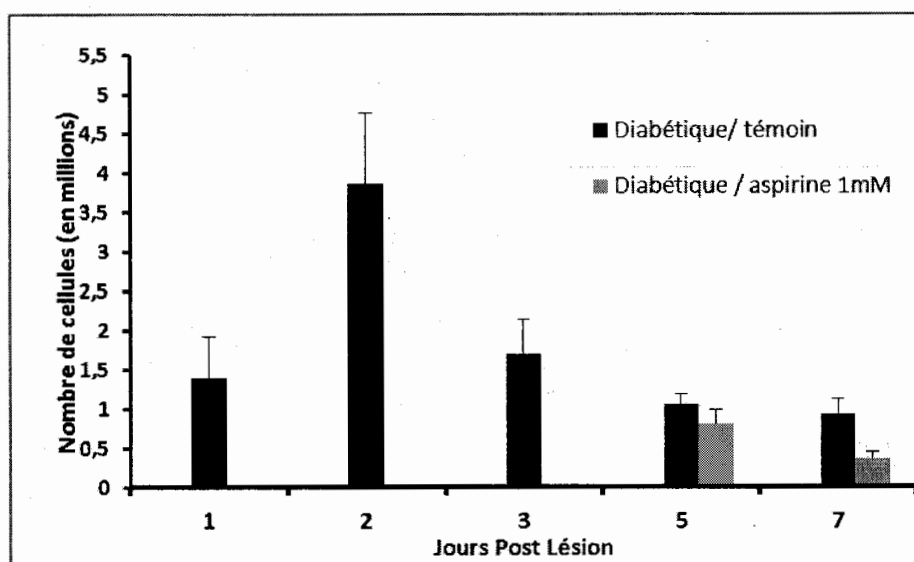


Figure 7





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 775331
FR 1262644

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 2010/141711 A1 (EX TEK LLC [US]; WHITBOURNE RICHARD JAMES [US]) 9 décembre 2010 (2010-12-09) * revendications 1,4,21-24 * * exemples 10,12 *	1-10	A61K31/60 A61P17/02
A	EP 1 547 602 A1 (TEIKOKU SEIYAKU KK [JP]) 29 juin 2005 (2005-06-29) * alinéas [0002], [0010] * * page 7, alinéa 47 - alinéa 49 * * exemple 4 *	1-10	
A	EP 0 784 975 A1 (TEIKOKU SEIYAKU KK [JP]) 23 juillet 1997 (1997-07-23)	1-10	
A	US 2004/116356 A1 (MALIK SOHAIL [US]) 17 juin 2004 (2004-06-17)	1-10	
Y	PIMPLE B P ET AL: "Protective effect of Luffa acutangula extracts on gastric ulceration in NIDDM rats: Role of gastric mucosal glycoproteins and antioxidants", ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE, vol. 5, no. 8, août 2012 (2012-08), pages 610-615, XP8164223, ISSN: 1995-7645 * abrégé *	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K
		----- -/--	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		21 août 2013	Bonzano, Camilla
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 775331
FR 1262644

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	<p>KONTUREK PETER C ET AL: "NO releasing aspirin (ASA) fails to impair ulcer healing in diabetic rats due to the reversal of the fall in ghrelin, leptin and COX-2 expression", GASTROENTEROLOGY, vol. 126, no. 4, Suppl. 2, avril 2004 (2004-04), page A614, XP8164225, & DIGESTIVE DISEASE WEEK/105TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, USA; MAY 16 -20, 2004 ISSN: 0016-5085 * le document en entier * -----</p>	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		21 août 2013	Bonzano, Camilla
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1262644 FA 775331**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **21-08-2013**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2010141711	A1	09-12-2010	CA 2764331	A1 09-12-2010
			CN 102480945	A 30-05-2012
			EP 2437596	A1 11-04-2012
			US 2012077784	A1 29-03-2012
			WO 2010141711	A1 09-12-2010

EP 1547602	A1	29-06-2005	AU 2003257700	A1 23-04-2004
			BR 0314944	A 02-08-2005
			CA 2499620	A1 15-04-2004
			CN 1684692	A 19-10-2005
			EP 1547602	A1 29-06-2005
			JP 4868687	B2 01-02-2012
			JP 2004123551	A 22-04-2004
			KR 20050063771	A 28-06-2005
			NZ 539158	A 26-09-2008
			US 2005239755	A1 27-10-2005
			WO 2004030676	A1 15-04-2004
			ZA 200502356	A 05-10-2005

EP 0784975	A1	23-07-1997	DE 69635298	T2 13-07-2006
			EP 0784975	A1 23-07-1997
			ES 2250983	T3 16-04-2006
			HK 1001375	A1 03-02-2006
			US 5916918	A 29-06-1999

US 2004116356	A1	17-06-2004	AU 2003284112	A1 29-07-2004
			EP 1581252	A1 05-10-2005
			US 2004116356	A1 17-06-2004
			US 2004116511	A1 17-06-2004
			US 2007082852	A1 12-04-2007
			US 2011092522	A1 21-04-2011
			WO 2004060394	A1 22-07-2004

Summary

Non-insulin dependent type 2 diabetes is a major public health problem due to its prevalence and the high rate of its degenerative complications. Among these problems, healing disorders and more particularly "diabetic foot" ulcers are one of the leading cause of morbidity and mortality of diabetic patients.

The understanding of the deregulation of cellular and molecular mechanisms of the wound healing process in diabetic patients is a key issue for the development of new therapeutic strategies. This work was carried out in this context.

Wound healing is a physiological multifactorial and dynamic process aiming to the restoration of the integrity and functionality of injured tissue. This complex biological response requires an orchestration and a precise communication between immuno-inflammatory cells and resident cells in the wound tissue. This process can be divided into four distinct but overlapping phases: an inflammatory phase involving the initial stage of hemostasis arrested by a resolution phase of inflammation; a proliferative/regeneration stage and finally a tissue remodeling phase.

Data from the literature suggest that the delayed healing in diabetic patient is principally due to chronic inflammation. Our hypothesis was to demonstrate that deregulation was the result of a major impairment of the resolution phase of inflammation. Our ultimate aim was to influence this phase to accelerate the healing process in diabetic mice.

The first step of this study was to develop a new cutaneous excisional wound model in type 2 diabetic mice (in High Fat Diet or leptin receptor deficiency mice *db/db*). Associated with the development of an innovative device, this model allowed us (i) to treat the wound and follow the wound healing evolution (ii), to collect in aseptically condition and over time the secreted exudate, (ii) to evaluate the phenotypic and functional characteristics of exudate cells and to measure the amount of pro-and anti-inflammatory mediators. **This first step leads to the publication of two patent applications (filed in December 2011 and published under the references FR 2984719 and FR 2984722).**

Our experimental approach demonstrate that the impaired wound healing process in type 2 diabetic mice was due to a strong neutrophil and inflammatory macrophage M1 infiltration, and a lack of influx of anti-inflammatory macrophages M2. All this is associated with a failure in the inflammatory cells apoptosis and efferocytosis. These dysregulations sign a default of resolution of inflammation that we have quantified by the measure of excessive leukotriene (LT) B₄, (a proinflammatory arachidonic acid (AA) metabolite from the 5-lipoxygenase pathway) in both exudate and scar tissue, at the expense of the lipoxin (LX) A₄ (an anti-inflammatory AA metabolite formed from LTA₄ by 12/15-LOX).

With an original pharmacological approach, we target the resolution of the inflammatory phase to promote wound closure in diabetic mice. For this we have decided to use topical application of acetylsalicylic acid on the wound (AAS-aspirin), 3 days after the establishment of the skin lesion. We demonstrate that aspirin accelerates wound closure in diabetic mice. This pharmacological protocol reduced by more than 25% the time to close the wound in a highly deleterious diabetic healing environment. Interestingly, we have shown that aspirin orients the arachidonic acid metabolism towards the synthesis of LXA₄ at the expense of LTB₄, triggers the recruitment of M2-polarized macrophage and promote apoptosis of neutrophils and their efferocytosis. At same time, we have shown that aspirin mechanism involves both the activity of 5- LOX and 12/15-LOX. Indeed, it loses its activity on wound healing in diabetic mice when genes for 5- LOX or 12/15-LOX were invalidated. Moreover we show that LTA₄ (precursor of LXA₄ or LTB₄) produced by 5-LOX can restore the lack of effect of AAS in mice where 5- LOX is invalidated.

Finally, we have established that the aspirin was able to induce the synthesis of lipoxins regardless of the expression of COX-2. This new mechanism of action which involves the induction of the 12/15-LOX and the inhibition of the expression of the LTA₄ hydrolase will restore a normal wound healing kinetic in diabetic mice models via the synthesis of lipid mediators with dual anti-inflammatory and pro-resolution activities. **A patent on the topically use of acetylsalicylic acid for the treatment of diabetic wounds has been deposited; it was released in June 2014, under the reference FR2999936.** Its European expansion was initiated. Finally, the results obtained in this study will be published and which will be submitted shortly.

Résumé

Le diabète non insulino-dépendant de type 2 demeure un problème majeur de santé publique. Cette pathologie associée au vieillissement, à la sédentarisation et à l'obésité induit un taux élevé de complications. Parmi celles-ci, le défaut de cicatrisation et plus particulièrement le syndrome du « pied diabétique » est une des causes majeures de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques.

La compréhension de la dérégulation des mécanismes cellulaires et moléculaires du processus cicatriciel chez le diabétique représente un enjeu essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé.

La cicatrisation des plaies est un processus physiopathologique complexe, multifactoriel et dynamique visant à rétablir l'intégrité et la fonctionnalité des tissus lésés. Cette réponse biologique nécessite une orchestration et une communication précise entre les cellules inflammatoires infiltrées et les différentes populations cellulaires des tissus. De manière conventionnelle, on distingue 4 principales phases qui peuvent se chevaucher : une première étape d'hémostase généralement couplée à une phase inflammatoire précoce et arrêtée par une phase de résolution de l'inflammation. Une période de prolifération/ régénération permet la génération du nouveau tissu, et enfin, la phase de remodelage tissulaire permet au tissu de retrouver des caractéristiques d'élasticité et de souplesse proche du tissu original.

Les données de la littérature suggèrent que le retard de cicatrisation des personnes diabétiques résulterait de la chronicité de la phase inflammatoire. Notre hypothèse de travail a été de démontrer que cette dérégulation était la conséquence d'un défaut majeur de la phase de résolution de l'inflammation. Notre objectif final a été d'agir sur cette phase pour accélérer le processus cicatriciel.

La première étape de ce travail de thèse a consisté à mettre en place un modèle de lésions cutanées par excision chez des souris diabétiques de type 2 (en régime hyper lipidique ou déficientes pour le récepteur de la leptine, *db/db*). Ce modèle expérimental, combiné à la mise au point d'un dispositif médical innovant nous a permis (i) de recueillir stérilement les cellules et l'exsudat produit au niveau de la lésion cutanée, (ii) d'évaluer les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules de l'exsudat et (iii) d'évaluer le taux des médiateurs pro- et anti-inflammatoires au cours du temps. L'ensemble de ce travail a pu être réalisé en préservant l'environnement du tissu cicatriciel. Cette première étape a débouché sur le dépôt de 2 brevets en décembre 2011 (FR 2984719 – FR 2984722) suivi de leur extension Européenne l'année suivante.

Cette approche expérimentale nous a permis de démontrer que la dérégulation du processus cicatriciel de souris diabétiques de type II était due, à une forte infiltration au niveau de la lésion de polynucléaires neutrophiles, de macrophages inflammatoires M1 et à un défaut d'afflux de macrophages anti-inflammatoires M2. Tout cela était associé à un défaut d'apoptose des cellules inflammatoires et de leur efférocytose. Ces dérégulations signent un défaut de résolution de l'inflammation que nous avons pu valider par la mise en évidence au niveau de l'exsudat inflammatoire et du tissu cicatriciel d'un excès de leucotriène B₄ (LTB₄) (métabolite de l'acide arachidonique pro-inflammatoire provenant de la voie de la 5-lipoxygénase) au dépend de la lipoxine A₄ (LXA₄) (métabolite de l'acide arachidonique anti-inflammatoire produit par les voies des 5-LOX et 12/15-LOX).

Ces résultats acquis, nous nous sommes attachés à cibler, par une approche pharmacologique originale, la phase de résolution de l'inflammation pour favoriser la fermeture des plaies des souris diabétiques. Pour cela nous avons choisi d'utiliser une application topique d'acide acétylsalicylique (AAS - aspirine) 3 jours après l'établissement de la lésion cutanée. Nous avons montré que l'AAS accélère la fermeture de la plaie chez les souris diabétiques. La mise en place de ce protocole pharmacologique a permis de réduire de plus de 25% le temps de fermeture de la plaie dans un environnement diabétique fortement délétère pour la cicatrisation. De manière intéressante, nous avons montré que l'AAS oriente le métabolisme de l'acide arachidonique vers la synthèse de LXA₄ au dépend du LTB₄, favorise le recrutement et la polarisation M2 des macrophages et l'efférocytose des polynucléaires neutrophiles apoptotiques. Parallèlement nous avons montré que le mécanisme d'action de l'AAS implique à la fois l'activité de la 5-LOX et de la 12/15-LOX. En effet, l'AAS perd toute activité sur des souris diabétiques de type 2 en régime hyper-lipidique dont les gènes de la 5-LOX ou de la 12/15-LOX étaient invalidés. De plus nous montrons que le LTA₄ (précurseur de la LXA₄ ou du LTB₄) produit par la 5-LOX permet de restaurer l'absence d'effet de l'AAS chez des souris dont la 5-LOX est invalidée. Finalement, nous avons établi que l'AAS était capable d'induire la synthèse de lipoxines indépendamment de l'expression de COX-2. Ce nouveau mécanisme d'action qui implique l'induction de la 12/15-LOX et l'inhibition de l'expression de la LTA₄ hydrolase permet de rétablir une vitesse de la cicatrisation normale des plaies sur ces modèles de souris diabétiques. Un brevet sur l'utilisation de l'acide acétylsalicylique par voie topique pour le traitement des plaies du diabétique a été déposé ; il a été rendu public le 27 juin 2014 (FR 2999936). Son extension Européenne a été engagée. Enfin les résultats obtenus lors de cette étude feront l'objet d'une publication qui sera soumise prochainement.