



**HAL**  
open science

# L'iontophorèse thérapeutique dans la prise en charge des ulcérations cutanées de la sclérodermie systémique : screening, étude de preuve de concept sur modèles de sclérodermie murins

Sylvain Kotzki

## ► To cite this version:

Sylvain Kotzki. L'iontophorèse thérapeutique dans la prise en charge des ulcérations cutanées de la sclérodermie systémique : screening, étude de preuve de concept sur modèles de sclérodermie murins. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV069 . tel-01685242

**HAL Id: tel-01685242**

**<https://theses.hal.science/tel-01685242>**

Submitted on 16 Jan 2018

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Science du médicament**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**« Sylvain KOTZKI »**

Thèse dirigée par « **Jean-Luc CRACOWSKI** » et  
codirigée par « **Ahcène BOUMENDJEL** »

préparée au sein du **Laboratoire « Hypoxie : physiopathologie  
cardiovasculaire et respiratoire » - INSERM U1042**  
dans l'**École Doctorale Chimie & Science du Vivant**

## **L'iontophorèse thérapeutique dans la prise en charge des ulcérations cutanées de la sclérodermie systémique : screening, étude de preuve de concept sur modèles animaux**

Thèse soutenue publiquement le « **24 Mars 2016** »,  
devant le jury composé de :

**Madame le Docteur Dominique SIGAUDO-ROUSSEL**

DR2, Université de LYON 1, Rapporteur

**Monsieur le Professeur Yogeshvar KALIA**

PU, Université de GENEVE, Rapporteur

**Monsieur le Professeur Jean Luc CRACOWSKI**

PUPH, Université de GRENOBLE-ALPES, Directeur

**Madame le Docteur Sophie BLAISE**

Dr, CHU de Grenoble, Membre

**Monsieur le Docteur Philippe GUILPAIN,**

MCU-PH, Université de MONTPELLIER, Membre

**Monsieur le Docteur Jérôme AVOUAC,**

MCU-PH, Hopitaux Universitaires Paris Centre, Membre

**Madame le Professeur Diane GODIN-RIBUOT**

PU, Université de GRENOBLE-ALPES, Président









## RESUME

La sclérodermie (SSc) est une pathologie grave caractérisée par une atteinte microvasculaire combinée à une fibrose cutanée. Au niveau des extrémités, ce phénomène provoque des ulcères digitaux (UD) particulièrement douloureux et qui contribuent à diminuer la qualité de vie des patients atteints. La cicatrisation des UD est difficile et souvent de mauvais pronostic avec d'importants risques d'infection voire d'amputation. A ce jour, les injections intraveineuses d'iloprost, un analogue de la prostacycline, sont le seul traitement reconnu mais leur utilisation entraîne des effets secondaires et requiert une hospitalisation. Le treprostinil, un autre analogue de la prostacycline, est susceptible d'induire une importante vasorelaxation ce qui en fait une molécule d'intérêt majeur dans la prise en charge des UD. La sclérodermie est une pathologie complexe et aucun modèle animal ne présente l'ensemble de ses caractéristiques physiopathologiques. Parmi les modèles existants nous avons sélectionnés deux modèles murins (HOCL et uPAR<sup>-/-</sup>) récemment décrits comme étant prometteurs pour développer de nouvelles approches thérapeutiques dans la prise en charge des symptômes de la SSc.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'iontophorèse de treprostinil comme stratégie locale pour induire une accélération de la cicatrisation d'ulcères provoqués sur modèles de SSc. Brièvement, une lésion a été réalisée par excision de peau au niveau du dos de souris. Les animaux ont été répartis aléatoirement dans trois groupes : « témoin », « contrôle » et « treprostinil » et les plaies ont été suivies jusqu'à cicatrisation complète.

Les animaux traités par iontophorèse de treprostinil présentent une cicatrisation accélérée. Ces résultats ont été observés pour les deux modèles de SSc. L'effet le plus important a été mesuré au cours de la phase précoce de la cicatrisation.

Cette étude est la première à démontrer que la iontophorèse de treprostinil s'avère être une piste prometteuse dans la prise en charge thérapeutique des UD chez les patients atteints de SSc. D'autres études précliniques devront être menées pour mieux comprendre les mécanismes et une étude clinique devra confirmer ce résultat sur des patients.

**Mots clés :** sclérodermie systémique ; microcirculation ; vasodilatateurs ; iontophorèse ; ulcération.

## ABSTRACT

Systemic Sclerosis (SSc) is a serious disease affecting the skin microcirculation and characterized by fibrosis. Digital ulcers (DU) are the principal manifestation of this microvascular dysfunction in the extremities. DUs are frequent, painful, can cause functional impairment and have a major negative impact on the quality of life. Wound healing of DU is delayed and this can result in gangrene and amputation. To date, intravenous prostacyclin analogues (iloprost) are the only approved treatment for active SSc-related DU but their use is limited by serious vasodilation-induced side effects and usually requires hospitalization. Treprostinil is a prostacyclin receptor agonist that induces vascular relaxation and is used to treat advanced digital ischemia. Treprostinil is a very interesting candidate to enhance wound healing of ulcers in fibrotic skin. Scleroderma is a complex pathology and there is none existing animal model that can encompass all aspects of the disease related to fibrosis and vasculopathy. Among existing models, we selected two mouse models (HOCL and uPAR<sup>-/-</sup>) that were recently described as promising tool to study SSc-related vasculopathy and fibrosis such as digital ulcers.

The main objective of this study was to evaluate the therapeutic effect of topical administration of treprostinil on wound healing in two different preclinical models of SSc. Briefly, cutaneous excisional wounds were induced on mice. Animals were randomized into 3 sub-groups according the treatment to be administered: "sham", "control" and "treprostinil" and wound process was followed until full recovery.

Treprostinil iontophoretically-administered induced a significant acceleration in wound healing process in both models of SSc. The most significant effect was observed during the early phase of the healing process.

This study demonstrated that iontophoresis of treprostinil could be proposed as a local therapeutic strategy to SSc patients with digital ulcers. Further pre-clinical studies should be realized to explore the underlying pharmacological and electrical mechanisms involved and clinical study should be started soon to assess the potential effect on SSc-related ulcers.

**Key-words :** systemic sclerosis ; microcirculation ; vasodilator agents; iontophoresis; ulceration

## REMERCIEMENTS

A Mr le Professeur Cracowski, pour m'avoir donné les moyens de faire ce travail. Merci Jean-Luc pour ton soutien inconditionnel, pour la confiance que tu m'as donnée et pour ces bons moments passés ensemble.

A Mr le Docteur Roustit, pour m'avoir formé et surtout pour m'avoir cadré pendant toutes ces années. Merci Matthieu, pour ta bonne humeur, pour ton ouverture d'esprit et pour m'avoir tiré sans arrêt vers le haut.

A Mme le Docteur Sigaud-Roussel et à Mr le Professeur Kalia pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci Dominique et merci Bérengère pour m'avoir accueilli chez vous à plusieurs reprises et pour tous vos précieux conseils.

A Mme le Docteur Blaise, à Mr le Docteur Guilpain et à Mr le Docteur Avouac pour avoir accepté de juger ce travail. Merci Sophie pour ton soutien et ta gentillesse.

A Mme et Mr les Professeurs Ribuot, pour votre accueil, pour votre soutien et pour m'avoir fait une petite place.

A toute l'équipe du laboratoire HP2, sans qui ce travail n'existerait pas. Merci Claire pour ton encadrement et tes bons conseils. Merci Anne pour m'avoir fait confiance sur les enseignements. Merci Emeline, Sandrine, Sophie, Audrey et Thierry pour votre aide. Merci à tous mes co-doctorants pour leur bonne humeur.

A Mélanie, avec qui je partage absolument tout et surtout le meilleur. A ma fille Emma qui est arrivée en cours de route et qui m'apporte tant de bonheur. A ma famille, parents, beaux-parents, grands-parents, pour votre amour et votre soutien permanent.

A mes amis.





## ***Table des matières***

<b>I. Atteintes microcirculatoires dans la sclérodémie .....</b>	<b>11</b>
<b>II. La prise en charge des troubles trophiques vasculaires périphériques.</b>	<b>15</b>
1. Stratégies pharmacologiques de la prise en charge des ulcères digitaux de la sclérodémie ....	16
2. Stratégies non pharmacologiques de la prise en charge des ulcères digitaux dans la sclérodémie .....	25
<b>III. Modèles de sclérodémie et modèles d'ulcères cutanés .....</b>	<b>33</b>
1. Des modèles murins de sclérodémie .....	33
2. De la cicatrisation et des modèles d'ulcères .....	40
<b>IV. Développement de l'iontophorèse thérapeutique dans les atteintes microcirculatoire de la sclérodémie systémique : 6 ans de recherche à l'université Grenoble Alpes .....</b>	<b>49</b>
1. De l'iontophorèse .....	49
2. Avantages et limites de l'iontophorèse thérapeutique dans la cicatrisation cutanée .....	57
3. L'iontophorèse thérapeutique dans la Sclérodémie Systémique : synthèse des études cliniques et précliniques menées par l'équipe depuis 2009. ....	59
<b>PARTIE 2. LES ETUDES PRECLINIQUES .....</b>	<b>63</b>
<b>I. Screening de molécules candidates à l'iontophorèse cutanée sur modèle de rat : dans la continuité de l'étude INFLUX-RAT .....</b>	<b>63</b>
<b>II. Evaluation de l'iontophorèse d'activateurs de la guanylate cyclase soluble chez le rat. ....</b>	<b>75</b>
<b>III. Etude ancillaire sur l'effet du courant pulsée par rapport au courant continu dans l'iontophorèse de treprostnil.....</b>	<b>79</b>
<b>IV. Iontophorèse thérapeutique de treprostnil dans la cicatrisation d'ulcères sur deux modèles murins de sclérodémie .....</b>	<b>88</b>
<b>PARTIE 3. DISCUSSION .....</b>	<b>128</b>
<b>INDEX .....</b>	<b>138</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>141</b>



# **PARTIE 1. INTRODUCTION**

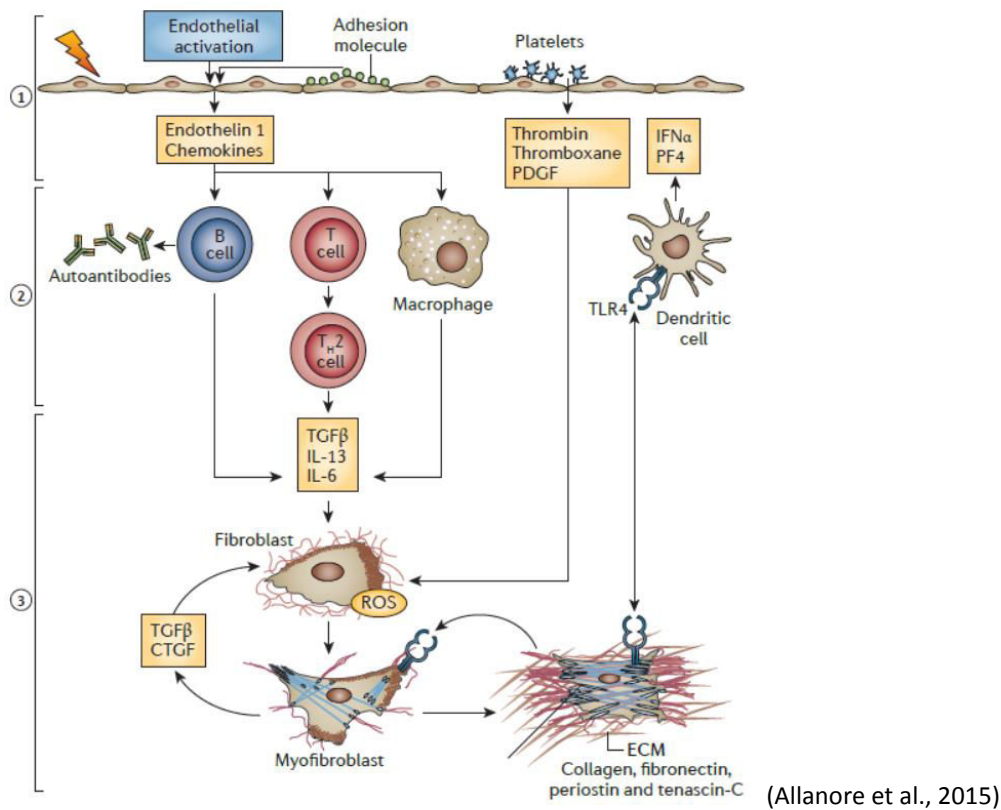
## **I. Atteintes microcirculatoires dans la sclérodermie**

(Allanore et al., 2015; Gabrielli, Avvedimento, & Krieg, 2009)

La sclérodermie systémique (SSc) fait partie des maladies systémiques auto-immunes les plus complexes. Elle se caractérise par trois manifestations principales: 1) une dérégulation du système immunitaire inné et acquis, avec la production d'auto-anticorps et de cellules auto-immunitaires; 2) une vasculopathie au niveau microcirculatoire avec un dysfonctionnement endothélial et une fibrose ; et 3) une hyperproduction de composants de la matrice extracellulaire qui s'accumulent dans la peau, les vaisseaux et les organes internes. L'atteinte microvasculaire apparaît précocement dans le développement de la pathologie et conduit progressivement à une réduction du nombre de microvaisseaux sanguins. Cette baisse de densité capillaire est liée au déséquilibre des fonctions réparatrices endothéliales et de l'angiogenèse, à l'épaississement de la paroi vasculaire associée à une prolifération des cellules musculaires lisses de l'intima, et au rétrécissement de la lumière vasculaire responsable d'une hypoxie tissulaire et d'un stress oxydatif. A ce phénomène s'ajoute une activation endothéliale caractérisée par : 1) une surproduction endothéliale de molécules d'adhésion, VCAM1 (vascular cell adhesion protein 1), ICAM (intercellular adhesion molecules) et la E-selectin, qui favorise la réaction inflammatoire ; et 2) une sécrétion augmentée de facteurs profibrotiques, endothéline-1 (ET-1) et CTGF (connective tissue growth factor), qui contribuent à la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi qu'à la production de composants de la matrice extracellulaire, notamment de collagène (figure 1). Cette accumulation de fibres de collagène, d'élastine, de glycosaminoglycanes et

de fibronectine conduit à l'apparition d'une fibrose cutanée et viscérale caractéristique de la sclérodémie systémique.

Figure 1. Le processus pathologique de la sclérodémie.



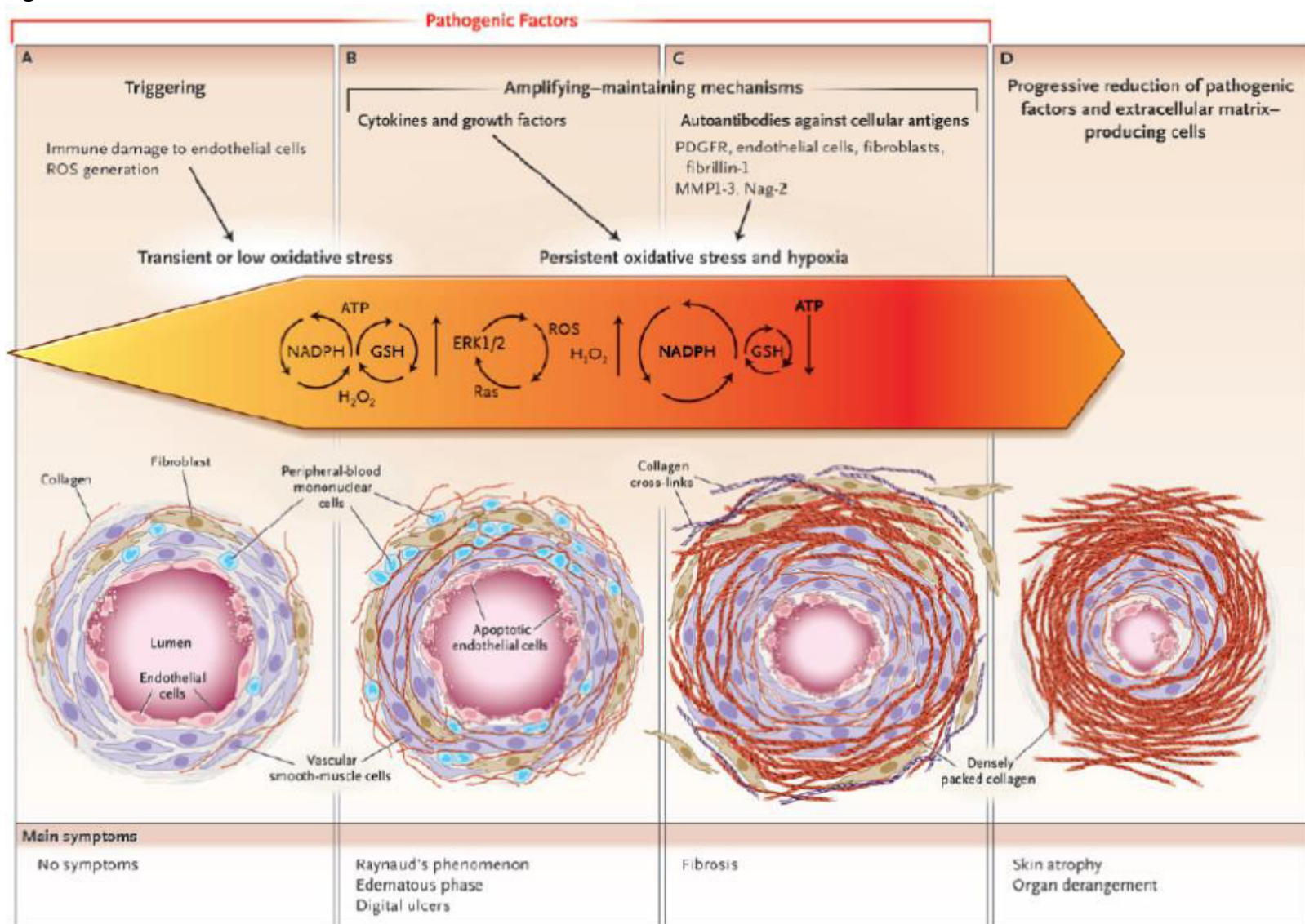
*Le processus est déclenché par un dommage vasculaire et une activation endothéliale (étape 1). En réponse aux chémokines et aux molécules d'adhésion, la réaction inflammatoire est initiée (étape 2) ; le « cocktail » de molécules inflammatoires conduit à l'activation de fibroblastes qui génèrent un stress oxydatif et se différencient en myofibroblastes, responsables de la production accrue de composants de la matrice extracellulaire (étape 3). L'activation des Toll-like receptor 4 (TLR4) au niveau des cellules dendritiques et des myofibroblastes conduit à une exacerbation du processus.*

Dysfonction endothéliale, fibrose et altération de l'angiogenèse sont étroitement liées dans la physiopathologie de la sclérodémie. Leur combinaison conduit d'abord à des anomalies de structure au niveau tissulaires puis rapidement à des troubles fonctionnelles microcirculatoires à l'origine des principaux symptômes de la maladie (figure 2). La

dérégulation des fonctions endothéliales est un élément central dans la survenue des complications vasculaires dans la SSc. En effet, les cellules endothéliales, situées sur la couche interne des vaisseaux, sont impliquées dans un grand nombre de fonctions physiologiques : maintien d'une surface non agrégante, interactions avec les cellules et les médiateurs circulants, production de molécules d'adhésion permettant l'initiation de la séquence adhésion-rolling-arrêt-transmigration leucocytaire, de facteurs de croissance, de substances vasoactives permettant la régulation endothéliale-dépendante du tonus vasculaire ou encore de cytokines et de chémokines. Chez le patient atteint de sclérodémie, plusieurs de ces fonctions sont altérées et conduisent à une perte de contrôle du tonus vasculaire et de la perméabilité vasculaire. Cette perte de régulation génère des spasmes vasculaires extrêmement délétères et responsables des lésions d'ischémie-reperfusion et de la production de radicaux libres que l'on retrouve dans les troubles trophiques.

A ce jour, l'origine de l'atteinte endothéliale dans la SSc reste mal identifiée et plusieurs hypothèses coexistent. La piste d'une infection virale, notamment au cytomégalovirus humain (hCMV), est parfois évoquée. En effet, des taux importants d'anticorps dirigés contre le hCMV sont retrouvés chez certains patients présentant une vasculopathie. D'autres patients ont des taux importants d'auto-anticorps dirigés contre les cellules endothéliales, ce qui orienterait vers un mécanisme auto-immun. Certains évoquent enfin une production accrue de radicaux superoxydes qui entrainerait une baisse de production des substances vasodilatatrices telles que le monoxyde d'azote (NO) et les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>). Quel que soit l'hypothèse, l'unique certitude est que l'altération primaire de l'endothélium est un évènement central qui apparait précocement dans le développement des troubles vasculaires de la SSc comme les troubles trophiques périphériques.

Figure 2. Les différents stades des lésions retrouvées dans la sclérodémie.



(Gabielli et al., 2009)

## II. La prise en charge des troubles trophiques vasculaires périphériques

Sont définies comme troubles trophiques vasculaires, toutes les anomalies permanentes de la peau engendrées par une insuffisance microcirculatoire d'origine artérielle ou veineuse (figure 3). Dans la sclérodermie, le principale trouble trophique est l'ulcère digital ischémique (UD), conséquence directe de la raréfaction capillaire au niveau des extrémités. Il s'agit de lésions très douloureuses et fortement récidivantes. L'apparition d'un UD est généralement secondaire à une blessure ou une coupure au niveau inguinal mais peut également survenir spontanément. Plus de la moitié des patients SSc font l'expérience d'un UD au moins une fois dans leur vie de malade, tandis que près d'un tiers présentent une forme persistante ou récurrente, c'est-à-dire chronique. Enfin, un tiers de ces formes chroniques sont considérées comme sévères et présentent un risque majeur de gangrène ou d'amputation. La perte de tissu engendrée au cours de l'ulcération est généralement définitive et conduit d'une part à un important handicap pour les patients mais également à des hospitalisations plus fréquentes. Heureusement, la prévalence des UD est en diminution depuis une quinzaine d'année, en partie grâce à une prise de conscience supérieure des médecins, à l'amélioration des stratégies thérapeutiques, pharmacologiques ou non, et au perfectionnement des interventions chirurgicales.

Figure 3. Manifestations vasculaires périphériques de la sclérodermie systémique : phénomène de Raynaud (à gauche) et ulcération digitale (à droite)





## **1. Stratégies pharmacologiques de la prise en charge des ulcères digitaux de la sclérodermie**

*(Botzoris and Drosos, 2011; Opitz et al., 2011; Abraham and Steen, 2015)*

En France, l'iloprost, un analogue PGI<sub>2</sub>, est indiqué dans la prise en charge curative des UD. Le bosentan, un antagoniste non sélectif des récepteurs à ET-1, est indiqué uniquement en prévention de la récurrence d'UD. Depuis quelques années de nombreuses études ont été menées pour évaluer de nouvelles molécules. Une recherche sur la base Medline avec l'association des mots clefs « skin ulcer/therapy » et « scleroderma, systemic » retourne 19 articles publiés dans le cadre d'essais cliniques menés sur la dernière décennie. Les candidats les plus étudiés appartiennent à 4 classes d'intérêt majeur : les antagonistes calciques, les inhibiteurs de la phosphodiesterase (PDE), les analogues PGI<sub>2</sub> et les antagonistes des récepteurs à ET-1. D'autres classes ont aussi fait l'objet d'études comme les nitrates, les statines et les alpha-bloquants, mais à un degré moindre.

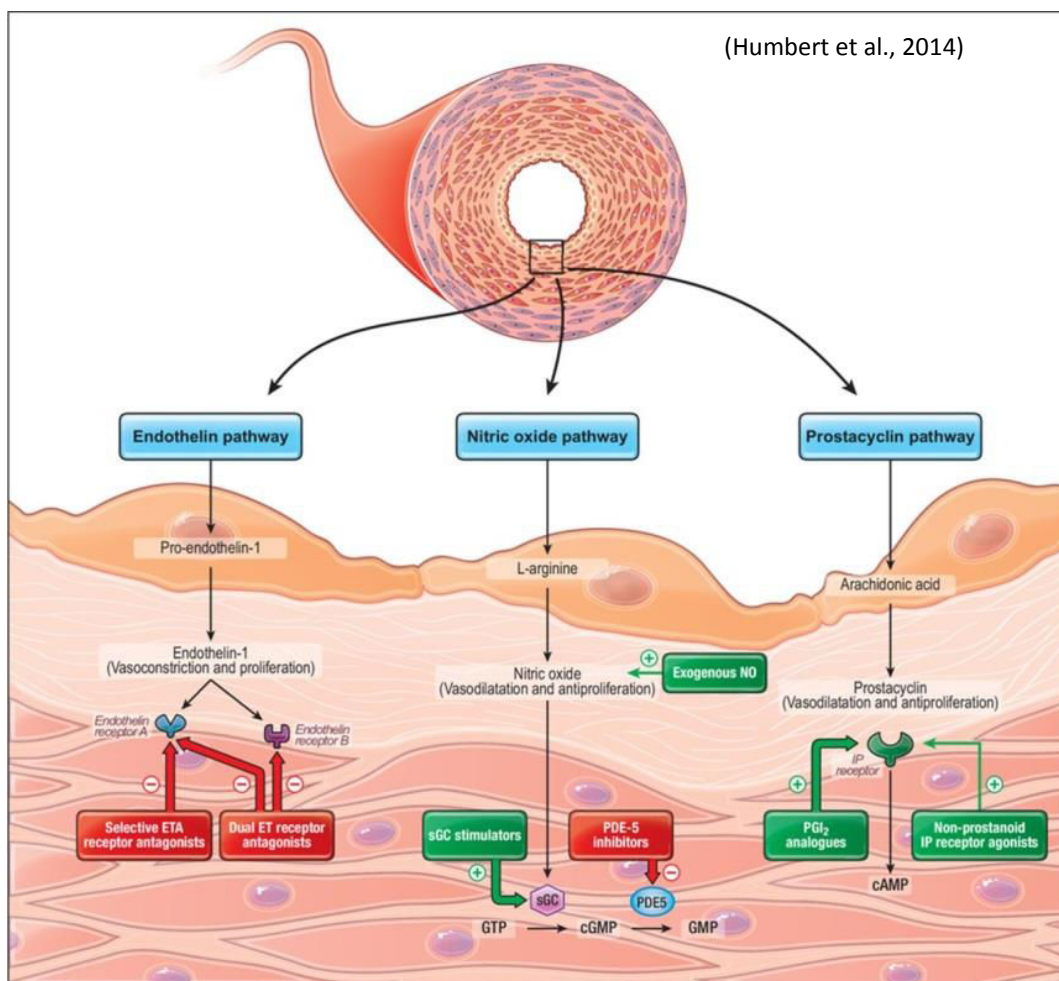
### *LES ANTAGONISTES CALCIQUES*

Les bloqueurs calciques sont considérés comme la ligne thérapeutique de 1<sup>ère</sup> intention dans le syndrome de Raynaud, qu'il soit primaire ou secondaire à une SSc. Du fait de leur action vasodilatatrice périphérique très puissante, les molécules comme la nifédipine et l'amlodipine, inhibent la contraction des muscles lisses en bloquant l'entrée cellulaire de calcium par les canaux voltage-dépendants. Dans le traitement des ulcères, une étude contrôlée et randomisée datant de 1989 a montré que les bloqueurs calciques étaient efficaces pour limiter la survenue des UD (Rademaker et al., 1989). En revanche leur utilisation est largement limitée par des effets secondaires importants liés à l'effet vasodilatateur systémique (céphalées, œdème périphérique, flush, hypotension orthostatique). A ce jour, les bloqueurs calciques ne sont étudiés qu'en association avec

d'autres vasodilatateurs périphériques. Une étude de cohorte prospective a débuté en 2013 sous la responsabilité du Pr Matucci de l'Université de Florence (Italie) pour étudier l'association des antagonistes calcique et de l'iloprost sur la survenue et sur le traitement des UD (clinical trial n° : NCT01836263). L'association sera comparée à une autre association composée de sildénafil et de bosentan.

Même si les antagonistes calciques ont encore largement leur place dans la stratégie thérapeutique, la recherche actuelle se tourne plutôt vers trois autres voies majeures que sont : la voie du monoxyde d'azote (NO pathway), la voie de la PGI<sub>2</sub> et la voie ET-1 (figure 4).

Figure 4. Principales cibles pharmacologiques dans le traitement des ulcères digitaux



LA VOIE NO-sGC-GMPc (OU NO PATHWAY)

Le monoxyde d'azote endogène est généré par la NO-synthase endothéliale (eNOS) à partir d'un acide aminé, le L-arginine, et d'oxygène moléculaire. La synthèse est principalement stimulée par les forces de cisaillement. Une fois libéré par les cellules endothéliales le NO a une action locale du fait d'une demi-vie courte. Il pénètre dans la cellule musculaire lisse, active une enzyme cytoplasmique, la guanylate cyclase soluble (sGC) impliquée dans la production du GMPc à partir de GTP. Lorsque le GMPc atteint une quantité suffisante dans la cellule, il entraîne une relaxation des fibres musculaires lisses et favorise ainsi la vasodilatation. Le NO dispose d'un rôle pivot dans l'équilibre du tonus vasculaire mais sa régulation est sensible et peut être altérée par de nombreux facteurs (hypertension, diabète, obésité, sédentarité, tabac, hyperlipidémie, âge, facteurs génétiques). En condition de stress oxydant et de dysfonction endothéliale, la eNOS produit du  $O_2^-$  qui peut prendre la place du NO et oxyder la sGC. Une fois oxydée, l'enzyme devient incapable de produire du GMPc et la cellule musculaire lisse ne peut plus se relâcher normalement. Augmenter la biodisponibilité du NO est une stratégie pharmacologique qui a conduit au développement d'un grand nombre de molécules et de nouvelles classes thérapeutiques (figure 5).

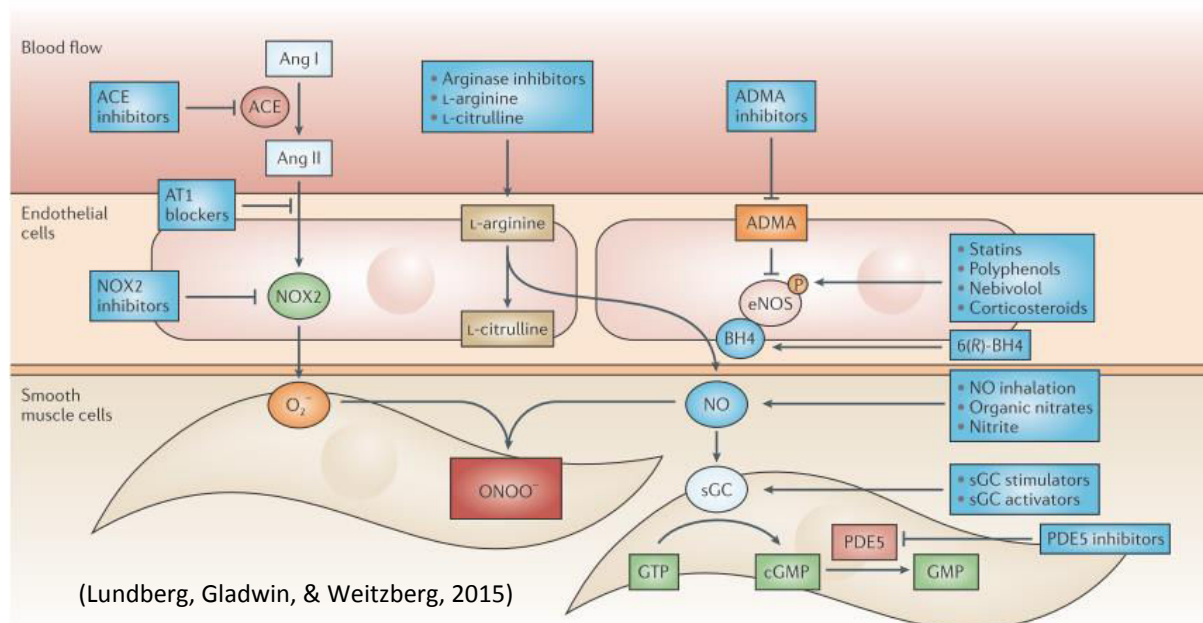
Trois classes de molécules parmi celles-ci ont particulièrement été étudiées dans la sclérodermie:

- Les nitrates donneurs de NO

Administrés localement ou par voie orale, les donneurs de NO induisent une augmentation du flux microvasculaire chez les patients sclérodermiques atteints de phénomènes de Raynaud, et pourraient réduire leur survenue et leur sévérité. Une nouvelle formulation galénique de nitroglycérine, le MQX-503, a un effet bénéfique sur le flux sanguin

basal et sur la sévérité du phénomène de Raynaud (Chung et al., 2009; Hummers et al., 2013). En revanche aucune étude sur l'ulcère digital n'a été publiée.

Figure 5. Les classes pharmacologiques de la voie NO-sGC-GMPc



- Les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5

Le blocage de la PDE-5 entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc dans les cellules musculaires lisses en bloquant la dégradation de ce dernier et conduit ainsi au maintien de la relaxation vasculaire induite par la voie du NO. Leur effet est puissant et déjà exploité dans l'hypertension artérielle pulmonaire ou dans les troubles de la fonction érectile. Quelques études ont montré un effet bénéfique potentiel des inhibiteurs de la PDE5 dans le traitement des ulcères digitaux, en particulier avec le sildénafil. En 2010, une réduction significative du nombre d'ulcères a été observée dans une cohorte non randomisée de 19 patients traités quotidiennement pendant plusieurs mois (Brueckner et al., 2010). Un essai randomisé contrôlé multicentrique, a évalué l'effet d'une prise quotidienne de sildénafil pendant 12 semaines sur la durée et le taux de cicatrisation des UD

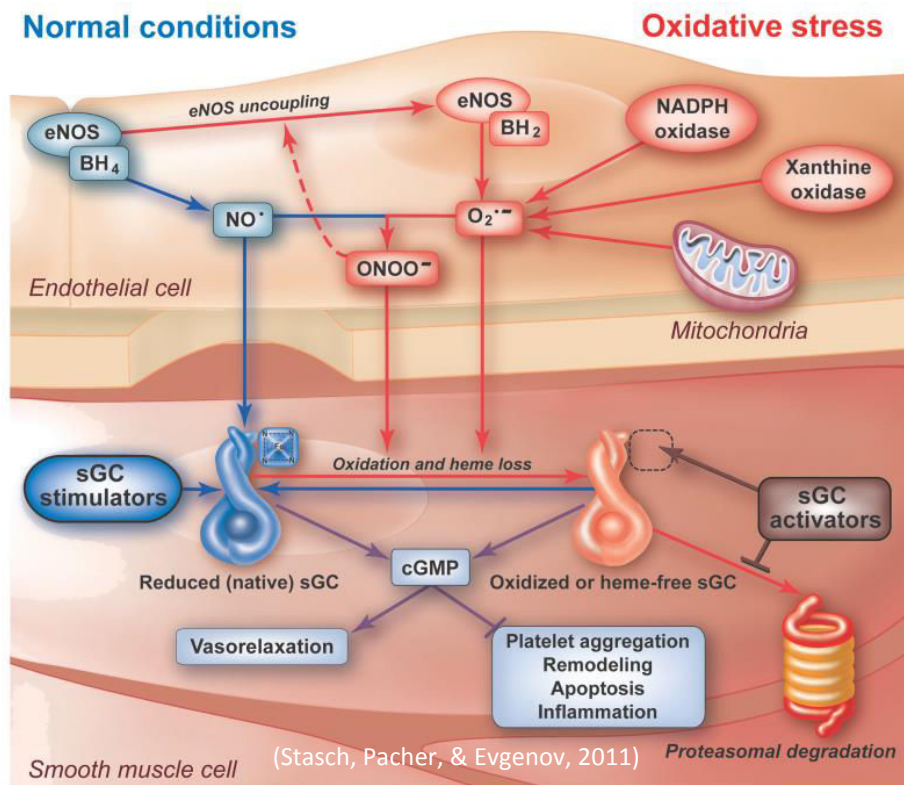
chez une population de patients SSc (Hachulla, Hatron, Carpentier, Agard, Chatelus, Jegou, Mouthon, Queyrel, Fauchais, Michon-Pasturel, Jaussaud, Mathian, Granel, Diot, Farge-Bancel, Mekinian, Avouac, Desmurs-Clavel, & Clerson, 2015). Sur le critère du temps de cicatrisation, l'étude n'a pas réussi à mettre en évidence une amélioration dans le groupe traité, en partie à cause d'un délai de cicatrisation plus rapide que prévu dans le groupe témoin. En revanche, il a été démontré que le nombre d'ulcères par patient été diminué au bout de 8 et 12 semaines chez les patients traités par sildénafil. L'analyse de sous-groupes montre également que l'association du sildénafil avec du bosentan accélérât la cicatrisation des ulcères par rapport au bosentan seul. Malgré ces récents résultats prometteurs, le recours au traitement par inhibiteurs de la PDE5 n'est pour l'instant qu'une piste thérapeutique et d'autres études cliniques contrôlées devront être encore être réalisées.

- Les stimulateurs et les activateurs de la guanylate cyclase soluble

Les agonistes (stimulateurs ou activateurs) de la sGC font partie des toutes dernières classes pharmacologiques développées dans le domaine cardiovasculaire. En agissant directement ou indirectement sur l'enzyme, ils sont capables de déclencher la voie du GMPc sans interagir avec la production de NO. La distinction entre stimulateur et activateur tient à une différence de sites de liaison sur l'enzyme et à son niveau d'oxydation. Ainsi, les stimulateurs comme le riociguat agissent sur l'enzyme native (ou réduite) tandis que les activateurs comme le cinaciguat agissent sur l'enzyme oxydée (figure 6). A ce jour aucune étude dans la prise en charge des UD n'a été menée chez l'homme, seule une étude est en cours dans le syndrome de Raynaud mais aucun résultat n'a encore été publié (clinical trial n°: NCT01926847). En revanche, en 2015, le riociguat a obtenu une autorisation de mise

sur le marché avec une indication dans l'HTAP, ce qui en fait un candidat particulièrement sérieux dans la prise en charge des UD.

Figure 6. Mécanismes d'action des stimulateurs et des activateurs de la sGC



Les stimulateurs et les activateurs de la guanylate cyclase soluble agissent respectivement sur les deux états d'oxydation de l'enzyme : la forme réduite ( $Fe^{2+}$ ) sensible au NO et la forme oxydée ( $Fe^{3+}$ ) insensible au NO. Les stimulateurs stabilisent le complexe NO-hème( $Fe^{2+}$ ) et potentialisent l'effet du NO. Dans certaines conditions physiopathologiques (insuffisance cardiaque, hypertension systémique ou pulmonaire, athérosclérose et lésions d'ischémie-reperfusion), l'équilibre rédox de la sGC est déplacé vers la forme oxydée sous l'effet des espèces réactives de l'oxygène. Une fois oxydée l'hème perd son affinité pour son site de liaison et peut être relarguée. Les activateurs de la sGC sont capables de remplacer l'hème oxydée ou de prendre sa place lorsqu'elle est laissée vacante. A la différence des stimulateurs, la présence de NO produit un effet additionnel avec les activateurs et non synergique. Dans certains cas, les activateurs de la sGC sont susceptibles de protéger la dégradation par les protéasomes. (BH<sub>4</sub>, tetrahydrobiopterin; BH<sub>2</sub>, dihydrobiopterin; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide; et ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite)

## LA VOIE DE LA PROSTACYCLINE

L'iloprost est un analogue stable de la prostacycline, agoniste des récepteurs IP dont l'agoniste naturel est la prostaglandine de type I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). Ces récepteurs sont situés, entre autres, à la surface des cellules musculaires lisses et des plaquettes. L'administration intraveineuse d'iloprost produit une puissante vasodilatation ainsi qu'un effet antiagrégant, ce qui en fait le traitement curatif de première intention dans la prise en charge des troubles trophiques chez le patient SSc. Le schéma thérapeutique consiste en plusieurs cures de 5 jours avec perfusion quotidienne d'iloprost pendant 6h. La cure peut être répétée toutes les 6 à 12 semaines. D'autres analogues PGI<sub>2</sub> existent et ont fait l'objet d'études, comme l'époprostenol et le treprostinil, deux molécules déjà indiquées dans le traitement de l'HTAP. Mais jusqu'à présent les résultats ont été insuffisants pour conduire à une extension de leur indication au traitement des UD.

Les analogues PGI<sub>2</sub> pourraient également présenter un effet antifibrotique. En favorisant la diminution de l'expression de certains médiateurs pro-fibrotiques, en bloquant la synthèse de collagène et en inhibant la migration des fibroblastes, les analogue PGI<sub>2</sub> présentent un grand espoir dans le traitement de la fibrose. Dans une étude randomisée et contrôlée publié en 2001, l'utilisation d'iloprost en cures répétées a montré une amélioration significative du score de Rodnan, qui rend compte du niveau d'atteinte cutanée, chez les patients traités (Scorza et al., 2001). Cet effet antifibrotique, s'il était confirmé par d'autres études notamment histologiques, serait un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation de cette classe de molécules dans le traitement des ulcères digitaux chez le patient SSc.

## *LA VOIE DE L'ENDOTHELINE 1*

L'endothéline-1 est vasoconstricteur endogène puissant dont l'implication dans la physiopathologie de la SSc est clairement établie. En particulier, des taux plasmatiques élevés d'ET-1 sont régulièrement retrouvés chez les patients atteints. En stimulant la production de matrice extracellulaire par les fibroblastes, l'ET-1 serait un acteur central dans le développement de la fibrose et dans l'apparition des atteintes vasculaires. Actuellement, une seule molécule est indiquée dans la prise en charge des UD, le bosentan. Son effet sur la survenue de nouveaux UD a été démontré dans l'essai RAPIDS-2 publiée en 2011, mais aucun effet curatif n'a été retrouvé (Matucci-Cerinic et al., 2011).

L'utilisation de molécules vasodilatatrices par voie intraveineuse ou par voie orale dans le traitement des troubles trophiques de la SSc présentent deux principales limites. La première est la survenue d'effets indésirables directement imputables au mécanisme d'action de ces molécules : hypotension artérielle, bouffée vasomotrice, bradycardie, céphalée pour l'iloprost (figure 7). Pour contrer ces effets, le seul recours est l'utilisation de doses plus faibles. La seconde est la raréfaction capillaire intrinsèque à la pathologie. En effet, étant donnée la baisse de densité vasculaire et le rétrécissement de la lumière des vaisseaux restants, la distribution des molécules actives jusqu'à leur cible au niveau microvasculaire est fortement limitée. Pour augmenter la concentration locale en médicaments aux abords des ulcères, il est souvent nécessaire d'augmenter la dose administrée ce qui tend à produire d'avantage d'effets indésirables. Cette difficulté majeure est un frein à l'optimisation posologique et également au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des UD chez le patient SSc.



Figure 7. Effets secondaires les plus fréquents des principales classes pharmacologiques utilisées dans le traitement des UD. (adapté de Opitz et al., 2011)

<b>Drug</b>	<b>Drug class</b>	<b>Frequent side effects, special notes</b>
Iloprost	prostanoids	flush, headache, nausea, gastrointestinal symptoms, hypotension
Bosentan	ET <sub>1</sub> -receptor blocker	peripheral edema, headache, nasal congestion, nausea, liver function disturbances (screen transaminases monthly)
Sildenafil	PDE-V-inhibitor	flush, GI-symptoms, headache; avoid nitrates
Nifedipine	Ca-channel-blocker	flush, hypotension, orthostatic effects, gastrointestinal symptoms, edema
Prazosin	α <sub>1</sub> -adrenergic inhibitor	hypotension, orthostatic effects
Atorvastatin	HMG-CoA-reductase-inhibitor (statin)	muscle weakness, rhabdomyolysis especially in the presence of low vitamine D levels, liver enzyme elevation
Fluoxetine	Serotonin-re-uptake inhibitor	weight loss, suicide, purpura, dizziness, agitation, sleep disturbances; note: beneficial in patients with depression
Losartan	AT1-inhibitor	hypotension; note: also beneficial in SSc-associated renal disease and myocardial dysfunction
Captopril, enalapril and others	ACE-inhibitors	Hypotension, coughing Note: also beneficial in Ssc-associated renal disease and myocardial dysfunction

## **2. Stratégies non pharmacologiques de la prise en charge des ulcères digitaux dans la sclérodermie**

(Barnes, Shahin, Gohil, & Chetter, 2014; Kawasaki et al., 2014; Kloth, 2005; Koel & Houghton, 2014; Polak, Franek, & Taradaj, 2014; Sussman & Bates-Jensen, 2012)

La prise en charge non médicamenteuse des ulcères digitaux a fait d'importants progrès, notamment au niveau préventif. Eviction du tabac et des agents déclencheurs comme le froid, le stress, la prise de traitements vasoconstricteurs (béta-bloquant, triptans, cisplatine, ...), utilisation de gants de protection ou de gants chauffants permettent de réduire la survenue des UD chez les patients qui respectent ces recommandations. La chirurgie reste souvent nécessaire mais seulement en dernier recours, tandis que d'autres pistes non pharmacologiques font l'objet d'études intéressantes comme l'effet pro-cicatrisant du courant.

### *LA STIMULATION ELECTRIQUE DANS LA CICATRISATION CUTANEE*

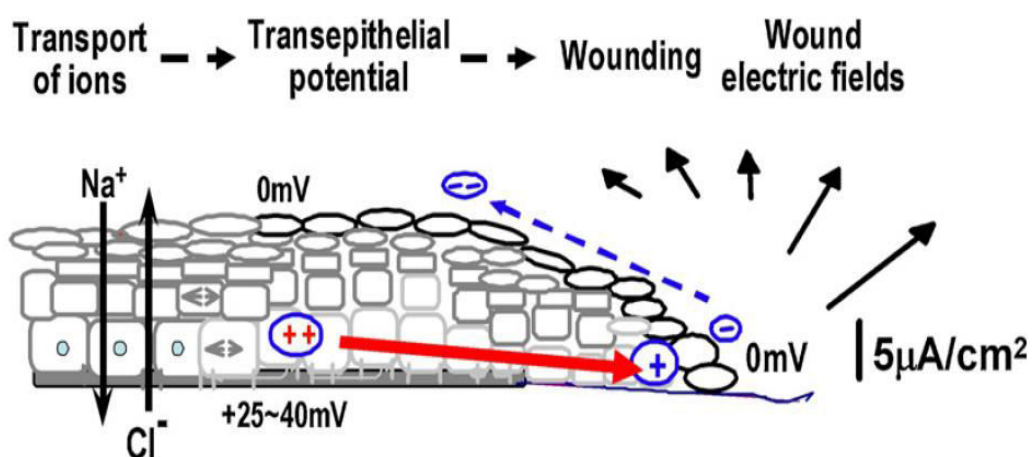
Exploiter la stimulation électrique pour favoriser la cicatrisation d'une plaie n'est pas une idée récente. Au XVII<sup>ème</sup>, des expériences sur les propriétés cicatrisantes du courant étaient déjà menées avec des feuilles d'or chargées. En 1850, c'est Lente qui a décrit pour la première fois un effet bénéfique du courant sur la réparation de fractures osseuses. Un siècle plus tard, le courant commençait à être expérimenté sur des plaies chroniques. Pendant quarante ans, les expériences se sont multipliées et les premiers succès sur des essais cliniques ont commencé à venir. Finalement, ce n'est qu'au début du XXI<sup>ème</sup> siècle que l'électrostimulation est véritablement entrée dans la liste des solutions non pharmacologiques de prise en charge des ulcères puisque la technique a obtenu une autorisation de remboursement par la FDA dans l'ulcère de pression et l'ulcère diabétique

en échec thérapeutique. Pour essayer de comprendre comment le courant peut favoriser la cicatrisation, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été conduites.

Les principaux résultats des expériences *in vitro* ont montré que : 1) le courant entraîne une réponse cellulaire avec des modifications métaboliques pouvant aller jusqu'à la différenciation cellulaire ; et 2) le courant favorise la migration des cellules tel que les neutrophiles, les macrophages, les fibroblastes ou encore les kératinocytes. Ce mécanisme de mouvement cellulaire sous l'effet d'un champ électrique attracteur de polarité opposée est appelé « galvanotaxie ». Il s'agit d'un phénomène endogène et physiologique bien décrit dans la cicatrisation. En effet, la galvanotaxie intervient dès les premiers recrutements de cellules et favorise la sélection de certaines cellules. L'idée de certains chercheurs a donc été de simuler, voire d'amplifier ce phénomène endogène par l'application d'un courant exogène. Une première étude a ainsi montré que l'application d'un courant exogène sur une culture de cellules de la peau avait conduit à une augmentation de la quantité de neutrophiles de plus de 24% (Eberhardt, Szczypiorski, & Korytowski, 1986). Une seconde étude a ensuite montré que la migration de cellules de l'épiderme sur 7 jours augmentait lorsque les cellules étaient exposées à un courant et que cet effet pouvait être amélioré si le sens du courant était alterné au cours de la cicatrisation. En l'occurrence, l'auteur a utilisé un protocole avec du courant cathodale (polarité négative) pour le premier jour suivi par 6 jours de courant anodale (polarité positive) (Mertz, Davis, & Cazzaniga, 1993). La galvanotaxie n'est pas le seul mécanisme qui permet le mouvement des cellules, d'autres phénomènes comme le chimiotactisme, la levée d'inhibition de contact, la pression de population cellulaire locale ou certaines forces mécaniques peuvent aussi agir. Dans le cas de la galvanotaxie, les cellules suivent les lignes d'un champ électrique grâce à une détection

extrêmement fine. Lorsque la peau est intacte, ce champ électrique est principalement généré par la différence de potentiel transépithéliale (figure 8). Cette différence de potentiel « verticale » est entretenue par des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  qui maintiennent le potentiel en surface de l'épithélium autour de 0mV et celui au niveau de la frontière dermo-épithéliale autour de 40mV. Au contraire, lorsque la peau est lésée et que la barrière épithéliale s'ouvre, une chute soudaine du potentielle au niveau de la zone atteinte est observée. Une nouvelle différence de potentielle cette fois-ci « horizontale » s'établit entre les couches de peau saine et la brèche tissulaire, générant ainsi un nouveau champ électrique dirigé vers le centre de la plaie. Le champ agirait alors comme un signal et déclencherait une cascade de réponses cellulaires et moléculaires par des phosphokinases, des intégrines, ou encore le facteur de croissance épidermique (EGFR), ce qui pousserait les cellules à se rapprocher du pôle cathodale du champ. En appliquant un champ électrique exogène de même polarité, il serait ainsi possible, en théorie, de favoriser ce phénomène et ainsi d'accélérer la cicatrisation.

Figure 8. Le champ électrique de lésion apparaît lorsque la barrière épithéliale est rompue



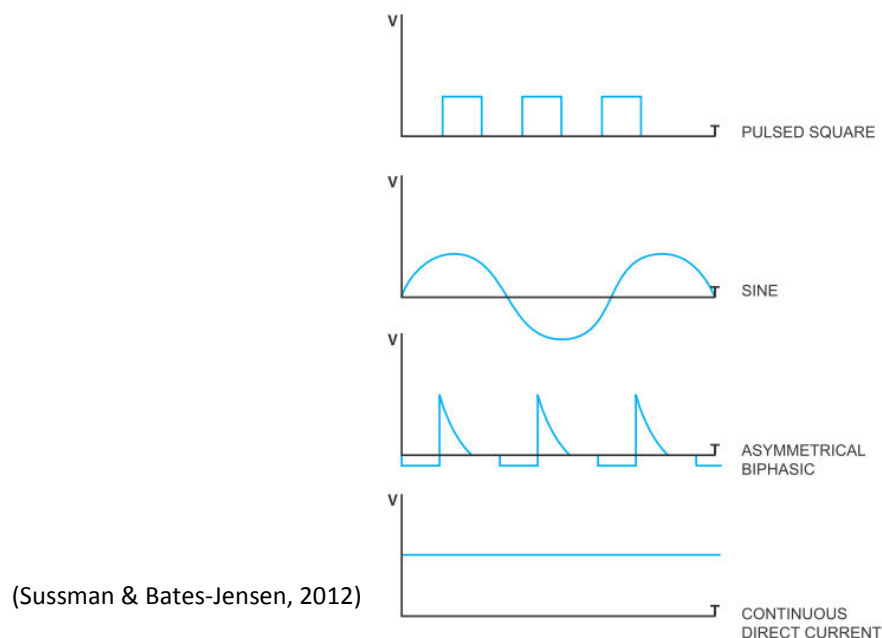
(Min Zhao, 2009)

Plusieurs expériences sur modèles animaux de cicatrisation ont rapidement apporté la preuve que le courant pouvait effectivement améliorer la cicatrisation : accélération de la réépithélialisation d'une peau brûlée, amélioration de la qualité d'une peau traumatisée, augmentation de la survie d'un tissu cutané en ischémie. Malheureusement, le principal défaut de ces études est qu'aucune n'a appliqué le même protocole de courant, poussant chaque auteur respectif à conclure à une meilleure efficacité de son modèle par rapport à celui des autres. Ces résultats ont ouvert de nombreux débats, notamment sur le sens et sur la forme de courant à appliquer pour une meilleure efficacité. Ainsi, quand certaines équipes affirment que le courant anodale est le plus efficace car il permet le rapprochement des bords de la plaie et un retour au potentiel transépithélial, d'autres équipes montrent que c'est le courant cathodale le plus efficace en favorisant la migration des macrophages, des neutrophiles et des fibroblastes au cours des phases inflammatoire et proliférative.

Finalement, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus au cours d'essais sur l'homme. Dans une étude sur les ulcères veineux, Junger et son équipe ont appliqué quotidiennement un courant continu avec des impulsions de  $140\mu\text{s}$  sur la plaie pendant 30 minutes sur une période de 38 jours, en alternant de temps en temps la polarité (Junger et al., 2008). Grâce à ce traitement, les investigateurs ont montré une augmentation significative de la densité capillaire au niveau de l'ulcère passant de 8 capillaires/ $\text{mm}^2$  à environ 11.5 capillaires/ $\text{mm}^2$ . Cette augmentation de densité vasculaire était associée à une augmentation significative du taux d'oxygénation tissulaire locale ainsi qu'à une augmentation du flux sanguin mesuré par fluxmétrie doppler. Une seconde étude impliquant des patients diabétiques avec une insuffisance veineuse, a montré que l'électrostimulation pouvait augmenter la pression partielle transcutanée en  $\text{O}_2$  à l'extrémité du membre inférieur traité, ouvrant ainsi le champ de la cicatrisation des ulcères à composante

vasculaire (Goldman, Brewley, & Golden, 2002). Depuis ces résultats, plus d'une vingtaine d'études cliniques ont été conduites pour étudier la cicatrisation courant-induite sur les ulcères de toutes sortes (ulcères de pression, ulcères diabétiques, ulcères veineux ou artériels, ulcères mixtes) mais ici encore avec presque autant de protocoles que d'études. Certaines études ont utilisé un courant continu (DC), d'autres un courant alternatif (AC) symétrique ou non, d'autres encore se sont intéressés au courant pulsé continu (pDC) (figure 9). Le recours à des protocoles différents a longtemps rendu impossible la formulation de conclusions claires sur le sujet. Pour se faire une idée plus précise et essayer de démêler un certain nombre de contradictions, plusieurs équipes ont tenté un regroupement des résultats de ces études afin de produire une méta-analyse qui serait capable de donner une réponse plus précise sur l'efficacité du courant et surtout sur le type de courant à appliquer.

Figure 9. Les formes de courant utilisées dans les expériences de cicatrisation par électrostimulation



En 2014, deux méta-analyses ont été publiées successivement. La première, réalisée par l'équipe de Barnes et al, a notamment permis de montrer que l'utilisation de courant, pulsé ou alternatif, augmentait d'environ 25% la surface de peau cicatrisée d'un ulcère, tout type d'ulcères confondus. Cependant, les études sélectionnées par Barnes pour son analyse n'ont pas suffi à mettre en évidence quelle type de courant semblait le plus efficace.

La seconde méta-analyse a été produite par Koel et son équipe. Dans cette étude, 15 essais randomisés contrôlés ont été inclus, avec tout type d'ulcères et tout type de courants. Ici encore l'effet courant a bien été retrouvé, avec une augmentation moyenne de la surface de peau cicatrisée de l'ordre de 30% au bout de 4 semaines de traitement. *A contrario* de Barnes qui a essayé de regrouper tous les résultats des études en conservant le critère d'analyse de chacune, Koel a utilisé un critère commun à toutes ses études, nommé PAR4 pour pourcentage de réduction de surface à 4 semaines. En comparant les études qui ont utilisé un courant continu avec celles qui ont utilisé un courant alternatif, Koel a montré que le courant continu était plus efficace. En revanche aucune conclusion n'était donnée sur le type de courant continu à préférer (DC ou pDC).

Dans une revue publiée en 2014, l'équipe de Polak s'est intéressée uniquement aux études utilisant un protocole de courant continu pulsé de haute tension (HVPC). L'analyse menée dans cet article a permis de conclure que l'HPVC pouvait induire une accélération de la cicatrisation surtout au cours de la phase précoce. Pour augmenter la puissance de son analyse, l'équipe de Polak n'a sélectionné que des études pour lesquelles les protocoles électriques étaient assez proches : pulsation moyenne de 100 $\mu$ s, nombre d'impulsions autour de 100 pps, tension de 50V à 200V et sens cathodale au moins pendant la première semaine. L'analyse détaillée a tout de même permis de montrer qu'une durée de traitement de 3 séances de 45 minutes par semaine était aussi efficace qu'un traitement classique de

1heure par jour 5 fois par semaines. En revanche, aucune donnée sur l'effet des différents paramètres de courant n'a été produite.

Une seconde revue a été réalisée par l'équipe de Kawasaki. Cette analyse ne concernait cette fois que les études sur ulcères de pression et avec un effectif de population supérieur à 15 patients, tout type de protocoles de courant confondus. Ici aussi les auteurs concluent sur une efficacité marquée du courant dans la cicatrisation. Mais leur conclusion va un peu plus loin puisqu'ils suggèrent que le recours au courant pulsé (HVPC) est certainement plus efficace que le DC non pulsé ou que le AC, notamment pour trois raisons. D'abord, ils considèrent que le HVPC simule mieux le champ électrique endogène créé lors d'une lésion. Ensuite, ils estiment que les résultats des différentes études cliniques vont dans ce sens malgré la difficulté de les comparer réellement entre elles. Troisièmement, le HVPC serait préférable car il réduirait le risque de réaction de type brûlure et augmenterait la profondeur de pénétration du courant. La forme de courant à adopter serait donc bien le courant HVPC selon les auteurs mais par contre, ici encore, aucune conclusion n'est donnée sur le sens du courant à privilégier.

Pour obtenir des informations sur la polarité, il existe un ouvrage de référence publiée par le Dr. Sussman sur le sujet : « Wound Care. A Collaborative Practice Manual for Health Professionals » (Sussman & Bates-Jensen, 2012). Dans le chapitre dédié à l'électrostimulation, l'auteur suggère que la polarité est effectivement un paramètre clé qui interviendrait autant dans la galvanotaxie que dans la perfusion tissulaire. Ainsi, au cours de la phase inflammatoire les macrophages auraient besoin d'un courant anodale pour rejoindre le cœur de la lésion. Puis, au cours de la phase proliférative ce sont les fibroblastes qui auraient cette fois-ci besoin d'un courant cathodale pulsée de faible tension pour se multiplier et pour produire un maximum de fibres de collagène. Enfin, pendant la phase de



remodelage, les données semblent manquer pour conclure à un effet de la polarité. Concernant la microcirculation, le courant pulsé HVPC serait plus efficace en cathodale pour augmenter le flux sanguin cutané aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Un courant alternatif pourrait également être bénéfique sur la perfusion de l'ulcère mais seulement à faible fréquence. Au-delà de l'analyse offerte, l'auteur propose un protocole évolutif basé sur un courant de type HPVC, appelé le protocole « Sussman Wound Healing Protocols for HVPC ». Une description synthétisée est proposée ici (figure 10).

Figure 10. Protocole de cicatrisation par électrostimulation HVPC du Dr Sussman

Parameters	Edema	Inflammation	Proliferation	Epithelialization	Remodeling	Venous Return <sup>2</sup>
Polarity	Negative	Negative	Alternate negative/positive every 3 d	Alternate daily	Alternate daily	Not critical; adjust for patient comfort
Pulse rate (frequency)	30–50 pps	30 pps	100–128 pps	60–64 pps	60–64 pps	40–60 pps
Intensity	150 V or less depending on patient tolerance	100–150 V	100–150 V	100–150 V	100–150 V	Surge mode on time, 3–15 s; off time, 9–40 s (1:3 on/off ratio) to motor excitation
Duration	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	5–10 min, progress to 20–30 min
Treatment frequency	5–7 times/wk for first week, then 3 times/wk for 1 wk	5–7 times/wk, once daily	5–7 times/wk, once daily	3–5 times/wk, once daily	3 times/wk, once daily	Daily; modify to biweekly

Un dernier effet positif du courant dans la cicatrisation est régulièrement avancé par les adeptes de l'électrostimulation, il s'agit des propriétés bactéricides du champ électrique. Bien que largement démontré dans plusieurs expériences *in vitro* et *in vivo*, ce phénomène reste encore mal expliqué. Certains avancent l'hypothèse de la polarité, d'autre un effet associé à l'augmentation du flux sanguin et de l'apport en oxygène. Le phénomène a été rapporté dans plusieurs cas cliniques bien décrits et semble ne souffrir d'aucune contestation.

### **III. Modèles de sclérodermie et modèles d'ulcères cutanés**

#### **1. Des modèles murins de sclérodermie**

(Asano & Sato, 2013; Avouac, Elhai, & Allanore, 2013; Dumoitier, Lofek, & Mouthon, 2014; Manetti et al., 2013; Servettaz et al., 2009)

Malgré les importants moyens déployés pour mieux comprendre la SSc et pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques, les mécanismes physiopathologiques restent encore peu élucidés et les nouvelles molécules prometteuses se comptent sur une seule main. La découverte de nouveaux médicaments candidats tient étroitement à la possibilité d'avoir recours à des modèles expérimentaux qui soient le plus fidèles possible aux composantes de la pathologie. Disposer de plusieurs modèles et choisir le plus adapté à ses besoins est essentiel pour obtenir un succès maximal lors des phases cliniques du développement. Malheureusement, la sclérodermie est une pathologie complexe multifactorielle et aucun modèle animal actuellement disponible ne présente parfaitement l'ensemble des composantes physiopathologiques de la pathologie. Les récentes revues publiées sur les modèles de SSc montrent parfaitement que le modèle « idéal » n'a pas encore été trouvé et que le choix d'un modèle doit être justifié à la fois par l'organe et la composante pathologique ciblés (inflammation, fibrose, immunité, vasculopathie). Nous présentons ici un rapide état de l'art concernant les différents modèles de sclérodermie aujourd'hui disponibles. Comme de plus en plus souvent dans la recherche expérimentale, deux grandes catégories de modèles existent dans le cas de la SSc : les modèles génétiques et les modèles chimiques.

## *LES MODELES GENETIQUES*

Avec le développement exponentiel des outils de génie génétique, à chaque nouvelle découverte d'une protéine impliquée dans la survenue d'une des composantes de la sclérodermie, un modèle génétique de souris exprimant (ou n'exprimant pas) la protéine est produit. Les animaux ainsi créés expriment généralement un certain nombre de symptômes en commun avec la SSc et peuvent être utilisés pour explorer les mécanismes et pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- TSK-1 et TSK-2

Les modèles Tight Skin-1 et Tight Skin-2 (TSK-1 et TSK-2) sont les deux modèles transgéniques les mieux décrits dans la littérature. Les souris TSK-1 présentent une mutation du gène codant pour la fibrilline 1 tandis que les souris TSK-2 présentent une mutation chimiquement induite sur le chromosome 1 par un agent mutagène, la N-nitroso-N-éthylurée.

La souris TSK-1 développe spontanément une fibrose cutanée associée à une surproduction de matrice extracellulaire au niveau de l'hypoderme et indépendamment de toute composante inflammatoire. TSK-1 exprime également des anticorps spécifiques de la SSc comme des anti-topoisomères. La souris TSK-2 présente à la fois une fibrose hypodermique, des anticorps spécifiques de la SSc et des marqueurs inflammatoires. TSK-2 reste tout de même bien moins décrite que le modèle TSK-1 pour le moment. Aucun modèle TSK ne possède de composante pulmonaire comparable à la fibrose pulmonaire du patient SSc. Elle ne souffre d'aucune vasculopathie non plus. Ces modèles sont particulièrement appréciés pour étudier l'effet anti-fibrotique de certains candidats thérapeutiques.

- $T\beta RI^{CA}$  et  $T\beta RII\Delta k$

L'implication dans la SSc du facteur de croissance transformant TGF- $\beta$  comme activateur des fibroblastes et comme agent pro-fibrotique, a conduit à la mise au point de deux modèles transgéniques de sur-activation de la voie du TGF- $\beta$  fibroblastique: la souris  $T\beta RI^{CA}$  et la souris  $T\beta RII\Delta k$ . Le premier modèle permet de contrôler l'activation du TGF- $\beta$  de manière tissu spécifique. Une fois « activées », les souris développent spontanément une fibrose cutanée généralisée. Aucune composante inflammatoire, auto-immune ou pulmonaire n'est observée et la vasculopathie est très différente de celle de la SSc. Le second modèle est légèrement différent, ici c'est la boucle du rétro-contrôle négatif de la production TGF- $\beta$  qui est inhibée artificiellement au niveau des fibroblastes. La souris  $T\beta RII\Delta k$  produit une fibrose importante au niveau cutanée et pulmonaire ainsi qu'un remodelage vasculaire sévère au niveau des grosses artères élastiques. La souris  $T\beta RII\Delta k$  est spécialement appréciée pour étudier l'hypertension artérielle pulmonaire secondaire à la SSc. Les principales limites de ces deux modèles sont évidemment leur coût et la difficulté technique à les mettre en place.

- Fra-2

La protéine Fra-2, pour « Fos-related antigen-2 », fait partie de la famille des facteurs de transcription AP-1 qui jouent un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, les processus inflammatoires, la cicatrisation, la fibrose et le développement tumoral. La souris transgénique Fra-2 surexprime cette protéine et développe une inflammation généralisée, une fibrose cutanée et pulmonaire importante et une atteinte vasculaire endothéliale associée à une raréfaction capillaire. Le modèle Fra-2 est apprécié car il est l'un des seuls à faire le lien entre atteinte vasculaire, fibrose et inflammation. Les souris Fra-2 développent

une fibrose cutanée mais le modèle est particulièrement apprécié pour son atteinte pulmonaire.

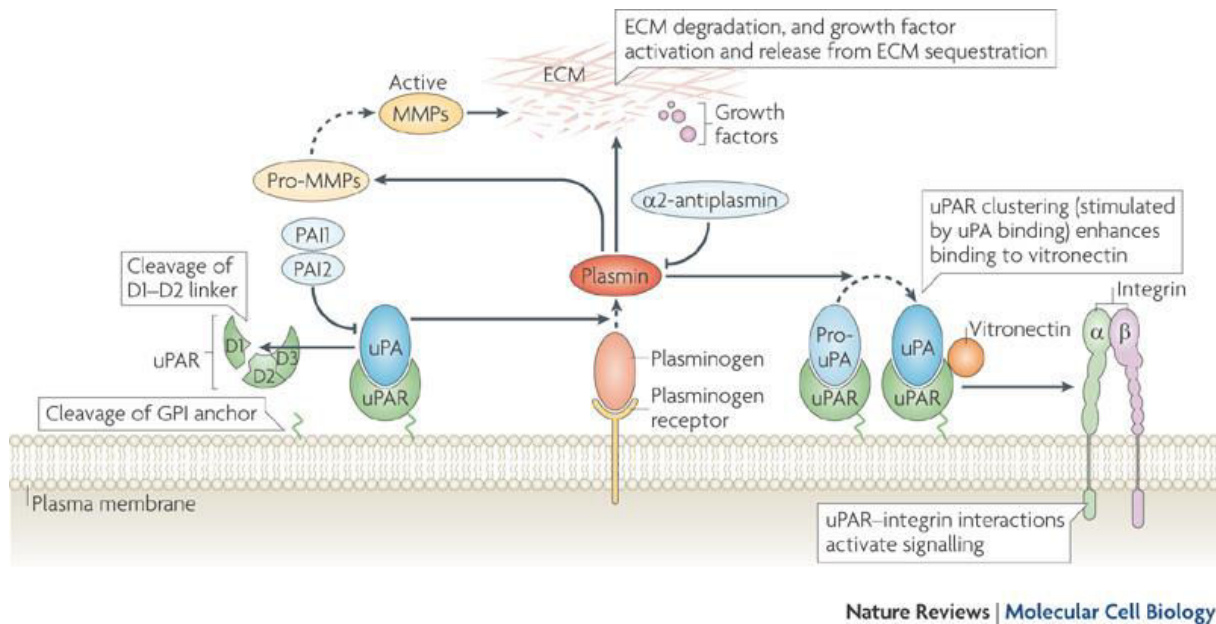
- uPAR<sup>-/-</sup>

Le modèle de souris uPAR<sup>-/-</sup>, pour lequel le gène codant pour le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) a été inactivé, est le plus récent des modèles de sclérodémie publiés. Le récepteur uPAR intervient dans un grand nombre de processus cellulaires comme la différenciation, la prolifération, la migration et l'adhésion. Mais il joue surtout un rôle central dans le système fibrinolytique et dans le remodelage tissulaire. Une fois activé par son ligand uPA, le complexe ligand-récepteur active la conversion du plasminogène en plasmine ce qui déclenche la cascade fibrinolytique plasmine-dépendante (activation des métalloprotéases, dégradation de la matrice extracellulaire) (figure 11). L'étape de fibrinolyse est essentielle au cours de la cicatrisation car elle favorise, entre autre, la migration et la prolifération des fibroblastes impliqués dans le remodelage tissulaire ainsi que des cellules endothéliales impliquées dans l'angiogenèse. La formation du tissu de granulation et la ré-épithélialisation dépendent étroitement de l'efficacité de l'étape de fibrinolyse.

Il a été montré que chez les patients SSc, une inactivation du complexe uPA/uPAR était associée à une conversion accrue des fibroblastes en myofibroblastes et à une dérégulation de la formation de matrice extracellulaire, les deux composantes principalement responsables de la survenue de fibrose. L'inactivation du gène codant pour uPAR chez la souris a produit un modèle de SSc qui présente au niveau cutané une fibrose, une surexpression de myofibroblastes, une diminution de la densité capillaire associée et une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales. Le modèle uPAR<sup>-/-</sup> dispose

d'importantes ressemblances avec la SSc au niveau cutané. Etant donné l'implication du récepteur uPAR dans la cicatrisation, c'est vers ce modèle que nous nous sommes tournés pour notre étude expérimentale de cicatrisation d'ulcère.

Figure 11. Implication du complexe uPA/uPAR dans la fibrinolyse



(Smith & Marshall, 2010)

### LES MODELES CHIMIQUEMENT INDUITS

- Le modèle bléomycine

Le recours aux modèles chimiquement induits est une alternative intéressante car ils sont souvent simples à reproduire et peu coûteux. Le plus utilisé et le plus largement décrit est le modèle de fibrose induit par injections sous-cutanées de bléomycine, un anti-cancéreux connu pour provoquer une fibrose pulmonaire chez les patients traités. Les souris ainsi préparées développent une fibrose cutanée localisée au niveau de la zone d'injection qui persiste plusieurs semaines après l'induction. Cette fibrose est accompagnée

d'une importante réaction inflammatoire, d'une surexpression de la voie du TGF- $\beta$ , ainsi que d'une production d'anticorps spécifiques de la SSc. Le modèle bléomycine ne produit pas d'atteinte vasculaire et il s'agit surtout d'un modèle utilisé pour évaluer des molécules anti-fibrotiques ou anti-inflammatoires. Malheureusement, les résultats sur modèle bléomycine sont souvent surestimés par rapport aux effets réellement obtenus lors du développement clinique chez les patients SSc.

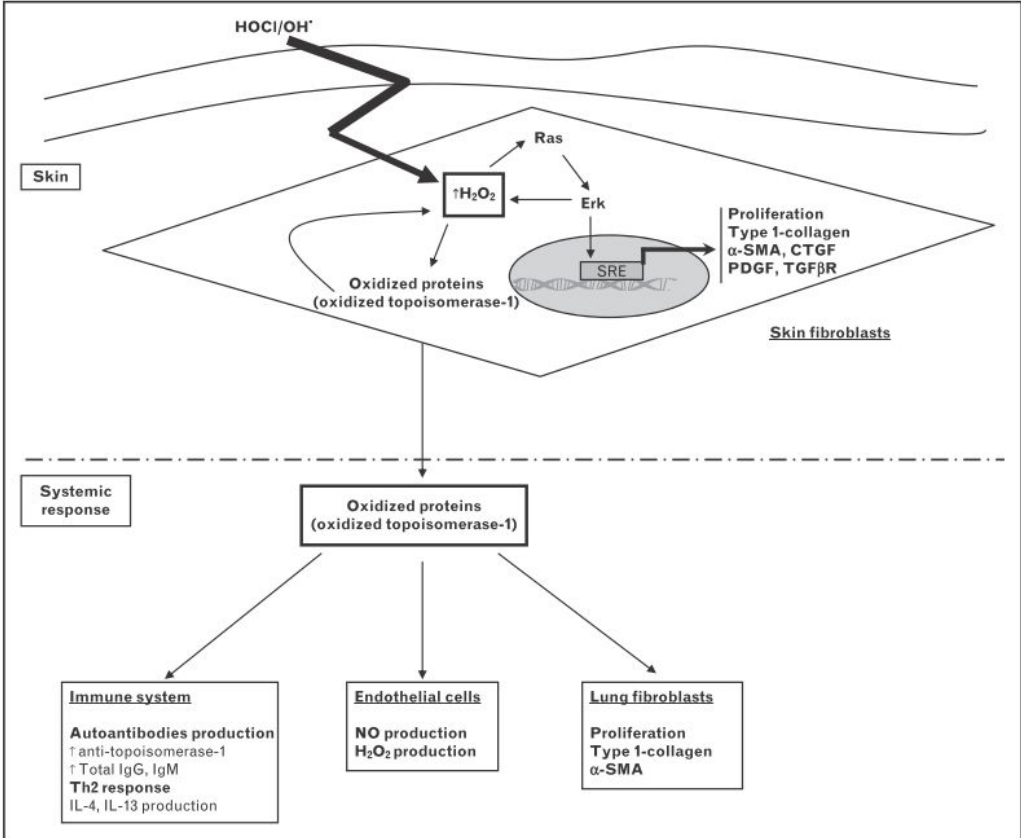
- Le modèle HOCl

Le modèle le plus récent a été publié par l'équipe du Professeur Batteux en 2009. Faisant le constat que le stress oxydant et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont clairement impliqués dans la pathogénèse de la sclérodermie, le Pr. Batteux a proposé un modèle d'induction chimique par un donneur de ROS. Après plusieurs tentatives avec différents donneurs ( $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), ils ont finalement réussi à produire un modèle de SSc en injectant en intradermique de l'acide hypochloreux (HOCl) pendant 6 semaines. Le modèle présente une fibrose pulmonaire et une fibrose cutanée localisée au niveau du point d'injection, associée à la production d'anticorps de type anti-antitopoisomérase et à une réaction inflammatoire précoce. Selon l'auteur, les injections répétées de HOCl conduisent à une production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les fibroblastes et à un stress oxydant majeur (figure 12).

En 2015, l'équipe du Dr. Guilpain a réussi à démontrer les effets anti-oxydant, anti-fibrotique et immuno-modulateur de certaines cellules souches mésenchymateuses sur le modèle HOCl (Maria et al., 2015). Tandis que l'équipe du Pr. Batteux exploitait le modèle HOCl pour démontrer que l'utilisation de pantéthine, une forme dimérique de vitamine B<sub>5</sub>, était susceptible de limiter les effets délétères des macroparticules relarguées par les cellules endothéliales et les fibroblastes lors d'un stress oxydatif (Kavian et al., 2015). Etant

donné les perspectives que proposaient ce nouveau modèle chimiquement induit, nous avons décidé de le reproduire afin de disposer d'un second modèle d'étude la cicatrisation des ulcères dans le contexte de la sclérodémie.

Figure 12. Modèle de SSc induit par des injections intradermique de HOCl



(Batteux et al., 2011)



## 2. De la cicatrisation et des modèles d'ulcères

(Davidson, 1998; Eming, Martin, & Tomic-Canic, 2014; Galiano, Michaels, V, Dobryansky, Levine, & Gurtner, 2004; Singer & Clark, 1999)

La première fonction de la peau est de servir de barrière contre l'environnement. Toute agression de ce tissu protecteur peut conduire à une affection parfois très grave. Le phénomène de cicatrisation fait appel à des mécanismes complexes qui s'activent dès que l'intégrité d'un tissu est touchée. Les étapes de la cicatrisation sont largement connues et bien décrites, elle se décompose chez l'homme en quatre moments: 1- l'hémostase ; 2- l'inflammation ; 3- la phase de prolifération ; et 4- la phase de remodelage.

- L'hémostase

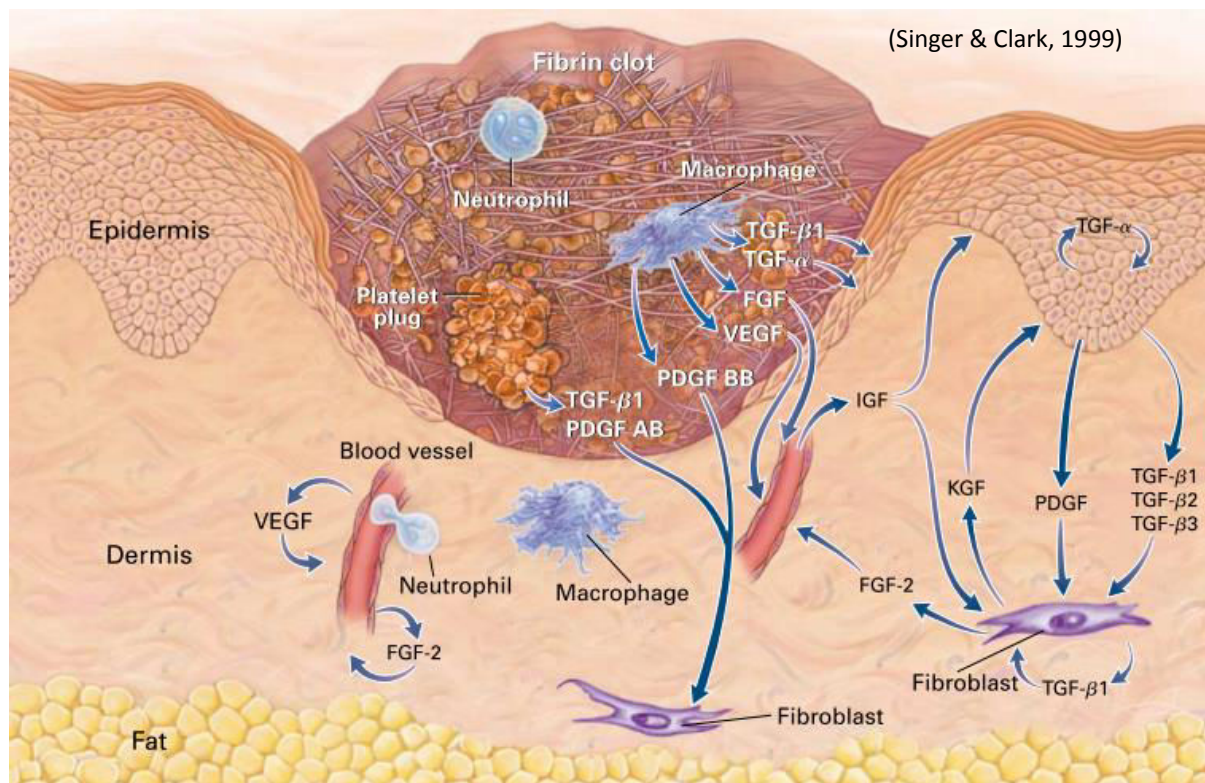
Les plaquettes jouent un rôle central dans la première phase de la cicatrisation. Lors d'une lésion tissulaire certaines molécules de collagène se retrouvent exposées à la circulation sanguine et entrent en contact avec les plaquettes circulantes. Cette interaction conduit à une activation des plaquettes qui vont adhérer à l'endothélium lésé et s'agréger autour. C'est au cours de cette phase de coagulation que les fibres de fibrines sont converties en fibrinogène et qu'un caillot fibrino-plaquettaire peut se former. L'activation plaquettaire induit également la migration et l'adhésion des acteurs cellulaires de la phase inflammatoire.

- L'inflammation

La phase inflammatoire est initiée par l'arrivée des leucocytes neutrophiles et des monocytes au cœur de la lésion. Les neutrophiles adhèrent rapidement à l'endothélium vasculaire et migrent ensuite dans l'espace intercellulaire où ils joueront un rôle à la fois dans le contrôle du développement infectieux et dans le débridement de la plaie. Les

monocytes, quant à eux, vont se convertir en macrophages et débiter leur travail de nettoyage des bactéries, des déchets tissulaires et cellulaires. Les macrophages libèrent ensuite des médiateurs et des cytokines et participent également au recrutement d'autres cellules anti-inflammatoires comme les neutrophiles, les mastocytes et les lymphocytes T. Au cours de la dernière étape de l'inflammation, les neutrophiles libèrent de nombreux facteurs de croissance (TGFs, FGF, VEGF, PDGFs, IGF, KGF) qui vont favoriser la mise en place de la phase de prolifération (figure 13).

Figure 13. La phase inflammatoire lors de la cicatrisation cutanée

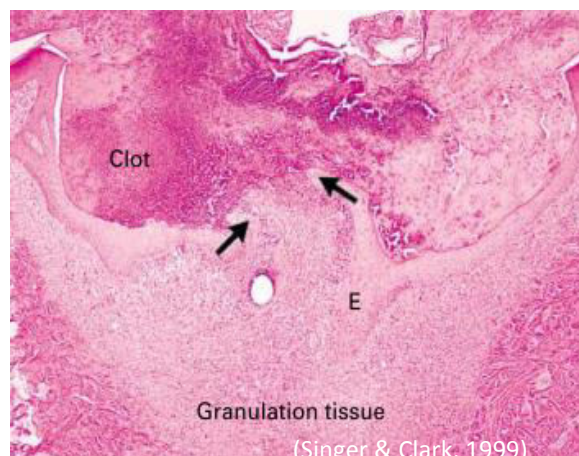


- La phase de prolifération ou de production

La phase de prolifération met en jeu de nombreux acteurs cellulaires et tissulaires. Une fois l'étape inflammatoire terminée, les macrophages se mettent à libérer d'importantes quantités de protéases, d'inhibiteurs de protéases et de facteurs de croissance qui vont initier la prolifération cellulaire et la synthèse protéique. Le tissu conjonctif sous-jacent se

transforme et fait apparaître des granulations roses en surface du derme qui correspondent aux nombreux capillaires qui l'envahissent. Le tissu prend alors le nom de tissu de granulation (figure 14). L'angiogenèse s'intensifie sous l'influence du VEGF et du FGF libérés par les cellules endothéliales lésées. Les fibroblastes prolifèrent, colonisent la plaie et se mettent à sécréter les constituants de la matrice extracellulaire et surtout d'importantes quantités de collagène. Une fois le caillot complètement colonisé, certains fibroblastes vont se convertir en myofibroblastes, une différenciation qui va leur permettre de se contracter facilement. Grâce à cette contractilité, le tissu de granulation favorise le rapprochement des berges de la plaie ce qui va initier le phénomène de réépithélialisation (figure 15).

Figure 14. Tissu de granulation sur un ulcère digital au niveau de la pulpe à gauche, et sur un échantillon de peau de cochon coloré à l'hématoxyline et l'éosine à droite (E : cellules de l'épiderme)



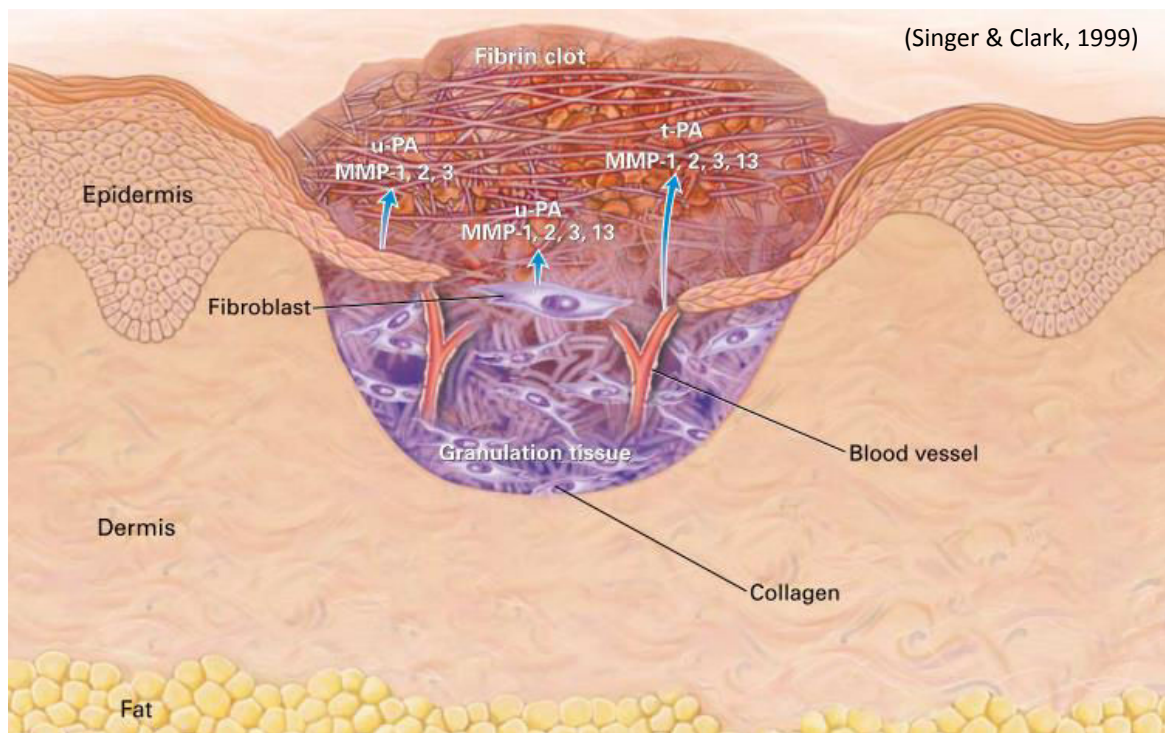
Au cours de la réépithélialisation, des cellules souches cutanées migrent et prolifèrent jusqu'à recouvrir complètement la surface mise à nu. Pour accéder facilement au tissu à reconstruire, les cellules souches produisent des enzymes protéolytiques : activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) ou de type urokinase (uPA) ainsi que des métalloprotéinases matricielles (MMP). Ces enzymes vont favoriser la dégradation de la matrice extracellulaire, étape essentielle au remodelage tissulaire. Une fois la plaie recouverte d'une

monocouche de kératinocytes, les cellules cessent de migrer et la reconstitution de l'épithélium se fait par mitose.

- Le remodelage

Le remodelage dépend à la fois de la dégradation et de la production de matrice extracellulaire. La phase peut durer de quelques semaines à plusieurs mois avant de donner une cicatrice définitive

Figure 15. La phase de prolifération lors de la cicatrisation cutanée



## *LES MODELES ANIMAUX DE CICATRISATION*

La cicatrisation est un mécanisme complexe qui diffère d'une espèce animale à une autre. Avoir recours à un modèle animal pour étudier la cicatrisation de l'homme pourrait sembler inapproprié tant les différences sont grandes entre les animaux. Pourtant, avant de pouvoir tester une nouvelle thérapie sur l'homme, il est indispensable qu'un maximum de preuves d'efficacité soit démontré au préalable sur un modèle animal adapté. Le choix du modèle est compliqué et dépend souvent de raisons pratiques et économiques plutôt que scientifiques.

Nous présentons ici une liste non exhaustive de modèles de lésions régulièrement utilisés dans les études de cicatrisation cutanée. Certains de ces modèles sont dits «aigus» tandis que d'autres sont des modèles «chroniques». La frontière entre l'une et l'autre de ces catégories est difficile à dessiner car la notion de « chronicité » n'est pas forcément entendue de la même manière par tout le monde. En effet, un ulcère peut être qualifié de chronique parce qu'il s'installe au long cours sur une pathologie chronique (e.g., ulcère veineux du patient diabétique) ou parce que la cicatrisation est si fortement altérée et ralentie que la plaie ne parvient jamais à cicatriser totalement. Parfois la plaie se «chronicise» par les deux mécanismes en même temps. Pourtant la distinction entre «aigu» et «chronique» est d'importance puisque comme nous le savons aujourd'hui, les mécanismes en jeu ne sont pas exactement les mêmes. La plaie «aigue» est prise en charge par l'organisme comme une lésion post-traumatique d'induction rapide et fait intervenir des mécanismes d'urgence (hémostase, réaction inflammatoire) et des mécanismes plus tardif (remodelage). Au contraire, la plaie « chronique » est d'installation lente et dépend de facteurs anatomiques et physiopathologiques associés à la pathologie sous-jacente, parfois bien plus difficiles à prendre en compte dans un modèle.

- Le modèle aigu par incision

Parmi les modèles de plaies aiguës, le plus couramment utilisé est probablement le modèle par incision. Une lésion cutanée est simplement réalisée à l'aide d'une lame tranchante, généralement un scalpel, qui sépare les différentes couches cellulaires plus ou moins profondément. La longueur de l'incision peut être parfaitement définie en revanche la taille de l'ouverture peut varier selon le modèle animal choisi. En effet, chez l'homme ou les chez le cochon, le tissu cutané étant fermement attaché aux structures sous-cutanées, l'incision produira une lésion étroite. Au contraire, chez le rongeur la peau est totalement libre des structures profondes, ce qui produira une lésion plus large. Les modèles par incision sont préférés pour étudier les propriétés mécaniques de cicatrisation et pour évaluer des pansements ou des ligatures par exemples.

- Le modèle aigu par excision

La principale alternative à l'incision est le modèle par excision. Cette fois la lésion est réalisée en prélevant un morceau de tissu, généralement à l'aide d'un punch à biopsie. La lésion est le plus souvent circulaire ou elliptique et le diamètre peut aussi être contrôlé. Ici encore la surface d'ouverture dépendra du modèle animal choisi et de la fermeté de la peau. L'excision peut concerner la totalité des couches de la peau « full-thickness » ou seulement certaines couches « split thickness ». Dans le premier cas, la cicatrisation se fera à la fois par les berges et par le fond. Il s'agit du modèle le plus courant pour suivre la vitesse de cicatrisation et pour les études histologiques. Lorsqu'une excision complète est réalisée sur un rongeur, un mécanisme de cicatrisation par contraction mécanique se met en place rapidement. Il s'agit probablement d'un mécanisme adaptatif élaboré par les rongeurs pour réduire les risques d'infections et accélérer la cicatrisation chez ces animaux régulièrement

confrontés aux griffures et aux morsures profondes. Ce phénomène, considéré comme le mécanisme principal de cicatrisation, n'existe pas chez l'homme et constitue un biais majeur pour transposer à l'homme les résultats expérimentaux obtenus chez la souris. Pour éviter ce problème, certaines équipes apposent une attelle souple et résistante autour de la lésion qu'ils fixent par des points de sutures. Grâce à cette attelle, le phénomène de contraction est limité sans entraver la réponse inflammatoire ni le développement du tissu de granulation (Windsor, Eisenberg, Gordon-Thomson, & Moore, 2009). En revanche, ce modèle présente un niveau de risque infectieux plus important que le modèle par incision puisqu'il crée une brèche plus profonde.

Une version alternative au modèle d'excision totale est le modèle par excision partielle à l'aide d'un dermatome. L'objectif de ce modèle est de prélever un échantillon d'une épaisseur voulue, souvent de 100 $\mu$ m à 1500 $\mu$ m, tout en laissant une partie du derme intacte. C'est le modèle type de l'écorchure du genou. Difficile à réaliser sur la souris, car la peau de l'animal est trop fine, le modèle est surtout pratiqué chez le cochon où il permet de faire des expériences de greffe de peau par exemple.

La chambre de cicatrisation est aussi un modèle par excision mais celui-ci est agrémenté d'un dispositif particulier permettant le suivi microscopique de la réorganisation tissulaire. Ce modèle, historiquement mis au point sur oreille de lapin, a été rapidement adapté à la souris pour étudier l'angiogenèse et la vascularisation des plaies.

- La brûlure aigue

Les modèles par brûlures sont très différents des modèles par excision ou incision. Ici, une lésion de la peau est provoquée par un agent chimique ou par la température (froide ou chaude), ou encore par un rayonnement. Le choix de l'agent agressif est essentiel car il

conditionne la réponse et les lésions peuvent être très variées d'un modèle à l'autre. La présence de nécrose est une caractéristique souvent importante dans ce type de modèle.

- Les modèles chroniques

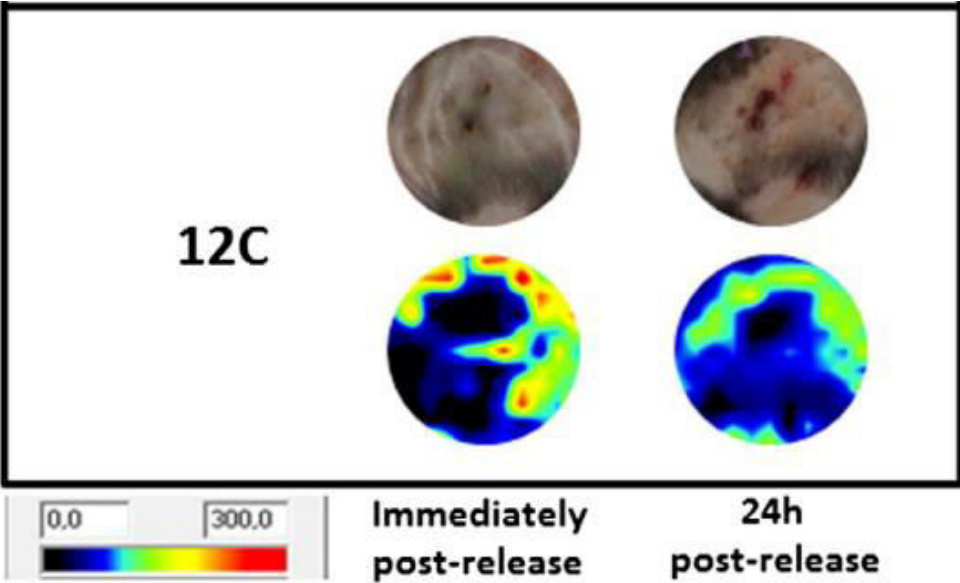
La génération d'une plaie chronique sur un modèle animal est une pratique difficile qui requiert généralement la mise au point de techniques lourdes et complexes. Les modèles par ischémies tissulaires sont les plus répandues dans ce domaine. On distingue les modèles par ischémie chirurgicale, les modèles par pression et les modèles par radiation. Le modèle le plus courant est pratiqué sur oreille de lapin. Il consiste en la réalisation d'une plaie par excision totale dans le creux de l'oreille suivie d'une ligature d'une ou plusieurs artères afférentes pour réduire la perfusion du tissu environnant la plaie. Le modèle est dit «chronique» en raison du retard important de cicatrisation associé à l'ischémie provoquée.

Une alternative de plus en plus étudiée est le modèle de plaie par compression tissulaire, qui s'inspire des situations réelles de survenue des ulcères de pression comme les escarres. Plusieurs variantes du modèle ont été proposées dont une nous semble particulièrement intéressante. En insérant une plaque métallique sous la peau de l'animal puis en appliquant une pression homogène à l'aide d'un aimant puissant, Peirce et al ont réussi à produire un modèle d'ulcère sans faire d'excision (Peirce, Skalak, & Rodeheaver, 2000). En réalité le modèle de Peirce est un modèle d'ischémie-reperfusion puisque la compression doit être appliquée séquentiellement avec des périodes de reperfusion intermédiaires. La survenue et surtout l'intensité de l'ulcère est corrélée à la fois à la durée respective des séquences dans un cycle ischémie-reperfusion et du nombre de cycles. Dans un article publié en 2013, l'équipe du Dr. Sigaud-Roussel a montré qu'une compression de 4 heures avec un aimant de 11kPa était susceptible de produire au bout de 24 heures une ischémie sur plus de 60%



de la surface comprimée et une surface de lésion d'environ 10% de cette même surface (figure 16) (Nguyen-Tu et al., 2013).

Figure 16. Photographies de l'ulcération et mesures de la perfusion sanguine par Laser Doppler Imager au niveau de la zone comprimée, juste après le protocole et 24 heures après. (adapté de (Nguyen-Tu et al., 2013))



## **IV. Développement de l'iontophorèse thérapeutique dans les atteintes microcirculatoire de la sclérodemie systémique : 6 ans de recherche à l'université Grenoble Alpes**

### **1. De l'iontophorèse**

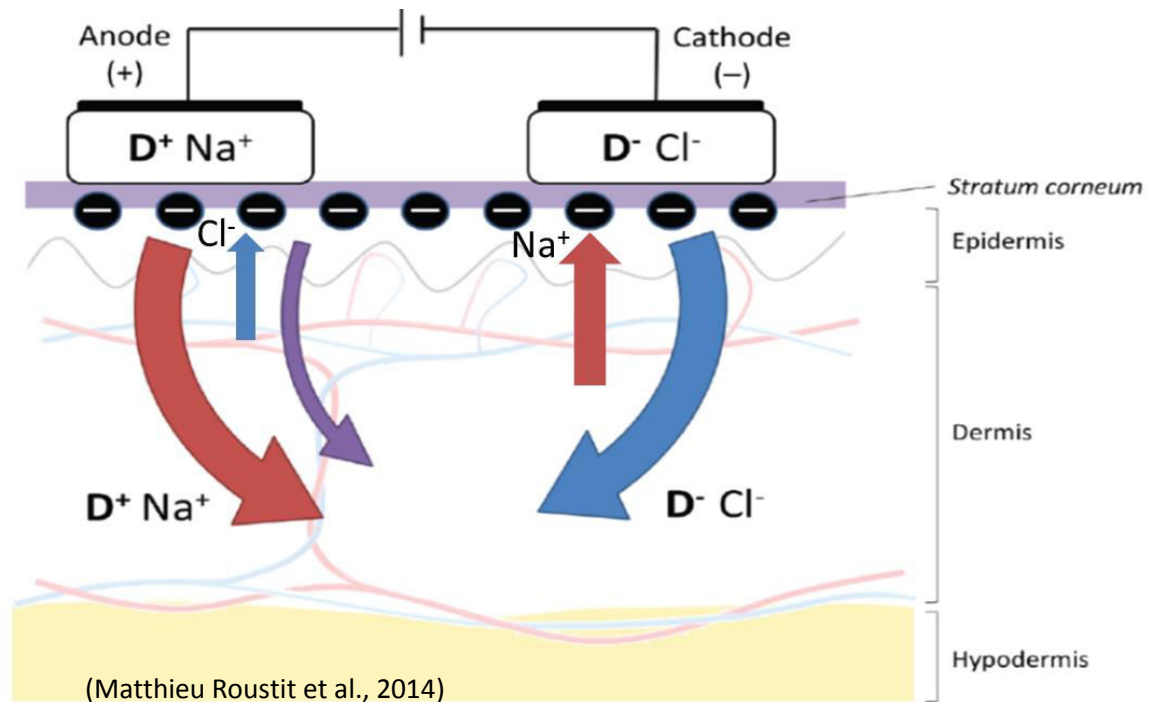
(Kalia, Naik, Garrison, & Guy, 2004; Matthieu Roustit, Blaise, & Cracowski, 2014)

L'iontophorèse, comme méthode d'administration topique, a d'abord été développée pour réaliser des tests de réactivité vasculaire dans les études d'exploration physiologique des fonctions microcirculatoires. Par l'application d'un courant de faible intensité entre deux électrodes disposées à la surface de la peau, il est possible de transporter de manière active des molécules dans le derme sans induire de lésion (figure 17). Le test physiologique le plus classique utilisant l'iontophorèse est l'évaluation de la fonction endothéliale au niveau des microvaisseaux cutanés par administration respective d'acétylcholine (Ach), qui produit une vasodilatation endothélium-dépendante et de nitroprussiate de sodium (SNP), qui produit une vasodilatation endothélium-indépendante.

Deux mécanismes différents sont à l'œuvre dans le procédé iontophorétique : l'électroré pulsion d'une part et l'électroosmose d'autre part. L'électroré pulsion est un phénomène électrophysique basé sur la répulsion des charges de même polarité. Toute molécule chargée positivement et positionnée au contact d'une anode est systématiquement repoussée par cette dernière. Il en va de même pour toute molécule chargée négativement et positionnée au contact d'une cathode. Lorsqu'une solution de molécule chargée est positionnée entre la peau et une électrode de même charge, l'électroré pulsion va provoquer une migration de ces molécules vers le derme. La force

d'électrorépulsion sera alors suffisamment forte pour que la molécule traverse la couche de *Stratum corneum* puis celle de l'épiderme et pénètre dans le derme. Ce mécanisme s'applique à toutes les molécules ou atomes ionisés présentes dans la solution.

Figure 17. Représentation schématique du transport de médicaments par voie iontophorétique à pH physiologique



*Les molécules chargées positivement ( $D^+$ ) se déplacent depuis l'anode vers le derme (flèche rouge) tandis que les drogues chargées négativement se déplacent depuis la cathode vers le derme (flèche bleue). Le flux electro-osmotique est représenté par la flèche violette.*

L'électroosmose est un mécanisme moins intuitif. De manière simplifiée, il peut être défini comme la création d'un flux de solvant dans le sens de l'anode vers la cathode sous l'effet d'un flux de courant. L'application d'un courant entre les deux électrodes de iontophorèse conduit à un déséquilibre électrochimique de part et d'autre de la peau au niveau des électrodes. L'électroneutralité dans chaque électrode est rétablie grâce à une augmentation de la perméabilité cutanée aux ions endogènes de charges opposées (contre-ion) qui traversent la peau dans le sens du derme vers l'électrode. On observe ainsi un

passage accrue des cations  $\text{Na}^+$  au niveau de la cathode et des anions  $\text{Cl}^-$  au niveau de l'anode. Toutefois en raison de la polarité négative de la peau à pH neutre, les anions  $\text{Cl}^-$  sont partiellement bloqués dans leur remonté vers la anode par une barrière de charges négatives. Le flux des anions vers l'anode est donc moins important que celui des cations  $\text{Na}^+$  vers la cathode. Cette différence d'intensité entre les deux flux produit un gradient en faveur du flux cationique  $\text{Na}^+$  capable d'entraîner avec lui les molécules d'eau de l'anode vers la cathode. Ce flux de volume est appelé flux électrosmotique, il est suffisamment puissant pour attirer des molécules chargées positivement mais aussi des molécules neutres présentes au niveau de l'anode à travers le derme.

Les forces en jeu dans la migration des médicaments par voie iontophorétique dépendent du pH cutané et de la polarité de l'électrode. A pH physiologique, toutes les drogues chargées positivement au niveau de l'anode migrent vers le derme sous l'effet de l'électroréulsion et du flux électrosmotique, de même que les drogues neutres migrent aussi mais uniquement sous l'effet du flux électrosmotique. En revanche au niveau de la cathode, il n'existe pas de flux électrosmotique à pH physiologique et par conséquent seules les drogues chargées négativement migrent vers le derme. Connaissant le potentiel d'ionisation de la peau, situé entre 4 et 4,5, il est facile de connaître le sens du flux électrosmotique en fonction du pH appliqué à la peau. En effet, le pH cutané est susceptible de varier en fonction du pH de la solution avec laquelle il entre en contact. En cas de solution acide, de pH inférieur à 4, la charge de la peau s'inverse, d'où une inversion du flux électrosmotique. Dans cette situation, ce ne sont plus les drogues chargées positivement qui profitent du flux électrosmotique mais celles chargées négativement. De même, seules les drogues neutres présentes au niveau de la cathode pourront migrer vers le derme.

## *FACTEURS INFLUENÇANT LE TRANSPORT IONTOPHORETIQUE*

Plusieurs facteurs concourent au passage iontophorétique d'une molécule dans le derme. Ces facteurs peuvent être classés en trois catégories distinctes: 1) ceux qui dépendent des propriétés physico-chimiques de la molécule concernée; 2) ceux qui dépendent des paramètres électriques du dispositif; et 3) ceux qui dépendent des propriétés biologiques et électriques de la peau.

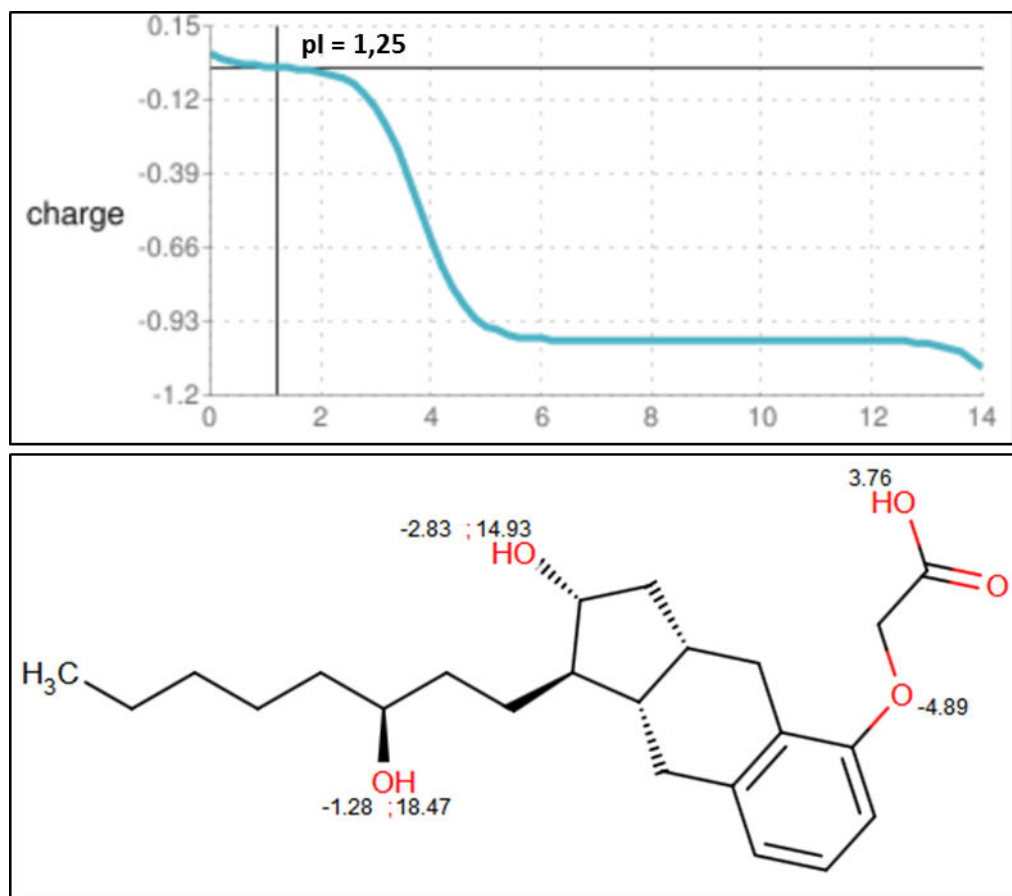
- Des propriétés moléculaires

La charge de la molécule est la première des propriétés qui influence le passage iontophorétique. Comme expliquée plus haut, le phénomène d'électroré pulsion dépend de la polarité de la molécule et conditionne le choix du sens de l'iontophorèse. On parle de sens cathodale lorsque la drogue, généralement chargée négativement, est déposée au niveau de la cathode; et de sens anodale lorsque la drogue, généralement chargée positivement, est déposée au niveau de l'anode. L'ionisation d'une molécule dépend du pKa de chacune de ses fonctions acides et basiques et dépend donc du pH auquel elle est exposée. Des logiciels permettent de simuler la charge globale d'une molécule en fonction du pH. Il est alors possible d'estimer le point isoélectrique d'une molécule, c'est-à-dire le point où l'ensemble des charges internes s'annulent, pour définir le sens de l'iontophorèse en fonction du pH de la solution. Si l'on prend l'exemple du treprostinil, un analogue de la prostacycline, il est possible de tracer le profil électrique de la molécule en fonction du pH de la solution dans laquelle il est solubilisé (figure 18). Pour qu'une molécule ait un bon profil de transport iontophorétique, il faut choisir un pH pour lequel la solution présente un haut pourcentage de molécules sous formes ionisées. Lorsqu'une molécule ionisée est soumise à un courant électrique, celle-ci devient un transporteur de charge, c'est-à-dire qu'elle va porter une

partie du courant circulant. Plus le pourcentage de ionisation de la solution est élevé plus la part de molécules qui transportent la charge sera importante. La fraction de la charge totale transportée par la molécule d'intérêt est appelée «nombre de transport». Ce nombre de transport dépend à la fois de la fraction ionisée de la molécule mais aussi de la présence dans la solution d'autres ions de charges équivalentes. En effet, les solutions tampons utilisées pour solubiliser et stabiliser la molécule apportent généralement des ions, notamment du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$ , qui sont eux aussi susceptibles de transporter la charge. Les ions de même charge que la molécule, appelé co-ions, vont ainsi entrer en compétition avec celle-ci et auront leur propre nombre de transport. Comme ils sont souvent de plus petite taille et de meilleure mobilité que la molécule, leur présence fait diminuer significativement le nombre de transport de la molécule. Ce mécanisme, appelé compétition ionique, est difficile à limiter car l'éviction des co-ions est souvent impossible. En revanche, pour les molécules neutres, qui ont un nombre de transport nul, la présence de co-ions permet d'augmenter le flux électroosmotique et peut favoriser leur transport. Lorsqu'il n'y a pas ou peu de fraction ionisée, la molécule est considérée comme neutre. Sa migration iontophorétique ne peut se faire que dans le sens du flux électroosmotique, soit le sens cathodal à pH cutané ou à pH physiologique.

Il convient de préciser que dans les cas où le pH de la solution est trop acide, la pénétration des ions hydrogènes est susceptible d'induire une sur-activation des fibres nociceptives de type C produisant ainsi un « reflex axonal » responsable d'une vasodilatation brève et très intense. Ce phénomène peut être gênant pour les études avec des vasodilatateurs.

Figure 18. Profil d'ionisation de la molécule de treprostnil en fonction du pH (haut), établi à partir des pKa des fonctions acides de la molécule (bas)



Le treprostnil présente un point isoélectrique mesuré à 1.25, c'est-à-dire que pour un pH de 1.25, 100% du treprostnil est sous forme neutre. Au-delà de ce point, le pourcentage d'ionisation augmente progressivement. Pour un pH compris entre 5 et 13.5, 100% du treprostnil possède une charge négative. Pour un pH supérieur à 13.5, certaines molécules commencent à présenter deux charges négatives, ce qui explique que la courbe continue à descendre. Face à ce profil, il convient de choisir un pH supérieur à 5.

Outre le pourcentage de ionisation, il est admis que pour être facilement transportée par voie iontophorétique une molécule doit être : en concentration importantes, de faible poids moléculaire, et n'être ni trop hydrophile ni trop lipophile. Dans la réalité il est très difficile, voire même impossible, de prévoir qu'elle sera le profil iontophorétique d'une

molécule avant de l'avoir testée. Concernant la concentration, il a certes été démontré que dans certaines conditions une augmentation de concentration augmentait le transport, mais plusieurs cas limites ont été observés. En effet, une forte concentration de molécules peut entraîner une saturation de la couche de *Stratum corneum* et limiter ainsi la pénétration des molécules dans le derme. Il existe aussi des phénomènes de saturation de l'effet pharmacologique appelé « effet plateau », qui n'est autre que la conséquence d'une saturation des récepteurs cibles. Concernant le poids moléculaire et le coefficient de partage eau/huile, ce sont deux paramètres qui influencent la perméabilité de la molécule à travers la peau et donc son transport iontophorétique. Mais leur effet relatif est souvent trop complexe pour permettre une prédiction du potentiel iontophorétique d'une molécule à partir de ces paramètres.

- Des propriétés électriques

La polarité de l'électrode active, celle qui reçoit la molécule d'intérêt, et la quantité de courant sont les deux paramètres électriques les plus importants dans le transport iontophorétique. La polarité doit être la même que celle de la molécule, comme expliqué plus haut. Le choix est simple puisqu'il n'existe que deux modalités, anodale ou cathodale, et qu'il dépend uniquement de la molécule. Concernant la quantité de courant, celle-ci est fonction à la fois de l'intensité et de la durée d'application du courant :  $Q = I \times t$ , exprimée en Coulomb (ou en A.s). Comme il existe une linéarité entre le flux iontophorétique et la quantité de courant, il est possible de faire varier soit l'intensité, soit la durée (ou les deux en même temps) pour augmenter la dose transportée dans le derme. En théorie, il n'existe pas de limite de durée d'application. En revanche il existe un seuil d'intensité, ou plus précisément un seuil de densité d'intensité, c'est-à-dire d'intensité par unité de surface de



peau. Ce seuil, fixé à  $500\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , est considéré comme la limite tolérable. Au-delà il y a un risque important d'irritation voire de brûlure cutanée. De plus, autour de 400 à  $500\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , il existe une réaction vasculaire non spécifique de type « axone réflexe » (voir plus haut). Il convient de choisir l'intensité selon la surface de l'électrode. Une fois la polarité et la quantité de charge définies, il reste à choisir entre une séquence de courant continue ou pulsée. Depuis plusieurs années, un débat demeure sur le mode de courant optimal pour l'iontophorèse. Est-il plus efficace de délivrer la quantité de charge totale en une seule séquence ou faut-il préférer un rythme pulsé, c'est-à-dire une alternance de périodes avec et sans courant ? Cette question a fait l'objet d'une étude publiée que nous présentons dans la seconde partie de ce document.

- Des propriétés cutanées

Bien que la peau soit une barrière physique au passage de substances exogènes dans l'organisme, l'iontophorèse permet une diffusion active de molécules directement dans le derme. Le principal facteur limitant à ce passage est le franchissement du *Stratum corneum*, une couche externe de cellules d'à peine quelques dizaines de micromètres dont l'agencement et la composition empêchent la pénétration des molécules extérieures mais également la sortie de substances endogènes, notamment d'eau corporelle. Le transport de molécules par voie iontophorétique dépend étroitement de l'épaisseur du *Stratum corneum*, mais aussi de son intégrité et de son degré d'hydratation.

Les propriétés électriques de la peau, comme la polarité de surface ou encore l'impédance électrique cutanée conditionnent aussi le transport iontophorétique. A pH physiologique, la peau est chargée négativement ce qui limite le passage des molécules chargés négativement comme nous l'avons vu précédemment. De même la résistance

électrique cutanée, expression simplifiée de l'impédance, s'oppose au transport des charges et donc des molécules chargées à travers le derme. La résistance électrique cutanée correspond à la résistance du circuit électrique et comprend à la fois la résistance de la solution vectrice et celle de la peau. Pour mesurer l'effet de cette résistance, il suffit de normaliser la distance inter-électrode et de calculer la résistance à partir de la loi d'Ohm qui exprime la résistance en fonction de la tension appliquée et de l'intensité générée. Récemment, il a été montré qu'une résistance élevée s'oppose à l'effet vasodilatateur de l'Ach administrée par voie iontophorétique (Tecilazich et al., 2013).

## **2. Avantages et limites de l'iontophorèse thérapeutique dans la cicatrisation cutanée**

D'un point de vue générale, le principale avantage de l'iontophorèse thérapeutique est qu'elle peut être employée à la fois pour l'administration de molécules actives dans la circulation générale mais également comme thérapie locale. Quelques spécialités ont été commercialisées comme le Ionsys® (fentanyl) indiqué dans le traitement de la douleur post-opératoire mais actuellement retiré du marché, le Zecuity® (sumatriptan) indiqué dans le traitement des migraines, ou encore le Lidosite® (lidocaïne) indiqué dans le traitement local de douleurs procédurales. Le recours à la voie iontophorétique pour une administration systémique permet de contrôler le moment et le temps de délivrance du médicament, d'améliorer la biodisponibilité par rapport aux formes orales et de s'affranchir de la pose d'une voie veineuse ainsi que des complications associées (saignements, infiltrations, infections). Lorsqu'elle est employée pour un usage local, l'iontophorèse permet en plus de limiter la survenue d'effets indésirables en diminuant la concentration plasmatique des médicaments. Tous ces avantages confèrent à l'iontophorèse un fort potentiel comme solution alternative aux voies traditionnelles d'administration.

Une recherche bibliographique sur la base Medline avec l'équation ("iontophoresis"[MeSH Terms]) AND "drug delivery systems"[MeSH Terms]) sur les dix dernières années renvoie 184 articles. Le champ couvert par ces études est très varié. Nous retrouvons aussi bien des études sur le cancer, les infections, la migraine, l'arthrose, la cicatrisation, la douleur, les stratégies d'anesthésie ou encore sur des pathologies ophtalmiques. Un grand nombre d'expériences sont également menées pour évaluer et améliorer le passage de molécules de haut poids moléculaire et notamment de protéines comme l'insuline.

Dans la cicatrisation cutanée, le recours à la méthode iontophorétique pour administrer un traitement pharmacologique présente un double avantage évident. D'une part l'iontophorèse permet d'augmenter la concentration locale au niveau microvasculaire tout en limitant le passage systémique transdermique, comme expliqué ci-dessus. Et d'autre part, il s'agit d'une méthode qui fait intervenir du courant, or comme nous l'avons vu plus haut, le courant favorise la cicatrisation d'ulcère en particulier au cours de la phase précoce (inflammation et prolifération). L'obtention d'un effet synergique entre les propriétés pharmacologiques de la molécule administrée et le pouvoir cicatrisant du courant pourrait être un atout considérable dans la mise au point d'un traitement efficace contre les ulcères du patient sclérodermique.

Malgré son fort potentiel, l'iontophorèse présente quelques limites. D'une part, elle peut engendrer des effets indésirables comme des réactions cutanées (érythème, dépigmentation), des prurits, des paresthésies, des œdèmes ou encore des phénomènes de sensibilisation aux composants des électrodes. D'autre part, la méthode par iontophorèse ne permet pas un contrôle des paramètres pharmacocinétiques de la molécule ni de sa profondeur de pénétration dans le derme chez l'homme. Bien qu'il soit possible de suivre la

concentration dermique d'une molécule administrée par voie iontophorétique grâce à la technique de microdialyse, cette technique étant particulièrement contraignante et coûteuse, elle est rarement utilisée. Dans la majorité des études, les seules données de cinétiques sont obtenues *in vitro* sur un échantillon de peau isolée montée dans une cellule de Franz. En outre, l'une comme l'autre ces méthodes ne sont utiles que pour connaître le profil d'absorption et de diffusion à travers la peau d'une molécule mais en aucun cas elles ne donnent accès au profil de distribution et d'élimination de cette molécule dans les différentes couches cutanées. En particulier, il est difficile de savoir si la molécule administrée s'accumule dans une couche précise du derme.

### **3. L'iontophorèse thérapeutique dans la Sclérodermie Systémique : synthèse des études cliniques et précliniques menées par l'équipe depuis 2009.**

Depuis 2008 et l'extension d'indication du Tracleer (bosentan) à la prise en charge prophylactique des ulcères digitaux du patient sclérodermique, aucun nouveau traitement n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché ni en France, ni en Europe et ni aux Etats-Unis.

Depuis 2006, l'équipe du centre d'investigation clinique du CHU de Grenoble s'est spécialisée dans l'exploration microvasculaire des troubles trophiques et notamment ceux du patient sclérodermique. En l'espace de 7 ans, l'équipe du Pr. Cracowski a publié 9 articles cliniques et précliniques sur la mise au point d'une nouvelle stratégie de prise en charge des ulcères digitaux dans la sclérodermie (figure 19).

En 2009, le Dr. Roustit réalisait la première étude d'évaluation de la perfusion après administration d'un vasodilatateur puissant par iontophorèse, le nitroprussiate de sodium, chez des patients atteints de sclérodermie. Ses résultats démontrèrent qu'il était possible de

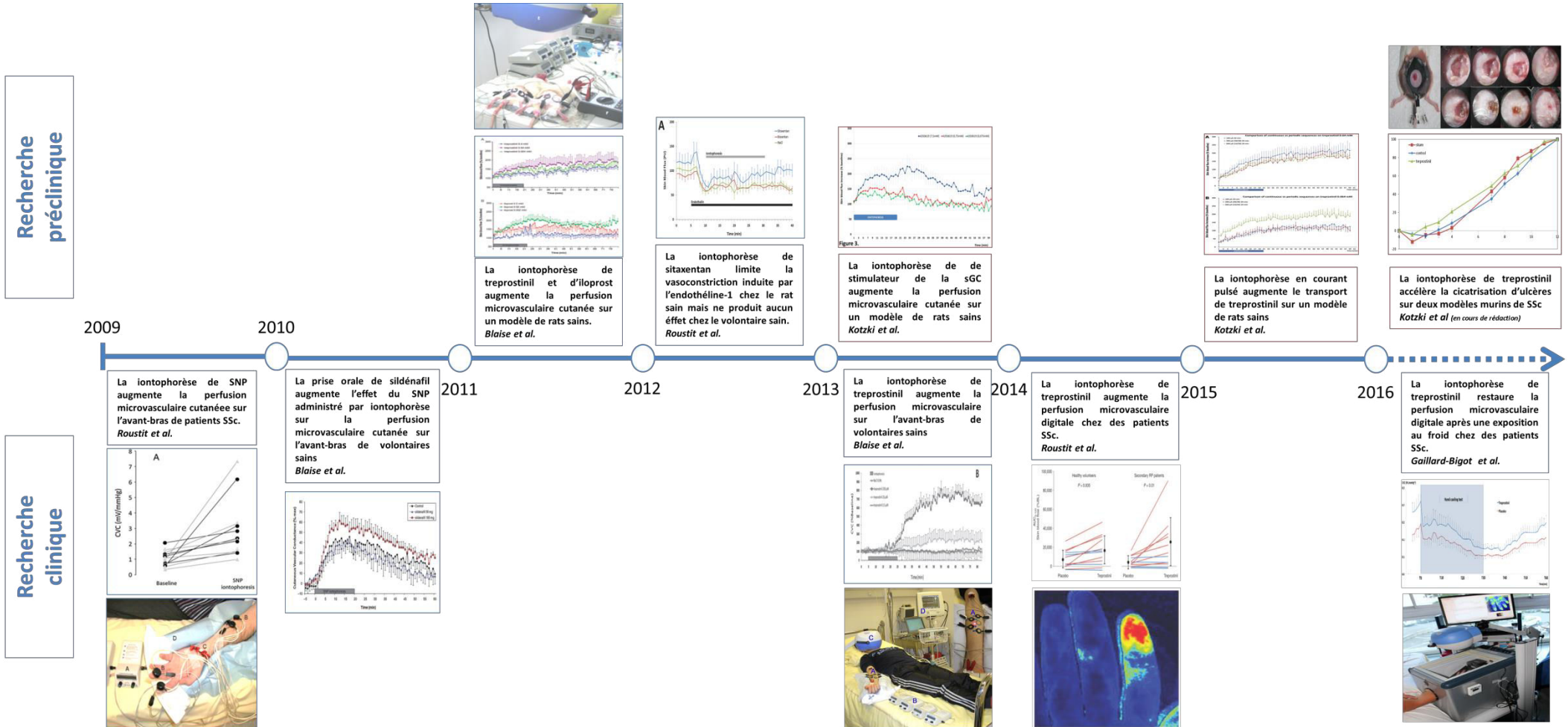
faire varier le flux microcirculatoire au niveau de l'avant-bras des patients et que ces variations pouvaient être mesurées par imagerie Laser Doppler. En 2010, le Dr. Blaise a montré dans une étude clinique sur volontaires sains que la prise orale d'un inhibiteur de la phosphodiesterase 5, le sildénafil, permettait de potentialiser l'effet du nitroprussiate de sodium administré par iontophorèse. Cette étude a été la première de l'équipe à mettre l'accent sur la volonté de trouver des traitements efficaces dans la prise en charge des troubles trophiques. En 2011, un modèle préclinique sur rat sain a été mis au point afin d'explorer la faisabilité de l'iontophorèse thérapeutique et de disposer d'un outil de screening systématique de molécules candidates. Les résultats ont notamment permis d'identifier le treprostnil comme étant un bon candidat pour l'iontophorèse thérapeutique cathodale. En effet, en administrant du treprostnil par iontophorèse, le Dr. Blaise a montré qu'il était possible d'augmenter de plus de 50% le flux sanguin cutané sur le train arrière de l'animal exposé. Une fois le modèle validé, plusieurs études ont été conduites pour identifier de nouveaux candidats. C'est ainsi qu'en 2012, le Dr. Roustit a testé l'iontophorèse de deux antagonistes du récepteur à l'endothéline-1, sur le modèle animal puis chez des volontaires sains. Malheureusement, malgré un effet pharmacologique observé chez l'animal aucun résultat significatif n'a été obtenu chez l'homme. En 2013, nous avons testé deux nouvelles classes thérapeutiques, les stimulateurs de la guanylate cyclase soluble et les agonistes du récepteurs IP non analogues de la prostacycline. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2013 dans « The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics » et est présenté dans la seconde partie de ce mémoire.

Parallèlement aux recherches de nouvelles classes de molécules, nous avons mené une étude ancillaire afin de comparer trois protocoles de iontophorèse cathodale de treprostnil, le protocole continu classique, un protocole pulsé de moyenne intensité et un protocole

pulsé de haute intensité. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2015 dans « European Journal of Pharmaceutical Sciences » et est également présenté dans la seconde partie de ce mémoire.

Les résultats obtenus avec l'iontophorèse de treprostinil sur le modèle animal ont permis le lancement d'un premier essai clinique sur volontaires sains. L'essai « INFLUX-IT » avait pour objectif d'étudier l'iontophorèse de treprostinil sur l'avant-bras des patients et de mesurer les variations de flux sanguin au niveau cutané. Cette étude pilote a montré que le treprostinil pouvait induire une vasodilatation puissante et soutenue lorsqu'il était administré par iontophorèse pendant 20 minutes. Cet essai a également permis d'éliminer l'iloprost du fait de survenue d'effet indésirable local (brûlure). Cet essai a été suivi en 2014 par une étude sur patients sclérodermiques : le projet « TIPPS ». Le but de cet essai était de faire simultanément une étude de pharmacocinétique sur volontaire sain et une étude de faisabilité de l'iontophorèse de treprostinil non plus sur avant-bras mais sur les doigts de patients sclérodermiques. Les résultats ont été à la hauteur des espérances puisque d'une part un passage systémique négligeable a été observé suite à l'administration iontophorétique de treprostinil et d'autre part les deux tiers des patients sclérodermiques ont montré une augmentation du flux sanguin digital induit par une iontophorèse unique de treprostinil. Enfin en 2016, les travaux de Florence Gaillard-Bigot ont permis de montrer que le treprostinil administré par iontophorèse restaure la perfusion cutanée digitale après une vasoconstriction provoquée par une exposition contrôlée au froid chez des patients SSc.

Figure 19. Les principales avancées menées par l'équipe dans le domaine de l'iontophorèse thérapeutique appliquée aux patients atteints de sclérodermie



## **PARTIE 2. LES ETUDES PRECLINIQUES**

### **I. Screening de molécules candidates à l'iontophorèse cutanée sur modèle de rat : dans la continuité de l'étude INFLUX-RAT**

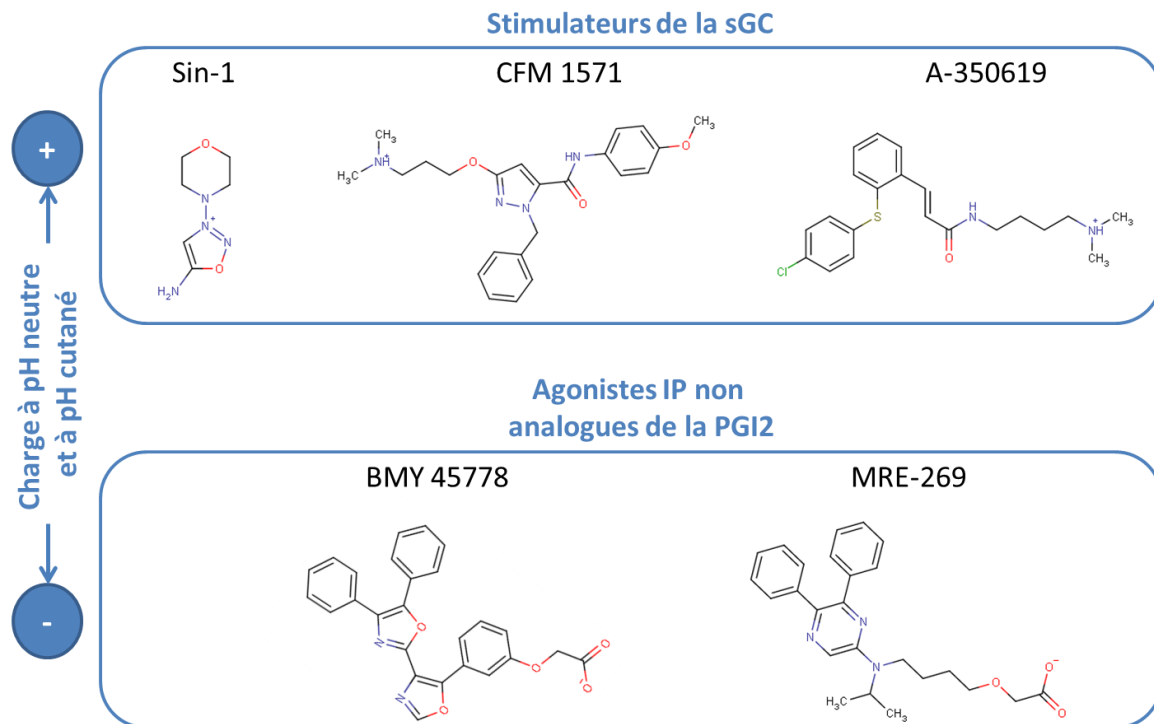
Le Dr. Blaise a mis au point un modèle sur rat pour le screening de molécules vasodilatatrices. Avec ce modèle, elle a montré que le treprostinil et l'iloprost, deux analogues de la PGI<sub>2</sub>, pouvaient être administrés par voie iontophorétique sur une peau saine et produire un effet vasodilatateur localisé au niveau du site d'administration (Blaise et al., 2011). L'effet a ensuite été confirmé dans une étude chez le volontaire sain avec les deux molécules. Mais seul le treprostinil était parfaitement toléré au niveau cutané.

En 2011, le Dr. Roustit a montré sur le même modèle animal, que l'iontophorèse de sitaxentan et de bosentan, deux antagonistes non-sélectifs du récepteur de l'endothéline-1 était possible mais pas suffisamment efficace pour produire une augmentation du flux microvasculaire en l'absence d'une pré-contriction préalable par ET-1 (Matthieu Roustit et al., 2012). La piste des antagonistes a été définitivement abandonnée après avoir testé les molécules chez le volontaire sain sans résultat probant.

En 2012, nous avons continué le screening de molécules avec deux autres classes pharmacologiques de vasodilatateurs périphériques : les stimulateurs de la guanylate cyclase soluble et les agonistes du récepteur IP non analogues du PGI<sub>2</sub>. Cinq molécules candidates ont été préalablement sélectionnées à partir de leurs propriétés physicochimiques puis testées sur le modèle de rat. Seules les molécules chargées à pH neutre et à pH cutané ont été conservées. Les stimulateurs de la sGC étaient tous chargés positivement tandis que les agonistes IP étaient tous chargés négativement (Figure 20).



Figure 20. Stimulateurs de la sGC et agonistes IP non analogue de la PGI2.



Les stimulateurs de la sGC ont été choisis pour leur propriété vasodilatatrice puissante et surtout indépendante du NO (Stasch & Hobbs, 2009; Straub et al., 2001). La sGC est un hétérodimère qui comprend un groupement prosthétique avec une molécule d'hème à l'état réduit  $\text{Fe}^{2+}$ . En présence de NO, le groupement hème change de conformation et la sGC s'active. En condition normale, la conversion du GTP en GMPC par la sGC est dépendante de la réduction de l'hème et de la présence de NO. L'emploi de donneurs de NO dans l'insuffisance cardiaque a permis de montrer que la sGC pouvait se désensibiliser à force d'être exposée à des quantités importantes de NO et pouvait même s'oxyder jusqu'à devenir inactivable. Les stimulateurs de la sGC appartiennent à plusieurs classes organiques de molécules mais ils présentent tous la même capacité de stimulation de l'enzyme en l'absence de NO. En revanche, si l'enzyme est oxydée leur affinité disparaît et leur effet aussi. Lorsque nous avons réalisé cette étude, aucun médicament issu de cette classe n'avait

encore obtenu d'autorisation de mise sur le marché, en revanche certaines molécules comme le riociguat étaient déjà en cours d'évaluation clinique notamment dans l'insuffisance cardiaque et dans l'HTAP. Depuis, le riociguat est commercialisé sous le nom de spécialité Adempas avec une indication dans l'HTAP. Malheureusement son profil physicochimique n'étant pas compatible avec une administration par iontophorèse (molécule neutre à pH 7 et à pH cutané) nous ne l'avons pas testé. Nous avons sélectionné trois molécules Sin-1, CFM 1571 et A-350619.

Les agonistes IP non analogues de la PGI<sub>2</sub> appartiennent à la même classe que le treprostinil et l'iloprost, deux molécules qui ont donné d'excellents résultats par iontophorèse sur notre modèle de rat. Ces molécules ne sont pas dérivées de la structure de la prostacycline mais elles possèdent toute une excellente affinité pour le récepteur IP et sont capables de produire une vasodilatation très puissante. Le selexipag, chef de file de ces agonistes IP non analogue de la PGI<sub>2</sub>, vient de faire l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis dans l'indication d'HTAP, sur la base des résultats positifs obtenus dans un essai de phase III très récemment publié (Sitbon et al., 2015). Dans notre étude, nous n'avons pas testés le selexipag mais son métabolite actif le MRE-269, ainsi qu'un analogue structural très proche le BMY 45778.

Parmi les cinq molécules évaluées dans ce travail, le stimulateur de la sGC, A-350619, a montré la plus forte augmentation significative du flux sanguin cutané évaluée par imagerie laser Doppler pendant la séquence de iontophorèse. La stimulation de la sGC est une piste prometteuse, toutefois elle dépend du niveau d'oxydation de l'enzyme. Il n'est pas surprenant d'avoir réussi à produire une vasodilatation sur ce modèle de peau saine puisque l'enzyme est préférentiellement sous sa forme réduite dans ces conditions. En revanche, la sclérodémie est caractérisée par un important stress oxydant et la proportion de sGC

oxydée risque d'y être bien plus élevée ce qui rendrait l'enzyme insensible aux stimulateurs. A l'heure actuelle, aucune étude mécanistique sur le niveau d'oxydation de la sGC dans la sclérodermie n'a été menée. Avec A-350619 nous disposons dorénavant d'un outil pharmacologique spécifique de la forme réduite. En reproduisant l'expérience sur un modèle de souris sclérodermique les résultats obtenus sur peau saine pourraient être moins intéressants. Heureusement, une seconde classe d'agonistes de la sGC existe. Les activateurs de la sGC diffèrent des stimulateurs par leur capacité à activer l'enzyme sous sa forme oxydée et ce indépendamment du NO. Dans une étude toujours en cours nous avons testé plusieurs de ces activateurs avec des résultats préliminaires intéressants.

Article publié: [Anodal iontophoresis of a soluble guanylate cyclase stimulator induces a sustained increase in skin blood flow in rats.](#) Kotzki S, Roustit M, Arnaud C, Boutonnat J, Blaise S, Godin-Ribuot D, Cracowski, JL. J Pharmacol Exp Ther. 2013 Sep;346(3):424-31.

# Anodal Iontophoresis of a Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Induces a Sustained Increase in Skin Blood Flow in Rats

Sylvain Kotzki, Matthieu Roustit, Claire Arnaud, Jean Boutonnat, Sophie Blaise, Diane Godin-Ribuot, and Jean-Luc Cracowski

INSERM U1042, Grenoble, France (S.K., M.R., C.A., S.B., D.G.-R., J.-L.C.); Université Joseph Fourier, CNRS UMR 5525, Grenoble, France (J.B.); Université Joseph Fourier, Clinical Pharmacology Unit-INSERM CIC03, Grenoble, France (S.K., M.R., J.-L.C.); and Vascular Medicine Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, France (S.B.)

Received April 26, 2013; accepted July 8, 2013

## ABSTRACT

The treatment of systemic sclerosis-related digital ulcers is challenging. Although the only effective drugs are prostacyclin analogs, their use is limited by vasodilation-related adverse reactions. In this study, we assessed the local iontophoresis administration of three soluble guanylate cyclase (A-350619 [3-[2-[(4-chlorophenyl)thiophenyl]-N-[4-(dimethylamino)butyl]-2-propenamide hydrochloride], SIN-1 [amino-3-morpholinyl-1,2,3-oxadiazolium chloride], and CFM 1571 [3-[3-(dimethylamino)propoxy]-N-(4-methoxyphenyl)-1-(phenylmethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide hydrochloride]) and two nonprostanoid prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) receptor agonists (MRE-269 [[4-[(5,6-diphenylpyrazinyl)(1-methylethyl)amino]butoxy]-acetic acid] and BMY 45778 [[3-(4,5-diphenyl[2,4'-bioxazol]-5'-yl)phenoxy]acetic acid]) to induce vasodilation onto the hindquarters of anesthetized rats. Skin blood flow was quantified using laser

Doppler imaging during the whole experience, and safety was assessed by continuous recording of blood pressure and histopathological examination. Anodal iontophoresis of A-350619 (7.54 mM) induced a sustained increase in cutaneous blood flow ( $P = 0.008$  vs. control). All other drugs exhibited poor or no effect on skin blood flow. Vasodilation with A-350619 iontophoresis was concentration-dependent (7.5, 0.75, and 0.075 mM;  $P < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra trend test), and repeated administrations do not suggest any risk of tolerance. This study also compared continuous versus intermittent iontophoresis protocols. Continuous anodal iontophoresis of A-350619 at 7.5 mM increases cutaneous blood flow with good local tolerance. Iontophoresis of soluble guanylate cyclase stimulators should be investigated as potential local therapy for digital ulceration in patients with scleroderma.

## Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a rare disease affecting the skin microcirculation. Its pathophysiology involves an early microvascular dysfunction, associated with autoimmunity and cutaneous collagen deposition. Raynaud's phenomenon is the early manifestation of the vasculopathy associated with the disease, and may develop into digital ulcerations and gangrene (Herrick, 2000). Digital ulcerations affect 43% of patients with limited cutaneous systemic sclerosis and 51% of those with diffuse cutaneous systemic sclerosis (Hachulla et al., 2007). The treatment of SSc-related ulcers remains challenging. Bosentan, a nonspecific endothelin receptor antagonist, has been indicated to prevent digital ulcers in patients at risk, but has no effect on existing ulcers (Korn et al., 2004). In addition, an elevated aminotransferase level is the main adverse effect, with an annual rate of 10.1%, leading to therapy discontinuation in

3.2% of bosentan-naïve patients (Humbert et al., 2007). Prostacyclin analogs are used intravenously (Wigley et al., 1992), and iloprost is the only drug available for treating existing ulcerations (Wigley et al., 1998). However, the therapeutic effect is counterbalanced by serious dose-limiting side effects related to the potent induced vasodilatation (e.g., severe headaches, flushing, tachycardia, and hypotension). In a recent study, sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, seemed to show benefits in digital ulcer healing, but the lack of a placebo group in the design was a major limitation to a formal conclusion (Brueckner et al., 2010).

The topical administration of these drugs may be a way of getting around the toxicity of systemic treatments. Iontophoresis is a simple, noninvasive transdermal drug delivery method using a low-intensity electric current (Kalia et al., 2004). Some authors have highlighted the potential interest in iontophoresis of vasodilating drugs as a treatment of digital ulcers in SSc (Murray et al., 2005, 2008). Previous work from our laboratory showed that bosentan was not an appropriate candidate for iontophoresis (Roustit et al., 2012). In addition, although sodium nitroprusside, an indirect nitric oxide (NO)

This research was supported by a grant from the patients' association "Association des Sclérodermiques de France."  
dx.doi.org/10.1124/jpet.113.205484.

**ABBREVIATIONS:** A-350619, 3-[2-(4-chlorophenylsulfanyl)phenyl]-N-(4-dimethylaminobutyl)acrylamide hydrochloride; ANOVA, analysis of variance; AUC, area under the curve; BL, baseline; %BL, percentage change from BL; BMY 45778, [3-(4,5-diphenyl[2,4'-bioxazol]-5'-yl)phenoxy]acetic acid; CFM 1571, 3-[3-(dimethylamino)propoxy]-N-(4-methoxyphenyl)-1-(phenylmethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide hydrochloride; IP, prostaglandin I<sub>2</sub> receptor; MRE-269, [4-[(5,6-diphenylpyrazinyl)(1-methylethyl)amino]butoxy]-acetic acid; NO, nitric oxide; MW, molecular weight; sGC, soluble guanylate cyclase; SIN-1, amino-3-morpholinyl-1,2,3-oxadiazolium chloride; SSc, systemic sclerosis.

donor, can be delivered through iontophoresis (Blaise et al., 2010), its short half-life does not make it a promising candidate. On the other hand, the iontophoresis of prostacyclin analogs (iloprost and treprostinil) showed promise at inducing a sustained increase in cutaneous flow in rats (Blaise et al., 2011). A first study with iloprost in healthy volunteers was performed to confirm these results in humans; unfortunately, the study was aborted because of significant side effects. Afterward, a second study with treprostinil was realized in healthy volunteers. In this study, we demonstrated the ability of treprostinil to increase cutaneous flow without any side effect (Blaise et al., 2012).

Although the iontophoresis of treprostinil is currently being tested in patients with SSc (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01554540), screening other agonists with vasodilator potency could open new perspectives. The first target is the prostaglandin I<sub>2</sub> receptor (IP). In addition to the classic prostacyclin analogs, nonprostanoid IP agonists are smaller molecules that have an effect of comparable intensity to that of treprostinil (Woodward et al., 2011). The second target is soluble guanylate cyclase (sGC), a key signal-transduction enzyme activated by NO. Compounds that activate sGC in an NO-independent manner lead to vascular smooth muscle cell relaxation, and may provide considerable therapeutic advantages (Evgenov et al., 2006). Moreover, recent findings have suggested an antifibrotic effect of sGC stimulators in different experimental models of SSc (Beyer et al., 2012). Finally, these compounds are small, hydrophilic polarized molecules with a high potential for transdermal delivery through iontophoresis. All considered, these nonprostanoid IP agonists and sGC stimulators could be interesting candidates for therapeutic iontophoresis in SSc.

The main objective of this study was to assess whether iontophoretically administered nonprostanoid IP agonists and sGC stimulators increase cutaneous blood flow in rats. As secondary objectives, we also tested their safety, tolerance after repeated administrations, as well as the effect of different drug concentrations and different protocols of administration to enhance drug transport through the skin.

## Materials and Methods

### Animals

Forty-four male Wistar rats (8 weeks old, 275–290 g; CERJ, Le Genest-St-Isle, France) were housed in controlled conditions conforming to the current French legislation, and were fed with standard rat chow. The protocol was approved by the Grenoble Animal Ethics Committee. Rats were kept in a day/night cycle of 12/12 hours with food and water at will. Rats were shaved as previously described (Blaise et al., 2011; Roustit et al., 2012).

### Drugs

**Virtual Screening.** We selected potential candidate drugs with a three-step filter procedure using the following criteria: 1) good affinity for the target site (sGC or IP receptor); 2) suitable physical and chemical properties with molecular mass <500 Da, logD<sub>6</sub> < 5 (logP for pH 6), and polar surface area <140 Å<sup>2</sup>; and 3) ionized molecules at cutaneous physiologic pH.

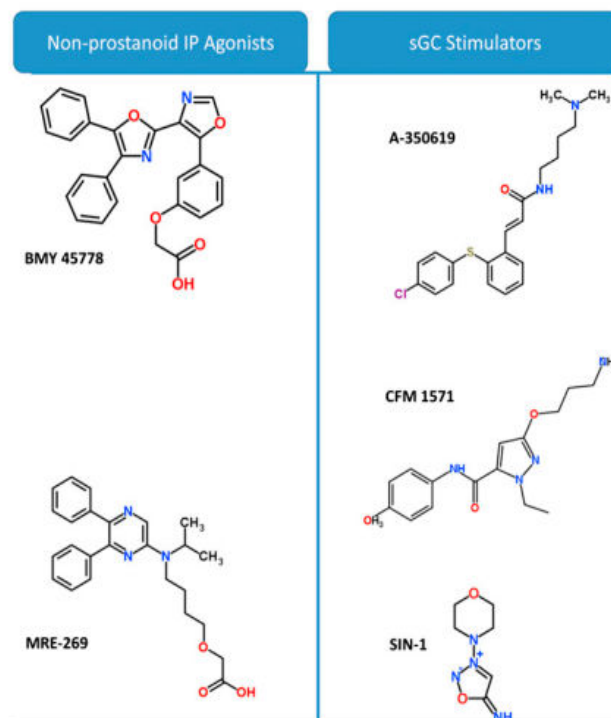
**Drug Supply and Preparation.** Five candidates were retained as follows: two nonprostanoid IP agonists [BMY 45778 ([3-(4,5-diphenyl[2,4'-bioxazol]-5'-yl)phenoxy]acetic acid) (Seiler et al., 1997) and MRE-269 ([4-(5,6-diphenylpyrazinyl)(1-methylethyl)amino]butoxy]-acetic

acid) (Morrison et al., 2010)] and three sGC stimulators [A-350619 (3-[2-(4-chlorophenylsulfanyl)phenyl]-N-(4-dimethylaminobutyl)acrylamide hydrochloride) (Miller et al., 2003); SIN-1 (amino-3-morpholinyl-1,2,3-oxadiazolium chloride) (Maurice and Haslam, 1990); and CFM 1571 (3-[3-(dimethylamino)propoxy]-N-(4-methoxyphenyl)-1-(phenylmethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide hydrochloride) (Evgenov et al., 2006) (Fig. 1)]. A-350619 hydrochloride (*M<sub>r</sub>* 425.41), SIN-1 chloride (*M<sub>r</sub>* s211.13), CFM 1571 hydrochloride (*M<sub>r</sub>* 444.95), and BMY 45778 (*M<sub>r</sub>* 438.44) were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). MRE-269 (*M<sub>r</sub>* 419.5) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Isotonic sodium chloride (0.9% NaCl; Aguettant, Lyon, France) was used as vehicle for sGC stimulators. We prepared specific vehicles for MRE-269 (1:3 solution of ethanol:phosphate-buffered saline, pH 7.2) and for BMY 45778 (0.9% NaCl with 0.1% dimethylsulfoxide and 1% ethanol), as advised in the product information. These vehicles were used as controls for the corresponding drugs.

Solutions of sGC stimulators were prepared extemporaneously by diluting 10 mg of A-350619 in 3.13 ml of 0.9% NaCl, 10 mg of CFM 1571 in 3 ml of 0.9% NaCl, and 10 mg of SIN-1 in 4.7 ml of 0.9% NaCl to obtain 7.5, 7.5, and 10 mM solutions, respectively. We also diluted 7.5 mM A-350619 to obtain 0.75 and 0.075 mM solutions (experiment 2). MRE-269 solution was prepared extemporaneously by diluting 1 mg in 1 ml of 100% ethanol, heating the solution for 10 minutes at 45°C, and diluting it in 3 ml of 1× phosphate-buffered saline at pH 7.2 to obtain a 0.6 mM solution. BMY 45778 solution was prepared by diluting 1 mg of powder in 88 μl of 1:1 solution of dimethylsulfoxide: ethanol and then further diluting it in 44.3 ml of 0.9% NaCl to obtain a 0.052 mM solution.

### Experimental Procedures

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) and were maintained in the prone position for the duration of the experiment. Experiments were performed in a temperature-controlled room, and the rats were placed on a thermal pad, with the temperature



**Fig. 1.** Candidates for the initial screening among nonprostanoid prostacyclin receptor agonists and stimulators of soluble guanylate cyclase.

maintained at 37.5°C (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Before iontophoresis, each rat was inspected to ensure that the hairless skin on the back and the hind legs was intact. Rats were then equipped with three 1.2-cm<sup>2</sup> circular iontophoresis AgCl electrodes (LI 611, Perilont System; Perimed, Järfälla, Sweden) containing drugs or vehicles, as described previously (Blaise et al., 2011). Passive electrodes (PF 384, Perilont System; Perimed) were placed on the back of the neck, and both electrodes were connected to a current generator (PF 382b, Perilont System; Perimed).

**Experiment 1: Initial Screening.** Iontophoresis of 7.5 mM A-350619, 10 mM SIN-1, and 7.5 mM CFM 1571 was performed for 20 minutes using an anodal current (100  $\mu$ A) because these agents are positively charged at the skin and physiologic pH. They were compared with anodal iontophoresis of NaCl. To minimize the number of sacrifices, each animal received two electrodes filled with two different drugs and a third electrode filled with NaCl. With this distribution, only 12 animals were used to obtain  $n = 8$  for each drug and its simultaneous control (NaCl). Distribution of drugs was randomly generated. Iontophoresis of BMY 45778 and MRE-269 and their respective vehicles was performed for 20 minutes using a cathodal current (100  $\mu$ A) because these agents are negatively charged at the skin and physiologic pH ( $n = 8$  for each series). Since vehicles were not the same for both drugs, the number of animals could not be reduced. We finally tested whether passive diffusion of the molecules had any significant effect on skin blood flow. The same iontophoretic protocol was used as follows: active electrodes were filled with drugs or vehicles but they were not connected to the current generator. The 20-minute application was followed by a 40-minute recording of skin blood flow.

**Experiment 2: Effect of Concentration and Safety.** We tested three different concentrations of the molecule that had shown significant effects on skin blood flow in experiment 1 (i.e., A-350619). Rats were equipped as described earlier. In addition, a catheter was inserted in the left carotid artery to continuously record blood pressure (Powerlab; ADInstrument, Colorado Springs, CO) from 5 minutes before to 60 minutes after iontophoresis. Photographs were taken before iontophoresis and immediately after iontophoresis to assess cutaneous tolerance. Negative reactions were coded grade 0; weak reactions were coded as grade 1 and are characterized by nonvesicular erythema. Strong positive reactions (grade 2) are characterized by erythema associated with vesicles. Extreme positive reactions (grade 3) are bullous reactions. Irritant reactions (coded grade 4) are characterized by necrosis.

Histopathologic examination of full-thickness skin biopsies from drug-treated and from one nontreated skin area was realized. Biopsies were fixed in acidified formal alcohol fluid (5% acetic acid, 75% absolute ethyl alcohol, and 18% water; Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France), paraffin embedded, and stained with hematoxylin, eosin, and safran. Specific features were sought to evaluate the effect of the treatment on the skin, including hyperkeratosis and epidermolytic aspects. In the stratum corneum, the degree of hyperkeratosis was evaluated, and the presence of any parakeratosis was noted. The granular layer was evaluated for perinuclear vacuolar changes, cytolysis, and the appearance of keratohyalin granules. The spinous layer was investigated for the development of these features. We also assessed vasculitis, a histological diagnosis defined as inflammation targeting blood vessel walls and compromising their function, leading to hemorrhagic and/or ischemic events. Furthermore, any inflammation accompanied by infiltration of neutrophils, lymphocytes, or mast cells at the dermo-epidermal interface was evaluated.

**Experiment 3: Protocol Optimization and Cutaneous Resistance.** To determine whether an intermittent current could enhance the effect of iontophoresis (Nair and Panchagnula, 2004), we assessed the effect of an intermittent iontophoresis protocol for 7.5 mM A-350619 and NaCl ( $n = 8$ ) on skin blood flow. We repeated 20 1-minute cycles of 10 seconds at 600  $\mu$ A ("on") followed by 50 seconds without current ("off"). This series was compared with the continuous current condition (100  $\mu$ A, 20 minutes) in experiment 2.

In both protocols, the same amount of current (120 milicoulombs) was delivered.

Cutaneous resistance was determined during continuous-current iontophoresis with an amperometric biosensor unit. For these measurements, one electrode was connected to the passive probe on the neck of the rat and the other to a probe positioned on a hind leg. Measurements started 5 minutes after starting iontophoresis. This delay was chosen in pilot experiments and was aimed at monitoring the voltage plateau. Voltage (expressed in volts) was recorded, and skin resistance was calculated and expressed in ohms (Ferrell et al., 2002).

**Experiment 4: Evaluation of Tolerance after Repeated Administrations.** As tolerance to sGC activation is a major issue with treatments involving the NO pathway, we tested whether repeated administrations of A-350619 decrease the vascular response over time. Eight animals were prepared as previously described. Two circular skin sites were marked and subsequently equipped with electrodes. Anodal iontophoresis of 7.5 mM A-350619 and NaCl was then simultaneously performed for 20 minutes at 100  $\mu$ A. The procedure was repeated 1 hour (H1) and 24 hours (H24) later, with the electrodes positioned exactly on the previously used skin sites.

### Skin Blood Flow Measurement and Data Analysis

Skin blood flow was measured with laser Doppler imaging (PeriScan PIM3; Perimed). The scan resolution was 1.59 mm. Flow was averaged over 0.5-cm<sup>2</sup> regions of interest, and scans were taken every minute for at least 5 minutes for the baseline (BL) recording and then for the next 60 minutes from the beginning of iontophoresis.

Data are expressed as arbitrary perfusion units. To take into account interindividual BL variations, data were subsequently expressed as a percentage change from BL (%BL), and then we calculated the area under the curve (AUC) from the beginning of iontophoresis to the end of the recording (AUC<sub>0-60</sub>, in %BLs, as primary outcome) and during the 20-minute iontophoresis (AUC<sub>0-20</sub>, as secondary outcome). This choice reflects our objective to screen drugs exhibiting a sustained effect beyond the duration of iontophoresis itself.

### Statistical Analysis

Continuous data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. Data were analyzed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) and paired  $t$  tests for  $2 \times 2$  comparisons. When the conditions of application of parametric tests were not fulfilled, nonparametric tests were used (Friedman test and Wilcoxon test for paired comparisons). The Jonckheere-Terpstra trend test was used to assess the effect of concentration (experiment 2). A two-way ANOVA was used to assess tolerance (experiment 4), comparing AUCs over time between the two skin sites (A-350619 and control). Mauchly's test of sphericity was used to assess equality of variance. As inequality of variance could not be excluded, Greenhouse-Geisser adjustment was used. We tested the effect of time, drug, and the interaction between time and drug. Two-sided significance tests were used throughout. We considered  $P$  values  $< 0.05$  as significant, corrected by Bonferroni's method for multiple comparisons. Statistical analysis was performed with SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

**Effect of Iontophoresis of sGC Stimulators and Nonprostanoid IP Agonists: Initial Screening (Experiment 1).** Anodal iontophoresis of A-350619 (7.5 mM) significantly increased AUC<sub>0-20</sub> and AUC<sub>0-60</sub> compared with NaCl (Fig. 2A; Table 1). On the other hand, iontophoresis of the other sGC stimulators (CFM 1571 at 7.5 mM and SIN-1 at 10 mM) as well as nonprostanoid IP agonists (MRE-269 at 0.6

mM and BMY 45778 at 0.052 mM) did not induce any significant change in skin blood flow compared with their respective vehicles (Fig. 2, B–E; Table 1). However, a transient vasodilation was observed for CFM 1571, as shown by the significant increase in  $AUC_{0-20}$  versus NaCl ( $79,088 \pm 27,383$  and  $15,812 \pm 15,859$  %BL, respectively;  $P = 0.001$ ). Neither A-350619 nor CFM 1571 increased cutaneous flow when passively applied, i.e., in the same condition but without current (electrodes not connected to the generator).

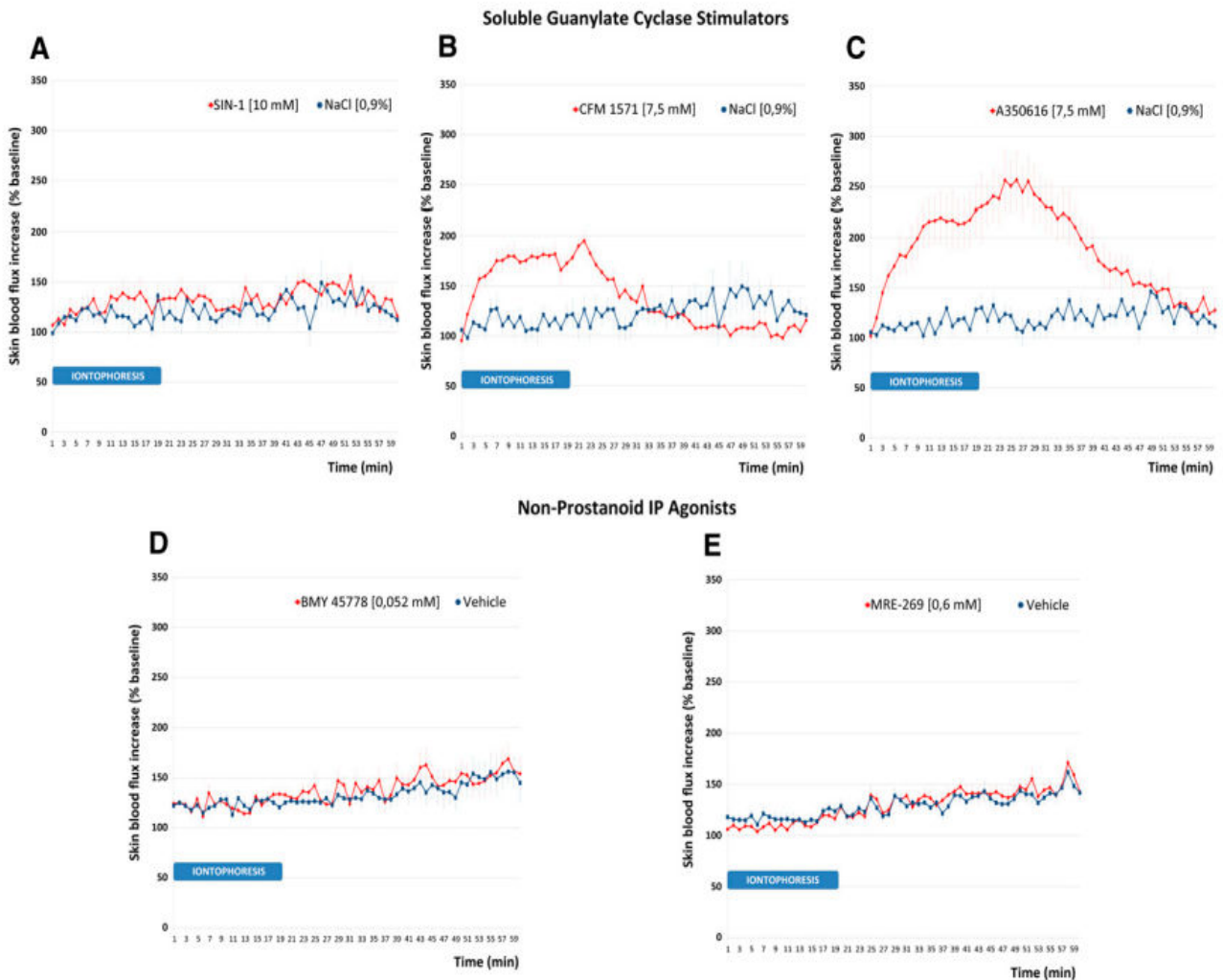
**Concentration-Dependent Effect of Iontophoresis of A-350619 on Cutaneous Flow (Experiment 2).** There was a significant concentration-dependent effect between the three concentrations of A-350619 (7.5, 0.75, and 0.075 mM).  $AUC_{0-60}$  were  $26,5807 \pm 16,4703$ ,  $72,701 \pm 49,345$ , and  $34,203 \pm 77,796$  %BLs, respectively ( $P < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra trend test) (Fig. 3). Paired comparisons showed that A-350619 at 7.5 mM induced significantly increased skin blood flow as compared with 0.75 mM ( $P = 0.025$ ) and 0.075 mM ( $P = 0.017$ ) solutions.

**Comparison between Intermittent and Continuous Iontophoresis of A-350619 (Experiment 3).** Continuous

and intermittent iontophoresis of A-350619 at 7.5 mM induced comparable vasodilation ( $AUC_{0-60}$  were  $265,807 \pm 164,703$  and  $211,959 \pm 136,821$  %BLs, respectively;  $P = 0.49$ ) (Fig. 4A). However, intermittent iontophoresis of 0.9% NaCl significantly increased skin blood flow as compared with continuous iontophoresis ( $111,696 \pm 59,591$  and  $44,051 \pm 55,963$  %BLs, respectively;  $P = 0.03$ ).

Cutaneous resistance between continuous iontophoresis of 7.5 mM A-350619 and 0.9% NaCl was not significantly different ( $28.5 \pm 7$  and  $29.3 \pm 3$  k $\Omega$ , respectively;  $P = 0.79$ ).

**Evaluation of the Tolerance after Repeated Administrations (Experiment 4).** Repeated administrations of 7.5 mM A-350619 and NaCl at T0, H1, and H24 did not significantly change skin blood flow over time.  $AUC_{0-60}$  were  $277,583 \pm 145,094$ ,  $216,336 \pm 157,045$ , and  $303,332 \pm 171,202$  %BLs, respectively, for A-350619, and  $19,888 \pm 41,866$ ,  $21,283 \pm 54,847$ , and  $16,615 \pm 58,921$  %BLs, respectively, for NaCl. The influence of time was not significant ( $P = 0.63$ , two-way ANOVA), but the effect of the drug was significant ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA). There was no significant interaction between time and drug ( $P = 0.29$ ,



**Fig. 2.** Vascular effect of 20-minute 100- $\mu$ A anodal iontophoresis of the soluble guanylate cyclase stimulators SIN-1 (10 mM) (A), CFM 1571 (7.5 mM) (B), and A-350619 (7.5 mM) (C) in comparison with 0.9% NaCl. Effect of 20-minute 100- $\mu$ A anodal nonprostanoid prostacyclin receptor agonists BMY 45778 (0.052 mM) (D) and MRE-269 (0.6 mM) (E), in comparison with their respective vehicles, on cutaneous blood flow expressed as percentage of baseline.

TABLE 1

Effect of iontophoresis of nonprostanoid prostacyclin receptor agonists and stimulators of sGC on cutaneous blood flow

Data are expressed as the area under the curve of the percentage change from baseline (expressed as %BLs) during 60 minutes (20-minute iontophoresis and 40-minute rest).

	Active Drug	Vehicle	P Value
sGC stimulators			
A-350619 (7.5 mM)	319,896 ± 169,386	69,307 ± 50,999	0.008
CFM 1571 (7.5 mM)	141,533 ± 43,688	81,701 ± 74,991	0.06
SIN-1 (10 mM)	114,162 ± 46,036	76,488 ± 60,704	0.2
Nonprostanoid IP agonists			
BMY 45778 (0.052 mM)	259,412 ± 73,032	236,622 ± 70,855	0.48
MRE-269 (0.6 mM)	214,540 ± 38,531	204,932 ± 67,030	0.77

two-way ANOVA), suggesting that the effect of the drug persists over time.

**Skin and Systemic Safety of the Iontophoresis of A-350619.** No side effects were observed on the skin. No significant drop in mean arterial pressure after iontophoresis with A-350619 was observed. During experiment 2, mean arterial pressure was 133.70 ± 16.79 mm Hg before and 126.63 ± 14.29 mm Hg during iontophoresis ( $n = 6$ ;  $P = 0.2$ ). Twenty-four skin biopsies were collected to evaluate skin tolerability (experiment 2). None of the histopathological

features listed in *Materials and Methods* were found in any of the skin biopsies.

## Discussion

For the first time, we show that anodal iontophoresis of an sGC stimulator (A-350619) induces a large, sustained, concentration-dependent increase in cutaneous blood flow in rats without skin or systemic toxicity.

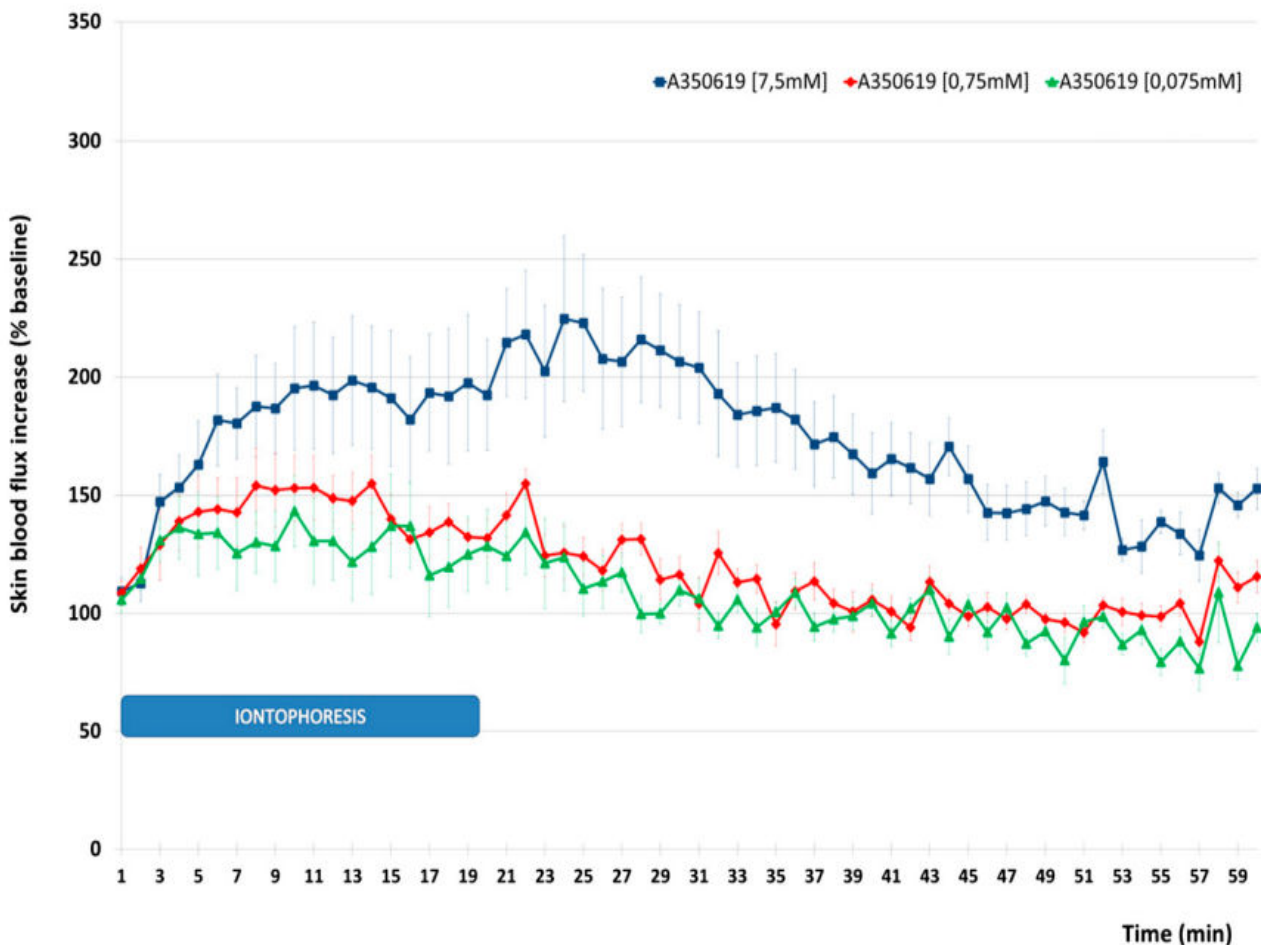
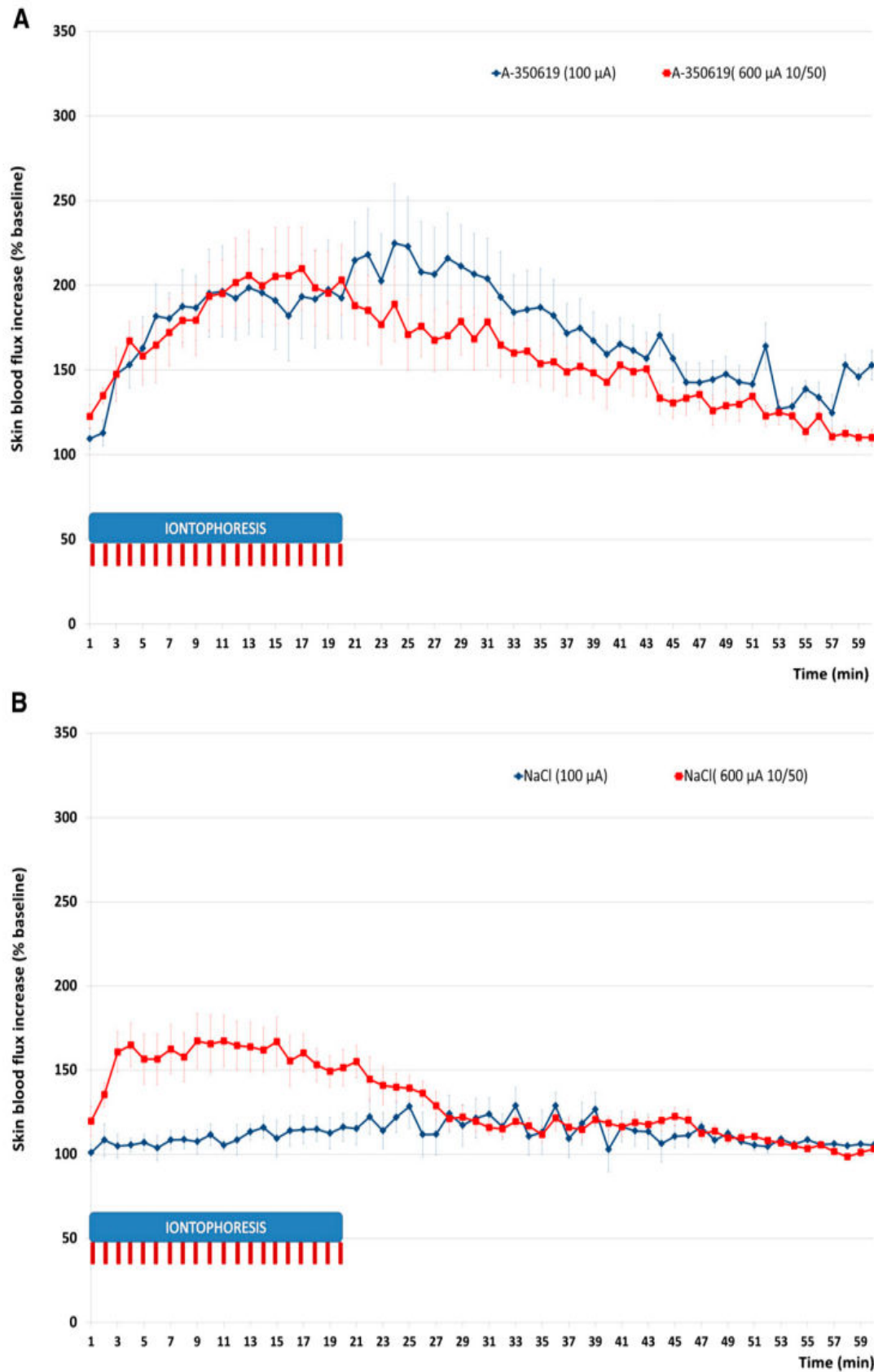


Fig. 3. Dose-dependent effect of anodal iontophoresis of the soluble guanylate cyclase stimulator A-350619 at 7.5, 0.75, and 0.075 mM on cutaneous blood flow expressed as percentage of baseline.





**Fig. 4.** (A) Comparison of continuous and intermittent anodal iontophoresis of the soluble guanylate cyclase stimulator A-350619 (7.5 mM) on cutaneous blood flow expressed as percentage of baseline. (B) Comparison of continuous and intermittent anodal iontophoresis of 0.9% NaCl on cutaneous blood flow expressed as percentage of baseline.

Iontophoresis refers to the facilitated movement of ionized molecules through application of an electrical field (Kalia et al., 2004). It has the advantage over passive diffusion of enabling the delivery of polarized and/or larger drugs across the dermal barrier. Iontophoresis enhances the transport of drugs by two major mechanisms in addition to passive diffusion, electrorepulsion, and electro-osmosis. Electrorepulsion refers to the ion-electric field interaction that provides a force, which drives ionized drugs through the skin. Electro-osmosis refers to the bulk motion of the solvent that carries ionic or neutral solutes with the solvent stream, and is mostly observed when iontophoresis is applied using an anodal current (Dixit et al., 2007). Many factors are critical for transdermal drug delivery using iontophoresis; among these, the most important are the drug concentration and molecular weight, the charge on the molecule, the pH of the solution (which directly influences ionization), and the hydrophobic factor (Dixit et al., 2007).

In this study, we selected molecules with theoretically high potential for iontophoretic transport. Nonetheless, we were only able to demonstrate an effect on skin blood flow for two of the drugs, A-350619 and CFM 1571. As all compounds were highly ionized (99% or higher) at cutaneous pH, this result may be due to the molecular physical and chemical differences between candidates. Concerning the sGC stimulators, SIN-1 is a small hydrophilic molecule ( $M_r$  206.63 and  $\log D_6 = -1.5$ ), whereas A-350619 and CFM 1571 are larger but are more lipophilic ( $M_r$  425.41 and 444.95,  $\log D_6 = 2.1$  and 0.9, respectively). In contrast, the low polar surface area of A-350619 ( $32.34 \text{ \AA}^2$ ), compared with that of SIN-1 and CFM 1571 ( $68.4$  and  $68.62 \text{ \AA}^2$ , respectively), is not a barrier to iontophoretic transfer. With regard to the nonprostanoid IP agonist, both candidates are lipophilic ( $\log D_6 > 2$ ), with large polar surface areas ( $>75 \text{ \AA}^2$ ) and high molecular weight ( $>400$ ), but they have poor solubility. For this reason, the highest concentration we could test was lower than that of the sGC stimulators, which could explain why we did not observe any effect. Taken together, these data suggest that the partition coefficient and the concentration are crucial parameters to enhance iontophoresis. This is consistent with the good iontophoretic transfer of treprostinil ( $M_r$  390.51 and  $\log D_6$  1.4) in the same rat model (Blaise et al., 2011).

Pharmacological differences between A-350619, CFM 1571, and SIN-1 may also explain the absence of vasodilation with the latter. Indeed, the molecular mechanism of sGC activation by SIN-1 involves the release of NO and superoxide in equimolar amounts. (Schrammel et al., 1998). Considering the extinction coefficients of these compounds, their interaction to generate peroxynitrite is likely more rapid than the reaction of NO with the heme moiety of sGC.

Among the two sGC stimulators with significant effect on skin blood flow, CFM 1571 showed a significant difference from its vehicle when blood flow was recorded over the 20-minute iontophoresis period (secondary outcome). However, this difference did not reach significance over 60 minutes (primary outcome) because of a rapid decrease in skin blood flow within a few minutes after the end of iontophoresis. Analysis of individual tracings confirmed this pattern. We did not pursue the study of this compound as we focused on molecules with a sustained effect.

We tested three concentrations of A-350619 and observed a concentration-dependent effect. However, paired comparisons

revealed that only the highest concentration (7.5 mM) was significantly different from the others. We also tested different iontophoresis protocols (i.e., continuous vs. intermittent current delivery) with the same overall amount of current. The effect of A-350619 was similar with both protocols; however, intermittent current induced significant current-induced vasodilation with NaCl. Indeed, iontophoresis has been associated with a confounding nonspecific current-induced vasodilation suggested to be mediated through axon reflex (Durand et al., 2002a). This is consistent with previous observations that intermittent anodal current potentiates current-induced vasodilation (Durand et al., 2002b). Therefore, we conclude that continuous iontophoresis of A-350619 is more appropriate.

Repeated administrations of A-350619 do not suggest any risk of tolerance. There is a nonsignificant trend toward decreased vasodilation at H1, which could reflect a short-term desensitization of sGC, as observed on isolated rat aorta after a 30-minute exposure to nitroglycerin (Kakutani et al., 2005). However, skin vascular reactivity at H24 is fully restored; this is encouraging as daily administration (or less) is a more feasible dose regimen in a clinical setting.

Transdermal iontophoresis is considered to be a safe procedure, associated with only moderate erythema and tingling sensations (Kumar and Lin, 2008). In the present work, we did not observe any significant toxicity of A-350619 iontophoresis on histopathologic examination of the skin. Moreover, the effect on blood pressure was slight and not significant.

Nonetheless, there are several limitations. First, we did not quantify the concentration of drugs in the dermis. As the concentrations used in experiment 1 are known to induce a significant pharmacological effect, we speculate that iontophoresis does not allow sufficient dermal concentrations to be reached in the skin to be able to show any effect on the microvasculature (except for A-350619 and, to a lesser extent, CFM 1571). The quantification of drug concentration in the dermis would address this issue, either in vivo (using microdialysis) or in skin biopsies. In both cases, this implies setting up the drug assay (e.g., by liquid chromatography–tandem mass spectrometry). A simpler method could be to directly deliver into the dermis the same concentration of drug with intradermal injections or microdialysis, and to compare the response to that obtained with iontophoresis. However, the benefit of such experiments is minimized by significant bias such as nonspecific, inflammation-induced vasodilation.

We observed rapid decrease in skin blood flow after the end of iontophoresis. Indeed, despite a large and sustained vasodilator response at 7.5 mM, the response was not as prolonged as that previously described with treprostinil, for which a plateau was still present at least 60 minutes after the end of iontophoresis (Blaise et al., 2011). This could be due to an elevated subcutaneous clearance of A-350619, or to a transient pharmacodynamic effect. Such transient effect on skin blood flow might be potentiated by inhibiting the degradation of cGMP with phosphodiesterase type 5 inhibitors, as was shown with NO donors (Blaise et al., 2010).

Another issue that must be raised is that sGC stimulators depend on a reduced heme group in sGC to be active (Evgenov et al., 2006). Therefore, oxidative stress, which is a hallmark of the pathophysiology of SSc (Gabielli et al., 2009), may decrease the effect of iontophoresis of sGC stimulators in the disease state. On the other hand, sGC activators are heme-independent and could be an interesting alternative in SSc.

This hypothesis should be tested in animal models of SSC exhibiting elevated production of reactive oxygen species (e.g., bleomycin or HOCl models) (Batteux et al., 2011).

In the same way, recent work demonstrated that sGC stimulation potently inhibits fibroblast activation and progressive fibrosis in a model of inflammation-driven fibrosis but also plays a role in preventing the progression of fibrosis and induces regression of established inflammation-dependent fibrosis (Beyer et al., 2012). Thus, as we show that iontophoresis allows drug delivery directly into the dermis, we may expect a benefit on both the vascular and the fibrotic components of the disease, making sGC stimulators/activators good candidates for therapeutic iontophoresis in patients with SSC.

In conclusion, the present study demonstrates that local drug delivery of A-350619, an sGC stimulator, using iontophoresis induces a sustained increase in skin blood flow. Systemic and cutaneous safety was good. Further work is needed to test whether iontophoresis of sGC stimulators may present a new therapeutic option in SSC.

#### Acknowledgments

The authors thank Claire Arnaud and Océane Combe for technical support and Alison Foote for editing the manuscript.

#### Authorship Contributions

Participated in research design: Kotzki, Roustit, Blaise, Godin-Ribuot, Cracowski.

Conducted experiments: Kotzki, Roustit, Arnaud.

Performed data analysis: Kotzki, Roustit, Arnaud, Boutonnat.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Kotzki, Roustit, Arnaud, Cracowski.

#### References

- Batteux F, Kavian N, and Servettaz A (2011) New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **23**:511–518.
- Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, Tomcik M, Hirth-Dietrich C, von Degenfeld G, Sandner P, and Distler O, et al. (2012) Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* **71**:1019–1026.
- Blaise S, Hellmann M, Roustit M, Isnard S, and Cracowski J-LL (2010) Oral sildenafil increases skin hyperaemia induced by iontophoresis of sodium nitroprusside in healthy volunteers. *Br J Pharmacol* **160**:1128–1134.
- Blaise S, Roustit M, Hellmann M, Millet C, and Cracowski J-L (2012) Cathodal Iontophoresis of Treprostinil Induces a Sustained Increase in Cutaneous Blood Flux in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol* **360**:1989–2003.
- Blaise S, Roustit M, Millet C, Ribuot C, Boutonnat J, and Cracowski J-LL (2011) Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br J Pharmacol* **162**:557–565.
- Brueckner CS, Becker MO, Kroencke T, Huscher D, Scherer HU, Worm M, Burmester G, and Riemekasten G (2010) Effect of sildenafil on digital ulcers in systemic sclerosis: analysis from a single centre pilot study. *Ann Rheum Dis* **69**:1475–1478.
- Dixit N, Bali V, Baboota S, Ahuja A, and Ali J (2007) Iontophoresis - an approach for controlled drug delivery: a review. *Curr Drug Deliv* **4**:1–10.
- Durand S, Fromy B, Bouyé P, Saumet JL, and Abraham P (2002a) Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms. *J Vasc Res* **39**:59–71.
- Durand S, Fromy B, Bouyé P, Saumet JL, and Abraham P (2002b) Vasodilation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms. *J Physiol* **540**:261–269.

- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HHHW, and Stasch J-P (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **5**:755–768.
- Ferrell WR, Ramsay JE, Brooks N, Lockhart JC, Dickson S, McNeece GM, Greer IA, and Sattar N (2002) Elimination of electrically induced iontophoretic artefacts: implications for non-invasive assessment of peripheral microvascular function. *J Vasc Res* **39**:447–455.
- Gabrielli A, Avvedimento EV, and Krieg T (2009) Scleroderma. *N Engl J Med* **360**:1989–2003.
- Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubois S, Queyrel V, and Hatron PY (2007) Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol* **34**:2423–2430.
- Herrick AL (2000) Vascular function in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **12**:527–533.
- Humbert M, Segal ES, Kiely DG, Carlsen J, Schwirier B, and Hoepfer MM (2007) Results of European post-marketing surveillance of bosentan in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **30**:338–344.
- Kakutani T, Ogawa K, Iwahashi S, Mizumoto K, and Hatano Y (2005) Sevoflurane enhances nitroglycerin tolerance in rat aorta: implications for the desensitization of soluble guanylate cyclase possibly through the additive generation of superoxide anions and/or hydroxyl radicals within vascular smooth muscle. *Anesth Analg* **101**:1015–1022.
- Kalia YN, Naik A, Garrison J, and Guy RH (2004) Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **56**:619–658.
- Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, Rainisio M, Pope J, Hachulla E, Rich E, Carpentier P, Molitor J, and Seibold JR, et al. (2004) Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* **50**:3985–3993.
- Kumar MG and Lin S (2008) Transdermal iontophoresis: impact on skin integrity as evaluated by various methods. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **25**:381–401.
- Maurice DH and Haslam RJ (1990) Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol* **37**:671–681.
- Miller LN, Nakane M, Hsieh GC, Chang R, Kolasa T, Moreland RB, and Briani JD (2003) A-350619: a novel activator of soluble guanylyl cyclase. *Life Sci* **72**:1015–1025.
- Morrison K, Ernst R, Hess P, Studer R, and Clozel M (2010) Selexipag: a selective prostacyclin receptor agonist that does not affect rat gastric function. *J Pharmacol Exp Ther* **335**:249–255.
- Murray AK, Herrick AL, Gorodkin RE, Moore TL, and King TA (2005) Possible therapeutic use of vasodilator iontophoresis. *Microvasc Res* **69**:89–94.
- Murray AK, Moore TL, King TA, and Herrick AL (2008) Vasodilator iontophoresis a possible new therapy for digital ischaemia in systemic sclerosis? *Rheumatology (Oxford)* **47**:76–79.
- Nair VB and Panchagnula R (2004) Influence of electrical parameters in the iontophoretic delivery of a small peptide: in vitro studies using arginine-vasopressin as a model peptide. *Pharmacol* **59**:583–593.
- Roustit M, Blaise S, Arnaud C, Hellmann M, Millet C, Godin-Ribuot D, Dufournet B, Boutonnat J, Ribuot C, and Cracowski JL (2012) Iontophoresis of endothelin receptor antagonists in rats and men. *PLoS ONE* **7**:e40792.
- Schrammel A, Pfeiffer S, Schmidt K, Koesling D, and Mayer B (1998) Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholinonydnominine involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol* **54**:207–212.
- Seiler SM, Brassard CL, Federici ME, Romine J, and Meanwell NA (1997) [3-[4-(4,5-Diphenyl-2-oxazolyl)-5-oxazolyl]phenoxyl]acetic acid (BMY 45778) is a potent non-prostanoid prostacyclin partial agonist: effects on platelet aggregation, adenylate cyclase, cAMP levels, protein kinase, and iloprost binding. *Prostaglandins* **53**:21–35.
- Wigley FM, Korn JH, Csuka ME, Medsger TAJ, Jr, Rothfield NF, Ellman M, Martin R, Collier DH, Weinstein A, and Furst DE, et al. (1998) Oral iloprost treatment in patients with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis: a multicenter, placebo-controlled, double-blind study. *Arthritis Rheum* **41**:670–677.
- Wigley FM, Seibold JR, Wise RA, McCloskey DA, and Dole WP (1992) Intravenous iloprost treatment of Raynaud's phenomenon and ischemic ulcers secondary to systemic sclerosis. *J Rheumatol* **19**:1407–1414.
- Woodward DF, Jones RL, and Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* **63**:471–538.

**Address correspondence to:** Matthieu Roustit, Unité de Pharmacologie Clinique, Centre d'Investigation Clinique de Grenoble-INSERM CIC03, CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09, France. E-mail: MRoustit@chu-grenoble.fr

## **II. Evaluation de l'iontophorèse d'activateurs de la guanylate cyclase soluble chez le rat.**

Ce travail, toujours en cours, vient en complément du travail mené sur les stimulateurs de la sGC. L'objectif y est d'évaluer l'effet pharmacologique du cinaciguat et de BAY 60-2770, deux activateurs de la sGC, sur la cicatrisation d'ulcères provoqués sur un modèle murin de sclérodémie. Seule la première partie comprenant l'évaluation de l'effet vasodilatateur cutané des deux molécules sur le modèle de peau saine est présentée ici. Les résultats sur la cicatrisation quant à eux sont encore trop préliminaires pour être présentés.

Nous avons utilisé le modèle de screening sur peau saine de rat tel que décrit précédemment. Brièvement, 16 rats mâles âgés de 8 semaines, fournis par la société Janvier (Le Genest-St-Isle, France), pesant entre 300 et 500 grammes ont été utilisés. Huit rats ont été attribués au groupe « screening » et l'autre moitié ont constitué le groupe « dose-réponse de cinaciguat ». Trente mg de cinaciguat et 30 mg de BAY 60-2770 ont été généreusement fournis sous forme de poudre par Bayer HealthCare (Bayer Pharma AG – Bayer HealthCare, 42096 Wuppertal Germany). Les solutions ont été préparées dans une solution de NaCl 0.9% + DMSO 2%, tamponnée à pH 5.1. Les animaux du groupe screening ont reçu simultanément une iontophorèse cathodale de cinaciguat 600 $\mu$ M, une iontophorèse cathodale de BAY 60-2770 100 $\mu$ M et une iontophorèse de solution contrôle (NaCl 0.9%, DMSO 2%). Les animaux du groupe dose-réponse ont reçu deux séquences simultanées de iontophorèse de cinaciguat à 60 $\mu$ M et 6 $\mu$ M respectivement. Le protocole expérimental était le même que celui décrit dans l'article sur les stimulateurs de la sGC (Kotzki et al., 2013), à savoir une séquence de 20 minutes de iontophorèse à 100 $\mu$ A et un suivi de la perfusion microvasculaire cutanée par imagerie laser Doppler 5 minutes avant l'allumage du générateur, pendant la séquence et pendant 30 minutes après. Les molécules

ont été administrées par iontophorèse cathodale en raison de leur charge négative à pH 7 et à pH cutané.

Dans le groupe « screening » nous avons montré que l'iontophorèse de cinaciguat provoque une vasodilatation significativement supérieure au contrôle et à l'iontophorèse de BAY 60-2770 pendant les 20 minutes de la séquence de courant (ANOVA,  $p=0.02$ ). Cette différence n'est pas maintenue après la séquence de iontophorèse (ANOVA,  $p=0.062$ ) (table1 ; figure 21). La iontophorèse de cinaciguat dilué au  $1/10^{\circ}$  et au  $1/100^{\circ}$  n'a produit aucune augmentation significative de la perfusion par rapport au contrôle.

Le cinaciguat a produit une augmentation du flux sanguin cutané de près de 75% en fin de séquence iontophorétique. Cet effet modéré peut s'expliquer par le mode d'action du cinaciguat qui agit préférentiellement sur la forme oxydée de l'enzyme. Dans ce modèle les animaux ont une peau saine, il est donc fort probable que la majeure partie des enzymes sGC soit dans un état réduit et non oxydé. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec le stimulateur de la sGC A-350619, où l'amplitude maximale de l'augmentation du flux était plus importante, de l'ordre de 125%. Evidemment la comparaison directe entre les réponses à ces deux molécules n'est pas possible car d'une part elles n'agissent pas sur le même site actif de l'enzyme et d'autre part l'expression du résultat sur l'effet pharmacologique n'a pas été normalisée. Pour comparer de manière plus pertinente les deux réponses, il faut exprimer la vasodilatation provoquée en pourcentage de la vasodilatation maximale obtenue par un test d'hyperémie réactive post-occlusive par exemple. Expérimentalement ce type de test est très complexe à mettre en place sur animaux, qui plus est sur animaux anesthésiés. Pour analyser les deux réponses relatives, nous reproduirons l'expérience sur un modèle de sclérodémie et son contrôle sain avec les deux molécules, A-350619 et cinaciguat. Cet expérience sera mené sur des souris  $uPAR^{-/-}$ , un

modèle génétique de souris sclérodermique dont nous disposons un élevage. Cette étude devrait nous permettre d'approfondir nos connaissances sur l'effet respectif des stimulateurs et des activateurs de la sGC sur la vasodilatation cutanée en condition pathologique et par conséquent sur le niveau d'oxydation de la sGC sur les souris sclérodermiques uPAR<sup>-/-</sup>.

Table 1. Effet de l'iontophorèse de cinaciguat et de BAY 60-2770 sur le flux sanguin cutané.

	Aire sous courbe pendant la iontophorèse	ANOVA 1-facteur	Tests post-hoc par rapport au vecteur	Aire sous courbe pendant toutes l'expérience	ANOVA 1-facteur	Tests post-hoc par rapport au vecteur
<b>Cinaciguat</b> (600µM)	23080 ± 16300		p = 0.033	121462 ± 82649		p = 0.132
<b>BAY 60-2770</b> (100µM)	8739 ± 8106	p = 0.02	p = 0.994	53779 ± 49299	p = 0.062	p = 0.953
<b>Vecteur</b> (NaCl 0.9% + DMSO 2%)	8187 ± 5316			55604 ± 26802		

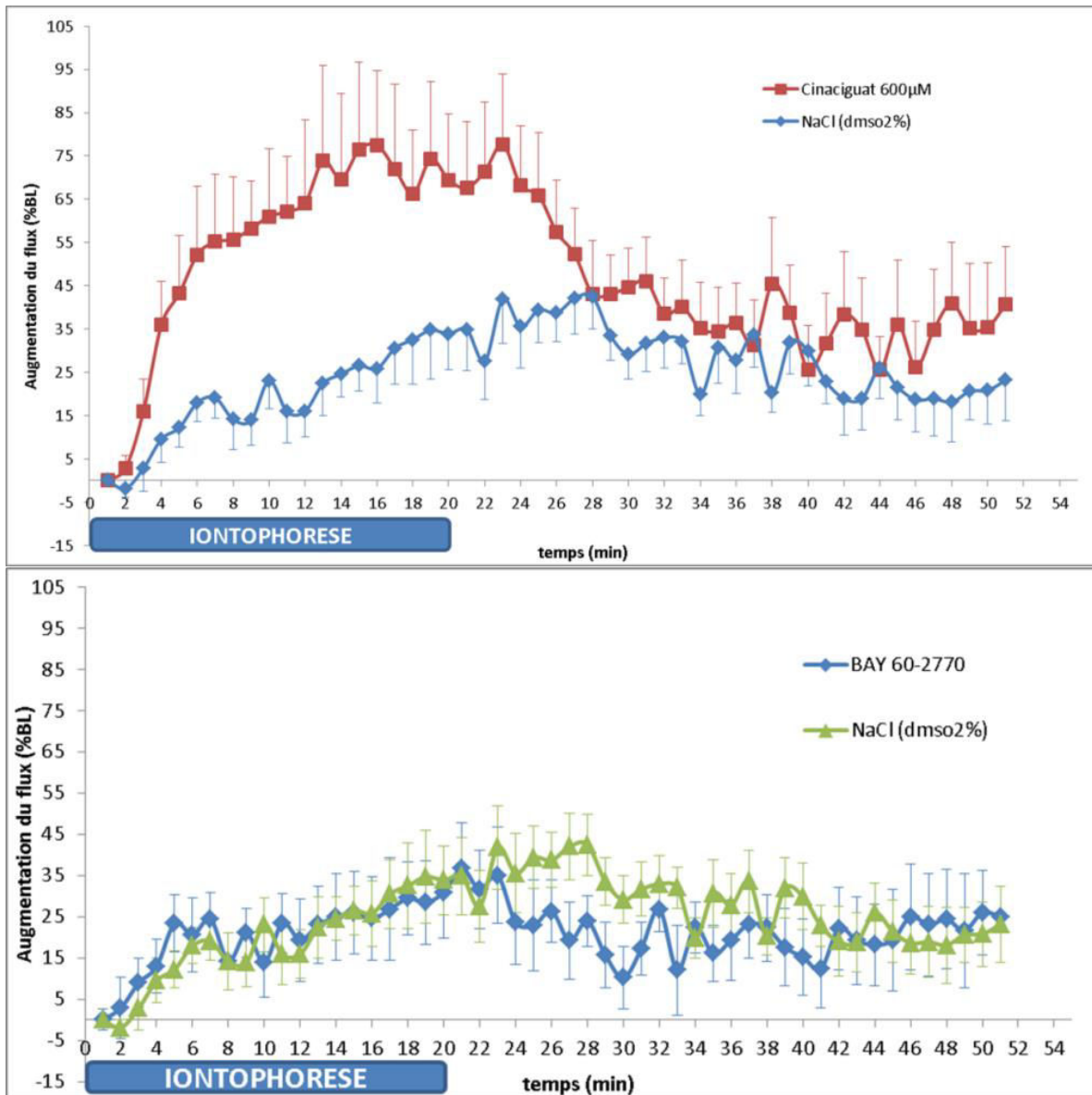


Figure 21. Effet de l'iontophorèse de cinaciguat (haut) et de BAY 60-2770 (bas) sur le flux sanguin cutané par rapport au contrôle.

Manuscrit en cours : [Evaluation de l'iontophorèse des activateurs de la sGC sur la cicatrisation cutané](#). Kotzki S, Bouvet R, Sibille M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Cracowski JL, Roustit M

### **III. Etude ancillaire sur l'effet du courant pulsé par rapport au courant continu dans l'iontophorèse de treprostinil**

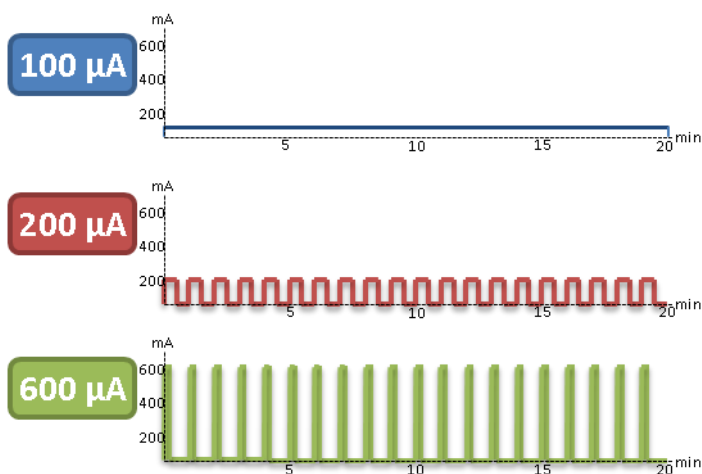
Les résultats obtenus avec l'iontophorèse de treprostinil d'abord sur modèle de rat, puis sur l'avant-bras de volontaires sains et enfin sur l'extrémité des doigts de patients SSc, ont fait du treprostinil notre meilleur candidat dans l'espoir de développer une nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en charge de ulcères digitaux de la sclérodermie.

Le principal avantage de l'approche par iontophorèse est qu'elle permet de limiter l'exposition systémique et de cibler la zone de tissu à traiter. Dans l'espoir d'augmenter l'effet du treprostinil, nous avons décidé d'optimiser le protocole de iontophorèse pour accroître le nombre de transport du treprostinil. Pour atteindre cet objectif nous disposions de deux alternatives. La première consistait à augmenter la concentration du médicament dans la solution administrée. Or dans l'expérience menée par le Dr. Blaise sur le modèle de rat, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de relation linéaire entre la concentration de treprostinil et l'effet vasodilatateur induit. En effet, quel que soit la concentration (6.4mM, 0.64mM ou 0.064mM) l'effet observé était à peu près similaire. Ce résultat était probablement dû à un phénomène de compétitions accrues avec les co-ions de la solution (Cl<sup>-</sup>). Pour améliorer le transport iontophorétique, une seconde solution consiste à augmenter l'intensité du courant. Mais cette technique présente un risque, en effet une exposition prolongée à une intensité trop forte peut provoquer une réaction d'intolérance voire des dommages au niveau cutané. Pour limiter ce risque nous avons décidé d'augmenter l'intensité tout en intégrant des périodes sans courant dans la séquence de iontophorèse. Ce procédé, inspiré des expériences de iontophorèse en courant continu pulsé, a été testé avec deux protocoles différents et a été comparé au protocole continu que nous utilisons habituellement. Les protocoles que nous avons évalués n'étaient pas des



protocoles « pulsés » à haute fréquence comme retrouver le plus souvent. Ici nous avons simplement appliqué des cycles de 1 minute répétés avec 10 ou 30 secondes de courant continu séparés par des pauses de 50 ou 30 secondes respectivement, sur une période de 20 minutes. Pour que les protocoles soient comparables nous avons choisi de travailler à quantité de courant constante, en l'occurrence nous avons fixé la quantité à 120mC. Ainsi, le protocole à 10 secondes étant trois fois plus court en temps d'exposition que le protocole à 30 secondes nous avons augmenté l'intensité d'un facteur trois pour maintenir la quantité de charge délivrée constante (figure 22).

Figure 22. Protocoles de courant pulsé et de courant continu appliqués pendant 20 minutes



L'application d'un courant pulsé n'a pas permis d'améliorer l'augmentation du flux sanguin cutané provoquée par l'iontophorèse de treprostnil à la concentration de 0.64mM. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse du plateau évoquée par le Dr. Blaise. En effet, il est probable qu'il ne soit pas possible d'augmenter le flux sanguin au-delà de ce qui a déjà été observé, soit parce que la totalité des récepteurs activables sont saturés, soit parce que la réponse ne peut pas être améliorée, en raison d'un seuil pharmacodynamique qui serait

atteint. En revanche, le protocole à intensité maximale (600 $\mu$ A) a permis d'augmenter significativement le flux sanguin cutané avec la solution de plus faible concentration (0.064mM) par rapport aux deux autres protocoles évalués. La réponse obtenue avec ce protocole était même équivalente à celle obtenue avec la solution à 0.64M et le protocole continu. Il s'agit d'un résultat très intéressant dans la mesure où même si d'un point de vue pharmacologique l'effet est identique, la quantité de treprostinil requise est divisée par 10 avec ce protocole. Etant donné le coût encore très élevé du treprostinil en France, une telle économie représente un gain réel du rapport cout/efficacité.

Article publié : [Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood](#)

[flow](#). Kotzki S, Roustit M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Cracowski JL. Eur J Pharm Sci. 2015 May 25;72:21-6.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejps](http://www.elsevier.com/locate/ejps)

## Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow



Sylvain Kotzki<sup>a,c,\*</sup>, Matthieu Roustit<sup>a,b,c</sup>, Claire Arnaud<sup>b,c</sup>, Diane Godin-Ribuot<sup>b,c</sup>, Jean-Luc Cracowski<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Clinical Pharmacology Unit, INSERM CIC1406, Grenoble University Hospital, Grenoble, France

<sup>b</sup> UMR 1042-HP2, INSERM, Grenoble, France

<sup>c</sup> Univ. Grenoble Alpes, Grenoble, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form 11 February 2015

Accepted 15 February 2015

Available online 21 February 2015

#### Keywords:

Iontophoresis

Prostacyclin

Periodic current

Continuous current

Microcirculation

### ABSTRACT

**Introduction:** Systemic sclerosis (SSc) is a rare disease affecting digital microcirculation, leading to finger ulcers and in some cases to amputation. Prostacyclin analogues can be used intravenously but their therapeutic effect is counterbalanced by potentially serious vasodilatation-induced side effects. Iontophoresis of treprostinil could be a promising local therapeutic alternative for SSc-related digital ulcers. Iontophoretic drug delivery is complex, and whether continuous or periodic current should be used remains debated. The objective of the present work is to compare the effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil in rats.

**Materials and methods:** Treprostinil (0.64 mM and 0.064 mM) and NaCl were delivered by cathodal iontophoresis onto the hindquarters of anaesthetized rats. Three protocols delivering the same quantity of current were compared: one was continuous (100  $\mu$ A during 20 min) and two were periodic (B: twenty 1-min cycles with 200  $\mu$ A during 30 s followed by 30 s Off; and C: twenty 1-min cycles with 600  $\mu$ A during 10 s followed by 50 s Off) ( $n = 8$  for each protocol with each concentration). Skin blood flow was quantified using laser Doppler imaging and skin resistance was calculated with Ohm's law.

**Results:** All protocols induced a significant increase in skin blood flow. At the lower concentration (0.064 mM treprostinil) the pulsed 10/50 sequence significantly enhanced cutaneous blood flow (Table 1; Fig. 1B) compared to continuous iontophoresis or the 30/30 sequence. We noted that the pulsed iontophoresis of NaCl (10/50 sequence) induced a significant early increase in cutaneous blood flow in comparison with continuous iontophoresis. Skin resistance measures were negatively correlated with current intensity delivered.

**Conclusion:** In conclusion, pulsed iontophoresis of treprostinil with a 10 s/50 s (On/Off) protocol at 600  $\mu$ A increases the efficacy of iontophoresis at 0.064 mM but not at a tenfold higher concentration. Pulsed iontophoresis could be used to optimize treprostinil iontophoresis, to provide similar efficacy with decreased costs, and should now be tested on humans.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a rare disease affecting digital microcirculation, leading to finger ulcers and in some cases to amputation (Herrick, 2000). The therapy of SSc-related ulcers is challenging. Prostacyclin analogues are used intravenously (Wigley et al., 1992), but their therapeutic effect is counterbalanced by potentially serious vasodilatation-induced side effects (e.g. severe headaches, flushing, tachycardia and hypotension).

\* Corresponding author at: Unité de Pharmacologie Clinique, Centre d'Investigation Clinique de Grenoble – Inserm CIC03, CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09, France. Tel.: +33 4 76 76 92 60; fax: +33 4 76 76 92 62.

E-mail address: [skotzki@chu-grenoble.fr](mailto:skotzki@chu-grenoble.fr) (S. Kotzki).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.012>

0928-0987/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

The topical administration of vasodilators by iontophoresis, a non-invasive current-driven drug delivery method, has been suggested as a treatment strategy for digital ulcers as it allows elevated concentrations to be reached in the target tissue (skin of the finger pad) while limiting systemic toxicity (Murray et al., 2005, 2008). Recent experiments in animals and in humans have established the proof-of-concept of iontophoretically-administered treprostinil (a prostacyclin analogue) as a treatment of SSc-related digital ulcers (Blaise et al., 2011, 2013; Roustit et al., 2014). However, we observed high variability in the response, which is partly attributable to the inter- and intra-individual variability of skin to the iontophoretic current.

In iontophoresis the choice of current intensity and duration of application are crucial. On the one hand, the efficiency of

iontophoretic transport depends on the quantity of current delivered (i.e. product of intensity by time) (Kalia et al., 2004), but on the other hand it also depends on the effect of the current itself on the electrical properties of the skin (Chen and Chien, 1996; Chizmadzhev et al., 1998; Kanebako et al., 2002a, 2003, 2002b; Nair and Panchagnula, 2004). In particular, it is known that using a relatively high voltage during iontophoresis facilitates the transport of drugs by a mechanism of pore formation which decreases the skin's resistance (Glaser et al., 1988; Sims et al., 1992; Inada et al., 1994). However, elevated current density causes irritation and skin damage (Roustit et al., 2014). Moreover, prolonged continuous cathodal current may cause electrochemical polarization of the skin responsible for an increase in skin resistance and a reduced efficiency of transport. Attempts to find the ideal combination between duration and current intensity so as to optimize iontophoretic transport while limiting skin damage or polarization, has been the subject of number of studies. Pulsed current profiles (with variable On/Off ratios) have been proposed to allow skin depolarization, permitting the return to steady-state conditions and limiting irritation (Chen and Chien, 1996; Zakzewski et al., 1992; Okabe et al., 1986). Moreover, pulsed DC current has been shown to enhance the iontophoretic delivery of buserelin (Knoblauch and Moll, 1993) and arginine-vasopressin (Nair and Panchagnula, 2004) as compared with continuous direct current.

These studies suggest that applying a pulsed current could limit skin resistance, enhance iontophoretic transport and improve safety. The primary objective of this experimental study was to compare the effect of iontophoresis of treprostinil using pulsed vs continuous DC profiles on skin blood flow in rats. As a secondary objective we measured the changes in cutaneous resistance induced by each protocol.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Twenty-four male Wistar rats (eight-weeks old, 275–290 g; CERJ, Le Genest-St-Isle, France) were housed in controlled conditions conforming to the current French legislation and fed with standard rat chow. The protocol was approved by the Rhône-Alpes Region Animal Ethics Committee. Rats were kept in a day/night cycle of 12 h/12 h with food and water at will. Thirty minutes before iontophoresis, rats were shaved as previously described (Blaise et al., 2011; Roustit et al., 2012; Kotzki et al., 2013).

### 2.2. Drug supply and preparation

Commercial treprostinil solution at 2.5 mg mL<sup>-1</sup> (6.4 mM; MW 390.5 g mol<sup>-1</sup>; pKa 4.5; pI 1.25) was used (Remodulin®, Bioprojet Pharma, Paris, France), and isotonic sodium chloride (NaCl 0.9%) (Aguettant, Lyon, France) was used as a control solution. Dilutions were performed with 0.9% NaCl to obtain 0.64 mM and 0.064 mM solutions. The pH of treprostinil solutions was controlled before iontophoresis using a microprocessor-based pH meter (pH 210, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) to ensure compatibility with cathodal iontophoretic delivery (pH > 5.5). No pH adjustment was required for any dilution.

### 2.3. Iontophoresis protocols and experimental procedure

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg kg<sup>-1</sup> i.p) and were maintained in the prone position for the duration of the whole experiment, with the back uppermost. They were placed on a thermal pad to maintain their temperature at 37 °C

(Homeothermic Blanket Control Unit 50-7053, Harvard apparatus, Boston, MA, USA). Three 1.2-cm<sup>2</sup> circular iontophoresis electrodes (Perilont System, Perimed, Järfälla, Sweden) containing NaCl 0.9%, treprostinil 0.64 mM and 0.064 mM respectively were placed on the hairless skin of the back/hind legs. A passive electrode was placed on the back of the neck, as previously described (Blaise et al., 2011). Each iontophoresis electrode was connected to a constant current generator socket (PF 382b, Perilont System, Perimed, Järfälla, Sweden) and the passive electrode was connected to another output. As treprostinil is negatively charged at cutaneous pH, a cathodal polarity was applied to the drug containing electrodes.

Three different iontophoresis protocols were assessed with 0.64 mM treprostinil, 0.064 mM treprostinil and NaCl 0.9% (Fig. 1). The continuous protocol of 100 µA during 20 min (Protocol C) has been described in a previous study (Blaise et al., 2011). Then, two protocols with different ratios of pulsed current were compared to this reference. The first consisted of twenty repeated 1-min cycles of 30 s at 200 µA (On) followed by 30 s without current (Off) (Protocol P<sub>30/30</sub>). The second consisted of twenty cycles of 10 s at 600 µA (On) followed by 50 s without current (Off) (Protocol P<sub>10/50</sub>). We adapted the current intensity so as to always deliver a total charge of 120 mC over 20 min for each protocol. Treprostinil dilutions and 0.9% NaCl were tested simultaneously on the same animal for each protocol (*n* = 8). Passive permeation of treprostinil was not performed since it has ever been published that there was no significant transdermal diffusion of treprostinil without current (Blaise et al., 2011).

During iontophoresis, we measured the voltage across the passive and active electrode containing NaCl every five minutes to calculate the skin's resistance using the Ohm's law (Blaise et al., 2011).

### 2.4. Skin blood flux measurement and data analysis

Skin blood flux was continuously recorded through the active (i.e. drug-containing) electrodes with laser Doppler imaging (LDI; PeriScan PIM 3, Perimed, Järfälla, Sweden). The laser was placed 17 cm above the skin, and its resolution was set to a 2 mm step length. LDI scans were made every minute.

For each protocol the iontophoretic current started to be delivered after a 5-min baseline (BL) recording. Skin blood flux was then recorded throughout the 20-min iontophoresis and for 40 min following the end of current delivery. Skin blood flux was recorded as arbitrary perfusion units (PU) and subsequently expressed as the percentage increase from baseline (%BL) to take into account inter-individual variations in baseline flux. Areas under curves were calculated for the duration of the whole experiment (AUC<sub>0–60</sub>), and for the iontophoresis period only (AUC<sub>0–20</sub>).

### 2.5. Statistical analysis

Continuous data are expressed as mean ± standard deviation. Data were analyzed with 1-way ANOVA for the primary objective, and with paired *t* tests for 2 × 2 comparisons. Repeated-measures ANOVA was used to assess current profile effects on skin resistance during the iontophoretic protocol (secondary objective). Mauchly's test of sphericity was used to assess equality of variance. As inequality of variance could not be excluded a Greenhouse–Geisser adjustment was used. We tested the effect of time, of protocol, as well as the interaction between time and protocol. Two-sided significance tests were used throughout. We considered *p* values < 0.05 as significant, corrected by Bonferroni's method for multiple comparisons. Statistical analysis was performed with SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago IL, USA).

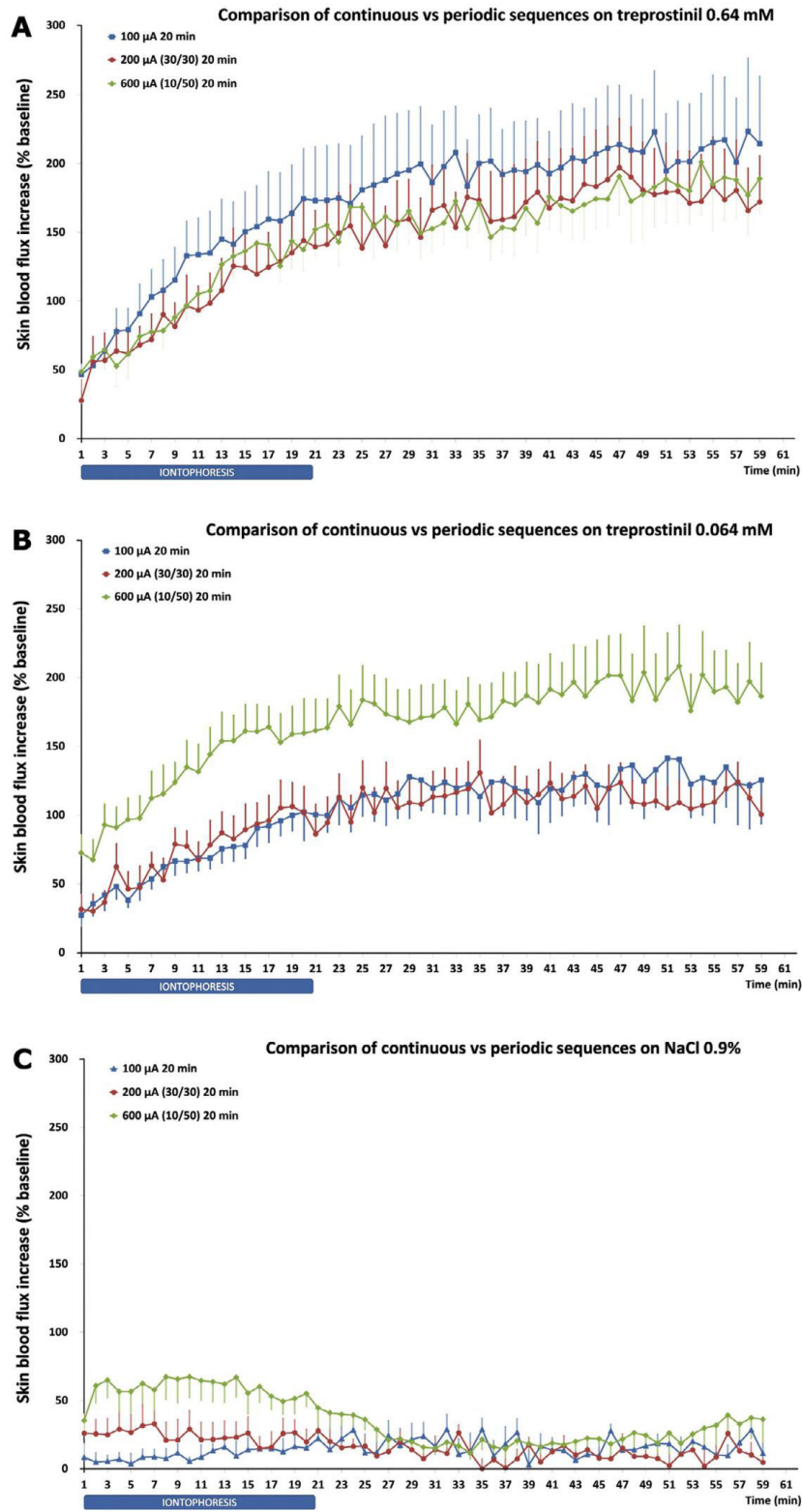


Fig. 1. Comparison of continuous and pulsed iontophoresis of treprostinil 0.64 mM (A), treprostinil 0.064 mM (B) and NaCl 0.9% (C) on cutaneous flux.

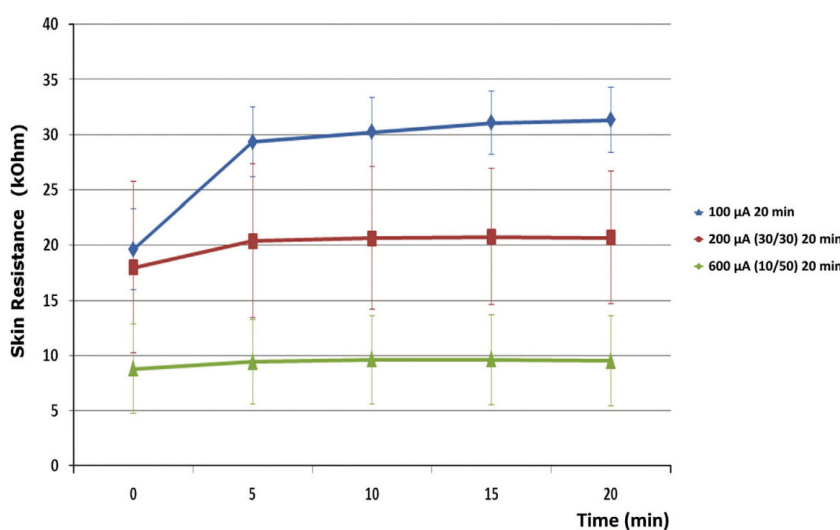
**Table 1**

Effect of continuous and pulsed current iontophoresis of 0.64 mM treprostinil 0.064 mM treprostinil and 0.9% NaCl on cutaneous blood flow. Data are expressed as area under the curve of the percentage change from baseline (%BLs) during the 20 min period of iontophoresis (AUC<sub>20min</sub>) and the 60 min covering the whole experiment (AUC<sub>60min</sub>).

	Protocols	Treprostinil 0.64 mM		Treprostinil 0.064 mM		NaCl 0.9%	
		AUC	ANOVA p_value	AUC	ANOVA p_value	AUC	ANOVA p_value
AUC <sub>20min</sub>	Continuous	134,524 ± 74,591	0.594	75,641 <sup>b</sup> ± 29,496	0.005 <sup>a</sup>	11,445 <sup>b</sup> ± 19,022	0.011 <sup>a</sup>
	P <sub>30/30</sub>	105,388 ± 65,132		81,238 <sup>b</sup> ± 41,472		28,909 ± 39,739	
	P <sub>10/50</sub>	113,017 ± 21,558		145,931 ± 52,781		68,432 ± 41,141	
AUC <sub>60min</sub>	Continuous	609,370 ± 337,448	0.694	356,612 <sup>b</sup> ± 153,693	0.019 <sup>a</sup>	51,622 <sup>b</sup> ± 60,821	0.034 <sup>a</sup>
	P <sub>30/30</sub>	506,805 ± 266,560		347,440 <sup>b</sup> ± 139,628		57,749 ± 36,035	
	P <sub>10/50</sub>	516,721 ± 146,164		584,754 ± 215,776		129,654 ± 79,604	

<sup>a</sup> ANOVA p-value.

<sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  (post-hoc test, comparison with P<sub>10/50</sub>).



**Fig. 2.** Comparison of skin resistance behavior between continuous and pulsed iontophoresis of 0.9% NaCl.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of pulsed vs continuous current iontophoresis of treprostinil and 0.9% NaCl on cutaneous blood flow

We did not observe any significant difference in skin blood flow between continuous and pulsed iontophoresis protocols when using treprostinil at 0.64 mM (Table 1; Fig. 1A). However, at the lower concentration (0.064 mM treprostinil) the pulsed 10/50 sequence significantly enhanced cutaneous blood flow (Table 1; Fig. 1B) compared to continuous iontophoresis or the 30/30 sequence. We noted that the pulsed iontophoresis of NaCl (10/50 sequence) induced a significant early increase in cutaneous blood flow in comparison with continuous iontophoresis.

#### 3.2. Effect of pulsed current iontophoresis of treprostinil on cutaneous resistance

We observed a significant difference in skin resistance between the three protocols (ANOVA,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2). Mean resistance during iontophoresis was significantly higher with Protocol C ( $28.3 \pm 2.8$  k $\Omega$ ) in comparison with Protocol P<sub>30/30</sub> ( $19.7 \pm 6.2$  k $\Omega$ ,  $p < 0.05$ ) and Protocol P<sub>10/50</sub> ( $9.1 \pm 3.8$  k $\Omega$ ,  $p < 0.05$ ).

### 4. Discussion

Our results show that among the different protocols delivering the same quantity of charge the P<sub>10/50</sub> sequence significantly

enhanced skin blood flow as compared with the P<sub>30/30</sub> sequence or the continuous iontophoresis of 0.064 mM treprostinil. Interestingly, the P<sub>10/50</sub> sequence allowed similar levels of vasodilation to be reached (i.e. approximately 200% increase in baseline skin blood flow) to that obtained with a 10-fold higher concentration (0.64 mM treprostinil) whatever the protocol.

Although the total quantity of current, which is a major determinant of iontophoretic transport, was the same (120 mC) between the three protocols, treprostinil was not quantified in dermal layers, and therefore we cannot affirm that the total dose is equivalent between the protocols. The only evidence for drug diffusion is indirect, i.e. the pharmacodynamics effect of treprostinil on the microvasculature. With the high concentration of treprostinil (0.64 mM), the increase of skin blood flow was equivalent between the three protocols. We cannot rule out that the doses delivered were not the same, but that they all provided concentrations high enough to reach maximal efficacy. This is consistent with the ceiling effect that we observed in previous work by our group (Blaise et al., 2011).

In order to understand the reason of the difference between the three protocols at the lowest concentration, we recorded skin resistance and showed dramatically lower resistance with the pulsed protocol. This could be explained by the hyperpolarization of the skin (which is negatively charged at physiological pH) induced by cathodal iontophoresis. Such hyperpolarization may increase the skin resistance to current flow in the cathodal-to-anodal direction, thus limiting anion delivery. With short pulsed iontophoresis, we observed lower skin resistance probably because

“Off” periods facilitate skin return to steady-state polarity. This is consistent with previous experiments which demonstrated that pulsed iontophoresis enhances drug transport. Pioneer studies include the work from Nair and Panchagnula, who demonstrated that iontophoretic transport of the peptide arginine-vasopressin (MW 1084) with a 3-h pulsed protocol (On/Off ratio of 3:1 (30 min/10 min) and 1:1 (30 min/30 min) at 0.5 mA/cm<sup>2</sup>) induced transdermal flux similar to a 4-h continuous iontophoresis protocol at the same concentration (Nair and Panchagnula, 2004).

Overall, few studies compared pulsed vs continuous, and the rationale for choosing the two pulsed protocols therefore relies on limited data. We first chose the total charge (120 mC obtained with a 0.1 mA intensity during 20 min) based on previous work by our group that showed a major increase in skin blood flow with continuous current application (Blaise et al., 2011). Then, we used the same quantity of current and defined “On/Off” ratios for pulsed sequences following examples that were previously published (Nair and Panchagnula, 2004). We chose the 1:5 time ratio (0.6 mA during 10 s and 50 s Off) as it provides a 0.5 mA/cm<sup>2</sup> current density, which is considered to be the maximum density that should be used on human skin to avoid pain or skin injury (Dixit et al., 2007). We also decided to test an intermediate protocol keeping the same quantity of current with a 1:1 time ratio and medium intensity at (0.2 mA during 30 s and 30 s Off; 120 mC, 0.16 mA/cm<sup>2</sup>).

The pulsed protocol P<sub>10/50</sub> with 0.9% NaCl produced a transient increase in cutaneous blood flux during the first 20 min, which may be attributed to an initial axon-reflex. It is known that the iontophoretic current induces non-specific vasodilatation by sensitization of small afferent fibers in response to the initial current (Durand et al., 2002). During iontophoresis of a vasodilator, this non-specific effect may be cumulative with the vasoactive effect, and for this reason we cannot exclude that an axon-reflex was partially involved in the increase in vasodilatation observed during the iontophoresis of treprostinil at 0.064 mM with protocol P<sub>10/50</sub>. Given that our animals were anaesthetized, we did not assess the local sensations associated with the initiation of iontophoresis. However, since the axon-reflex is mediated through C and A delta fiber stimulation, we cannot rule out that in humans such a protocol may be more likely to generate a tickling sensation or pain at the site of iontophoresis, which may be a limitation to its use. Nevertheless, such side effect may be acceptable if it allows using lower concentrations of treprostinil be used, therefore decreasing the risk of dose-dependent adverse drug events. Moreover, treprostinil is a relatively expensive drug, and this new approach could therefore substantially improve the cost-effectiveness of the procedure.

Finally, these encouraging results with pulsed iontophoresis on healthy skin have to be replaced in the context of SSc patients. Indeed, the functional and structural modifications of the skin barrier in SSc could affect the amount of drug delivered. To address this issue, animal models of SSc could be used to compare drug diffusion between healthy and fibrotic skin. However, to our knowledge, there is no widely used rat model of SSc. Further experiments could be performed in mice models, especially on models mimicking SSc-related vasculopathy such as the uPAR<sup>-/-</sup> mouse model (Manetti et al., 2014). However, recent data from a clinical study suggest a limited impact of sclerotic skin on iontophoretic delivery of treprostinil. Indeed, when comparing digital skin blood flow between healthy volunteers and SSc patients with sclerodactyly (Roustit et al., 2014), we showed that in both groups one-third of participants were non-responders to digital iontophoresis of treprostinil, suggesting that skin thickness did not impair drug diffusion. Among patients, the response was not related to the Rodnan skin score (i.e. dermal thickness) or to the videocapillaroscopy pattern (i.e. density of functional microvessels).

Nevertheless, the issue of skin integrity remains when we consider that treprostinil iontophoresis is being developed to be applied on SSC-related skin ulcers, i.e. wounded skin. One can assume that drug diffusion will be modified, and we cannot rule out that increased diffusion through ulcerated skin leads to toxic concentrations. We did not quantify plasma concentration of treprostinil in the present work, which is a limitation. Here also we can assume that published data are comforting with a limited risk of systemic effects since in humans significant treprostinil plasma concentration was only detected in two subjects (Roustit et al., 2014), and was lower than that found during iv or sc treprostinil infusion (Laliberte et al., 2004). Moreover, no side effects were observed probably because of a favorable tolerability at such concentrations (Mathier et al., 2010). To confirm these data, forthcoming tolerance experiments with models of SSC-related ulcers should be undertaken.

In conclusion, pulsed iontophoresis of treprostinil with a 10 s/50 s (On/Off) protocol at 600 µA increases the efficacy of iontophoresis at 0.064 mM but not at a tenfold higher concentration. Pulsed iontophoresis could be used to optimize treprostinil iontophoresis, to provide similar efficacy with decreased costs, and should now be tested on humans.

#### Acknowledgement

We thank Dr Alison Foote (Grenoble Clinical Research Centre) for editing the English.

#### References

- Blaise, S., Roustit, M., Millet, C., Ribuot, C., Boutonnat, J., Cracowski, J.-L.L., 2011. Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br. J. Pharmacol.* 162, 557–565.
- Blaise, S., Roustit, M., Hellmann, M., Millet, C., Cracowski, J.-L.L., 2013. Cathodal iontophoresis of treprostinil induces a sustained increase in cutaneous blood flow in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 53, 58–66.
- Chen, L.-L.H., Chien, Y.W., 1996. Transdermal iontophoretic permeation of luteinizing hormone releasing hormone: characterization of electric parameters. *J. Control. Release* 40, 187–198.
- Chizmadzhev, Y.A., Indenbom, A.V., Kuzmin, P.I., Galichenko, S.V., Weaver, J.C., Potts, R.O., 1998. Electrical properties of skin at moderate voltages: contribution of appendageal macropores. *Biophys. J.* 74, 843–856.
- Dixit, N., Bali, V., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., 2007. Iontophoresis – an approach for controlled drug delivery: a review. *Curr. Drug Deliv.* 4, 1–10.
- Durand, S., Fromy, B., Bouyé, P., Saumet, J.L., Abraham, P., Bouye, P., et al., 2002. Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms. *J. Vasc. Res.* 39, 59–71.
- Glaser, R.W., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F., Sokirko, A.I., 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta* 940, 275–287.
- Herrick, A.L., 2000. Vascular function in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12, 527–533.
- Inada, H., Ghanem, A.H., Higuchi, W.I., 1994. Studies on the effects of applied voltage and duration on human epidermal membrane alteration/recovery and the resultant effects upon iontophoresis. *Pharm. Res.* 11, 687–697.
- Kalia, Y.N., Naik, A., Garrison, J., Guy, R.H., 2004. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 619–658.
- Kanebako, M., Inagi, T., Takayama, K., 2002a. Evaluation of skin barrier function using direct current I: effects of conductivity, voltage, distance between electrodes and electrode area. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1456–1460.
- Kanebako, M., Inagi, T., Takayama, K., 2002b. Evaluation of skin barrier function using direct current II: effects of duty cycle, waveform, frequency and mode. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1623–1628.
- Kanebako, M., Inagi, T., Takayama, K., 2003. Evaluation of skin barrier function using direct current III: effects of electrode distance, boundary length and shape. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 518–522.
- Knoblauch, P., Moll, F., 1993. In vitro pulsatile and continuous transdermal delivery of busserelin by iontophoresis. *J. Control. Release* 26, 203–212.
- Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Boutonnat, J., Blaise, S., Godin-Ribuot, D., et al., 2013. Anodal iontophoresis of a soluble guanylate cyclase stimulator induces a sustained increase in skin blood flow in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 346, 424–431.
- Laliberte, K., Arneson, C., Jeffs, R., Hunt, T., Wade, M., 2004. Pharmacokinetics and steady-state bioequivalence of treprostinil sodium (Remodulin) administered by the intravenous and subcutaneous route to normal volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44, 209–214.

- Manetti, M., Rosa, I., Milia, A.F., Guiducci, S., Carmeliet, P., Ibbá-Manneschi, L., et al., 2014. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1700–1709.
- Mathier, M.A., McDevitt, S., Saggat, R., 2010. Subcutaneous treprostinil in pulmonary arterial hypertension: practical considerations. *J. Heart Lung Transplant.* 29, 1210–1217.
- Murray, A.K., Herrick, A.L., Gorodkin, R.E., Moore, T.L., King, T.A., 2005. Possible therapeutic use of vasodilator iontophoresis. *Microvasc. Res.* 69, 89–94.
- Murray, A.K., Moore, T.L., King, T.A., Herrick, A.L., 2008. Vasodilator iontophoresis a possible new therapy for digital ischaemia in systemic sclerosis? *Rheumatology (Oxford)* 47, 76–79.
- Nair, V.B., Panchagnula, R., 2004. Influence of electrical parameters in the iontophoretic delivery of a small peptide: in vitro studies using arginine-vasopressin as a model peptide. *Farm (Società Chim Ital)* 59, 583–593.
- Okabe, K., Yamaguchi, H., Kawai, Y., 1986. New iontophoretic transdermal administration of the beta-blocker metoprolol. *J. Control. Release* 4, 79–85.
- Roustit, M., Blaise, S., Arnaud, C., Hellmann, M., Millet, C., Godin-Ribuot, D., et al., 2012. Iontophoresis of endothelin receptor antagonists in rats and men. *PLoS One* 7, e40792.
- Roustit, M., Blaise, S., Cracowski, J.-L., 2014. Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77, 63–71.
- Roustit, M., Gaillard-Bigot, F., Blaise, S., Stanke-Labesque, F., Cracowski, C., Seinturier, C., et al., 2014. Cutaneous iontophoresis of treprostinil in systemic sclerosis: a proof-of-concept study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95, 439–445.
- Sims, S., Higuchi, W., Srinivasan, V., 1992. Skin alteration and convective solvent flow effects during iontophoresis. 2. Monovalent anion and cation-transport across human skin. *Pharm. Res.* 9, 1402–1409.
- Wigley, F.M., Seibold, J.R., Wise, R.A., McCloskey, D.A., Dole, W.P., 1992. Intravenous iloprost treatment of Raynaud's phenomenon and ischemic ulcers secondary to systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 19, 1407–1414.
- Zakzewski, C.A., Amory, D.W., Jasaitis, D.K., Li, J.K., 1992. Iontophoretically enhanced transdermal delivery of an ACE inhibitor in induced hypertensive rabbits: preliminary report. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 6, 589–595.



## **IV. Iontophorèse thérapeutique de treprostinil dans la cicatrisation d'ulcères sur deux modèles murins de sclérodermie**

L'évaluation de l'iontophorèse thérapeutique de treprostinil dans la prise en charge des ulcères digitaux du patient sclérodermique doit nécessairement passer par une étape de preuve de concept dans une étude préclinique avant de pouvoir être sérieusement envisagée dans un essai clinique. Grâce à l'ensemble des travaux menés sur modèle animal, sur volontaires sains et sur patients, nous avons démontré la faisabilité et une partie de la tolérance de notre stratégie thérapeutique.

Face aux besoins de disposer de preuves expérimentales incontestables, nous avons décidé de mener une expérience sur deux modèles murins de sclérodermie : le modèle chimiquement-induit HOCl et le modèle knockout uPAR<sup>-/-</sup>. Les motifs du choix de ces deux modèles ont déjà été présentés dans la première partie de ce document. Il convient toutefois de rappeler, que ces deux modèles sont complémentaires puisque le premier est surtout un modèle de fibrose cutanée localisée tandis que le second est surtout un modèle de vasculopathie. Le même plan expérimental a été appliqué pour chaque modèle.

L'objectif primaire de cette étude est de démontrer l'effet de l'iontophorèse de treprostinil sur la cicatrisation cutanée d'ulcères provoqués sur deux modèles complémentaires de sclérodermie. Le critère principal d'analyse est défini par l'augmentation de la surface de cicatrisation observée dans les groupes traités au cours de la phase précoce et de la phase tardive du processus cicatriciel.

A ce jour, seul le travail sur le modèle HOCl a pu être mené entièrement. Concernant le modèle uPAR<sup>-/-</sup> nous avons été confronté à d'importantes difficultés dans la mise en place de l'élevage. Par conséquent seule la moitié de l'effectif des souris prévues initialement a pu être inclus entraînant un retard important dans notre planning expérimental. En particulier,

l'absence d'une série contrôle sur les souris uPAR<sup>-/-</sup> est une limite importante dans notre interprétation des résultats, de même que certains analyses secondaires comme les données histologiques. Toutefois, disposant d'un certain nombre de résultats intéressants concernant l'objectif primaire de l'étude, nous avons commencé la rédaction d'un manuscrit que nous présentons ici. Il s'agit évidemment d'une première version et certaines parties du manuscrit sont volontairement laissées incomplètes. Les expériences correspondantes à ces parties étant soit en cours soit déjà programmées, nous devrions apporter rapidement les réponses manquantes et ainsi conclure définitivement cette d'étude avant la fin de l'année 2016.

Article en cours : **iontophoresis of treprostinil promotes wound healing in murine models of scleroderma-related ulcers**. Kotzki S, Bouvet R, Abla H, Pagnon A, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Stanke-Labesque F, Cracowski JL, Roustit M.

## **Iontophoresis of treprostinil promotes wound healing in murine models of scleroderma-related ulcers.**

Sylvain KOTZKI<sup>1,2</sup>, Raphael BOUVET<sup>1</sup>, Houda ABLA<sup>1</sup>, Aurélie PAGNON<sup>3</sup>, Océane COMBE<sup>1</sup>,  
Claire ARNAUD<sup>1,2</sup>, Diane GODIN-RIBUOT<sup>1,2</sup>, Françoise STANKE-LABESQUE<sup>1,2,4</sup>, Jean-  
Luc CRACOWSKI<sup>1,2,5</sup>, Matthieu ROUSTIT<sup>1,2,5</sup>

1 Univ. Grenoble Alpes, HP2, F-38000 Grenoble, France;

2 Inserm, HP2, F-38000 Grenoble, France;

3 Novotec, 69007 Lyon, France ;

4. CHU Grenoble-Alpes, Pôle Biologie et Pathologie, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, F-38000 Grenoble, France

5. CHU Grenoble-Alpes, Pôle Recherche, Pharmacologie Clinique Inserm CIC1406, F-38000 Grenoble, France.

Corresponding author:

Matthieu Roustit, Unité de Pharmacologie Clinique, Centre d'Investigation Clinique de Grenoble - Inserm CIC1406, CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09, France

Tel +33 4 76 76 92 60

Fax +33 4 76 76 92 62

E-mail: [MRoustit@chu-grenoble.fr](mailto:MRoustit@chu-grenoble.fr)

Keywords: iontophoresis, treprostinil, microcirculation, wound healing, scleroderma

## INTRODUCTION

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare chronic disease characterized by fibrosis, autoimmune abnormalities and vascular alterations, the latter leading to Raynaud's phenomenon and digital ulcerations (DUs) (Gabrielli et al., 2009). DUs affect about 30% of SSc patients each year, and complications include pain, functional impairment, gangrene and amputations, with a major negative impact on the quality of life (Hachulla et al., 2007; Steen, Denton, Pope, & Matucci-Cerinic, 2009). Few drugs are effective into enhancing wound healing of SSc-related ulcers. Bosentan has been indicated to prevent DUs in patients at risk, but it has no efficacy on existing ulcers (Matucci-Cerinic et al., 2011). While a recent randomized controlled trial suggested a potential efficacy of sildenafil, this remains to be confirmed given that the primary end point was not reached (Hachulla, Hatron, Carpentier, Agard, Chatelus, Jegou, Mouthon, Queyrel, Fauchais, Michon-Pasturel, Jausaud, Mathian, Granel, Diot, Farge-Bancel, Mekinian, Avouac, Desmurs-Clavel, Clerson, et al., 2015).

To date, intravenous iloprost, a prostacyclin analogue, is the only approved treatment for active SSc-related DUs (Kowal-Bielecka et al., 2009). However, its benefit is counterbalanced by dose-limiting vasodilatation-induced side effects (e.g. severe headaches, flushing, tachycardia and hypotension). These properties are dose-limiting and require hospitalization and close monitoring while infusing the drug, which is associated with safety issues and increased costs. The paradox is that impaired digital microvasculature in SSc prevents the drug, when administered intravenously, from diffusing properly into the wound.

Local treatment may be proposed to get around this issue. We previously demonstrated that digital iontophoresis, a noninvasive current-driven drug delivery method, could be used to transport treprostinil, another prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) analogue, into the skin of

rodents, healthy subjects and SSc patients, leading to a significant increase of digital skin perfusion (Blaise et al., 2011; Blaise, Roustit, Hellmann, Millet, & Cracowski, 2013; M. Roustit et al., 2014). This original approach combines the pharmacological effect of the drug to the effect of the current itself. Indeed, endogenous electrical signals in the wound are known to play a role in healing, by increasing the directed migration of keratinocytes, fibroblasts and neutrophils (M Zhao et al., 2006). Exogenous electric stimulation mimics this phenomenon with a positive impact on wound healing (Baltzis, Eleftheriadou, & Veves, 2014; Huttenlocher & Horwitz, 2007).

However, whether iontophoresis of treprostinil enhances healing of SSc-related ulcers has never been demonstrated. Given that iontophoresis protocols on human wounds are complex to set up, experimental data are required to establish the safety and the proof-of-concept before moving on to clinical studies. Given that no animal model of SSc-related ulcers existed to date, the present study aimed at developing mice models of SSc-related ulcerations, and at assessing the efficacy and the safety of iontophoresis of treprostinil in these models.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study design**

We tested two mouse models and their controls: a chemically-induced model using hypochlorous acid (HOCl) (Servettaz et al., 2009), and a genetic model (deletion of the Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor gene,  $uPAR^{-/-}$ ) (Manetti et al., 2013). For each of these 4 conditions, a full-thickness skin excision wound was induced in 24 mice that were subsequently randomized into 3 sub-groups according the treatment to be administered: sham (untreated wound), control (current + vehicle), treprostinil (current +

treprostinil) (Online supplementary Figure S1). Our primary endpoint was to assess whether the combination of treprostinil and current (i.e. iontophoretic administration) accelerates wound healing as compared with current alone or no treatment. We also evaluated anatomical, histological and functional properties of the healed skin, i.e. dermal thickness, microvascular reactivity and endothelial cells, collagen content. All the experiments were approved by the Grenoble Animal Ethics Committee.

## **Animals**

Animals were housed in controlled conditions conforming to the current French legislation, fed with standard mice chow and kept in a day/night cycle of 12h/12h with food and water *ad libitum*. Experiments were systematically performed in a temperature controlled room. When anesthesia was required animals were placed on a thermal pad and the temperature was maintained at 37.5 °C (Harvard apparatus). Mice were anesthetized with isoflurane.

### *HOCl model*

Seven-week-old female BALB/c mice (CERJ, Le Genest-Saint-Isle, France) were randomly distributed into HOCl and control groups (n=24 per group). Mice were anesthetized, shaved and maintained in the prone position for the duration of the whole handling, with the back uppermost. Animals in the HOCl group received two dorsal intradermal injections of 250 µl of HOCl daily during the first five days to generate oxidative stress. Then animals received one daily injection of 200 µl of the same solution five days a week during the next 5 weeks, as previously described (Servettaz et al., 2009). The control group received injections of sterilized phosphate buffered saline (PBS) solution following the same protocol. The thickness of the skin of the shaved back was measured for each mouse

with calipers to ensure that dermal thickness increased. Measurements were performed every week by the same operator.

#### *uPAR<sup>-/-</sup> model*

The uPAR<sup>-/-</sup> mouse model is a recent model of SSc mimicking the vascular and fibrotic features of SSc (Manetti et al., 2013). uPAR<sup>-/-</sup> mice were graciously provided by Prof. Meuth (Munster University, Germany) and crossed with wild-type (uPAR<sup>+/+</sup>) mice on a C57BL/6J background to generate heterozygous mice. The latter were subsequently crossed to generate uPAR<sup>-/-</sup> and their uPAR<sup>+/+</sup> littermates as controls. PCR of tail-tip genomic DNA was performed to determine the absence or presence of a functional uPAR gene.

#### **Wound model**

Mice were anesthetized with isoflurane, shaved, and full-thickness skin excision wound extending through the panniculus carnosus was then performed on the dorsal midline with a sterile 6-mm biopsy punch. A rubber ring (20/27 mm) was centered and fixed around the wound with a bi-component epoxide glue and secured with interrupted 3/0 nylon sutures as previously described (Galiano et al., 2004). Rubber ring splinting was used to minimize wound contraction (Windsor et al., 2009). Synthetic epoxy resin was applied to the perimeter of the rubber ring to improve adhesion to the skin and to protect it from mice bites. Excised tissue was fixed during 24h in an alcohol-formalin-acetic acid solution and then paraffin-embedded for histopathological analysis. Reproducibility and validation of the wound healing model was conducted preliminary to the study (online supplementary data).

#### **Treatment**

Animals in the two treated groups received either treprostinil or vehicle (NaCl 0.9%). Treatment was applied daily from day 0 to day 4 (run 1) and from day 7 to day 12 (run 2). A

2.5 mM solution of treprostinil (Bioprojet Pharma, Paris, France) was prepared from a 6.4mM solution (MW 390.5 g mol<sup>-1</sup>; pKa 4.5) diluted 1:2.5 with NaCl0.9%. A 6.4mM solution of treprostinil was prepared from a 6.4mM solution (MW 390.5 g mol<sup>-1</sup>; pKa 4.5) diluted 1:10 with NaCl0.9%. Solutions were administered with a 20-min cathodal iontophoresis continuous sequence since treprostinil is negatively charged at skin physiological pH. We previously showed that this protocol induces a sustained vasodilation (Blaise et al., 2011; Kotzki, Roustit, Arnaud, Godin-Ribuot, & Cracowski, 2015) (detailed procedures are available as online supplementary material).

### **Wound healing measurement**

Digital photographs of wounds were taken every working day as described in online supplementary material. Pictures were analyzed using a drawing tablet and image analysis software (Image J, <http://rsbweb.nih.gov/ij>) to assess wound area. Area was chosen as parameter since it is considered as the best measure to assess wound size. Each wound area was expressed as percentage of original wound area using the following formula:

### **Microvascular reactivity assessment**

Microvascular function was evaluated immediately before wound induction and after complete healing. We assessed endothelial-dependent and -independent microvascular reactivity using iontophoresis of acetylcholine (Ach) and sodium nitroprusside (SNP), respectively. Laser Doppler Imaging (LDI) was used to measure skin blood flow variations throughout the challenges (refer to online supplementary material for more details).

### **Histology**



6  $\mu\text{m}$ -thick sections of paraffin-embedded samples were stained with Hematoxylin-eosin. Histological slides were photographed and mean dermal thickness was calculated using ImageJ software.

### **Intradermal and plasma concentration of treprostinil after iontophoresis**

Since cutaneous ulcers induce a breach in the skin barrier, iontophoresis over the wound may lead to systemic diffusion of treprostinil, unlike what is observed on non-ulcerated skin (M. Roustit et al., 2014). We used 24 BALB/c healthy mice prepared as previously described and randomly assigned to three groups A, B and C. Group A received treatment on intact skin, group B received treatment immediately post-wounding and group C was treated 3 days post-wounding. Treprostinil was quantified in the skin and the plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (details are provided as online supplementary material).

### **Statistical analysis**

Continuous data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Repeated-measures ANOVA was used to assess wound healing profile during the early phase (D0 to D4) and the late phase (D7 to D12) in each group. Mauchly's test of sphericity was used to assess equality of variance. As inequality of variance could not be excluded a Greenhouse-Geisser adjustment was used. We tested the effect of time, of groups, as well as the interaction between time and groups. Two-sided significance tests were used throughout. We considered  $p$  values  $<0.05$  as significant, corrected by Tukey's procedure for multiple comparisons. T-tests were realized for 2x2 comparisons. Means of wound healing percentages ( $\text{WH}\%_d$ ) on day 1, day 4 and day 7 were analyzed with 1-way ANOVA between compared groups. Area under curves for female and male subgroups in both  $\text{uPAR}^{-/-}$  and

uPAR<sup>+/+</sup> groups were calculated over the whole healing process and analyzed with 1-way ANOVA to test the effect of sex, of genotype and the interaction between sex and genotype. Statistical analysis was performed with SPSS 21.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago IL, USA).

## RESULTS

### Wound healing is delayed in both models of SSc-related ulcers

#### *HOCl model*

Wound healing process was significantly delayed in HOCl group in comparison with PBS injected mice during the early phase ( $p=0.037$ ). On day 4, mean %WH4 in HOCl group was about  $3.2 \pm 9.5\%$  and  $28.7 \pm 11.7\%$  in control group ( $p=0.001$ ) No significant difference was measured between groups during the late phase ( $p=0.999$ ) (figure 1A).

#### *uPAR<sup>-/-</sup> model*

Univariate variance analysis on AUC showed a genotype effect ( $p=0.005$ ) but no gender effect neither gender\*genotype interaction effect, therefore we were able to gather mice by genotype to perform a gender-neutral analysis. In this context, uPAR<sup>-/-</sup> mice presented a significant difference between groups during the early phase ( $p=0.023$ ) and also during the late phase ( $p=0.026$ ). On day 4, mean %WH4 in uPAR<sup>-/-</sup> group was about  $25.0 \pm 16.5\%$  and  $43.2 \pm 11.7\%$  in uPAR<sup>+/+</sup> group ( $p=0.001$ ) (figure 1B).

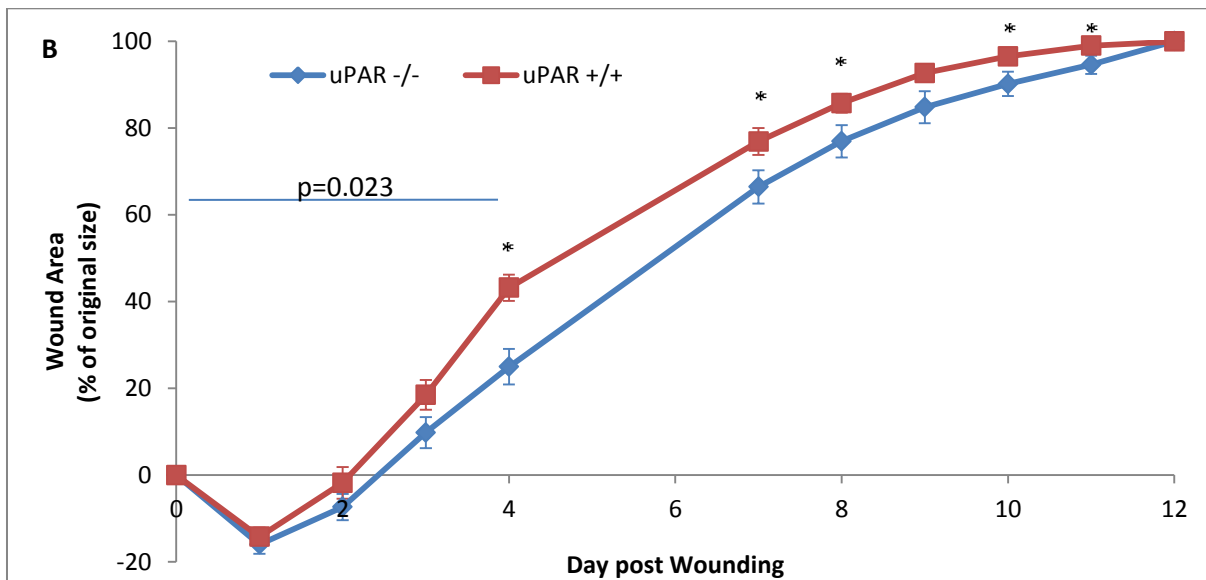
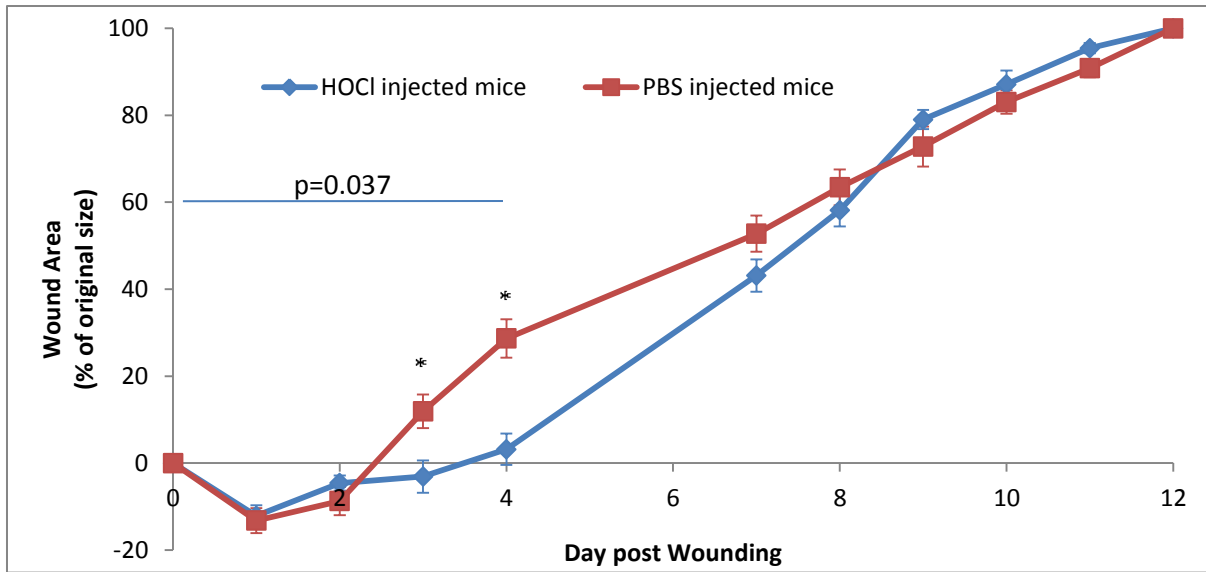


Figure 1. **A.** Wound healing percentage in HOCl injected after a 6-mm biopsy punch in comparison with control group (PBS); **B.** Wound healing percentage in uPAR<sup>-/-</sup> mice after a 6-mm biopsy punch in comparison with wild type mice (uPAR<sup>+/+</sup>). \* p<0.05

### Treprostinil iontophoresis enhances healing in mouse models of SSc-related ulcers

#### HOCl model

During the early phase, we observed a significant difference in wound healing process between sham, control and treprostinil groups (p=0.013). Post-hoc comparison test showed

that treprostinil group presented an accelerated wound healing process in comparison with sham group ( $p=0.012$ ) but not with control group ( $p=0.106$ ). On day 4, mean %WH<sub>4</sub> in sham, control and treprostinil groups were  $3.2\pm 9.5\%$ ,  $8.3\pm 7.9\%$  and  $21.0\pm 9.2\%$  respectively ( $p=0.002$ ). Post-hoc comparison test showed that only treprostinil group presented an increased percentage of wound healing in comparison with both sham ( $p=0.002$ ) and control groups ( $p=0.024$ ). No difference was observed between control and sham group at D4 ([D4] T-test,  $p = 0.513$ ).

Detailed post-hoc analysis on day 1 showed that there was no difference in wound healing percentage between control and treprostinil groups ( $p=0.975$ ) but both showed an increased wound healing percentage in comparison with sham group ( $p=0.028$  and  $p=0.043$ , respectively). No difference was observed between groups during the late phase ( $p=0.096$ ) (figure 2).

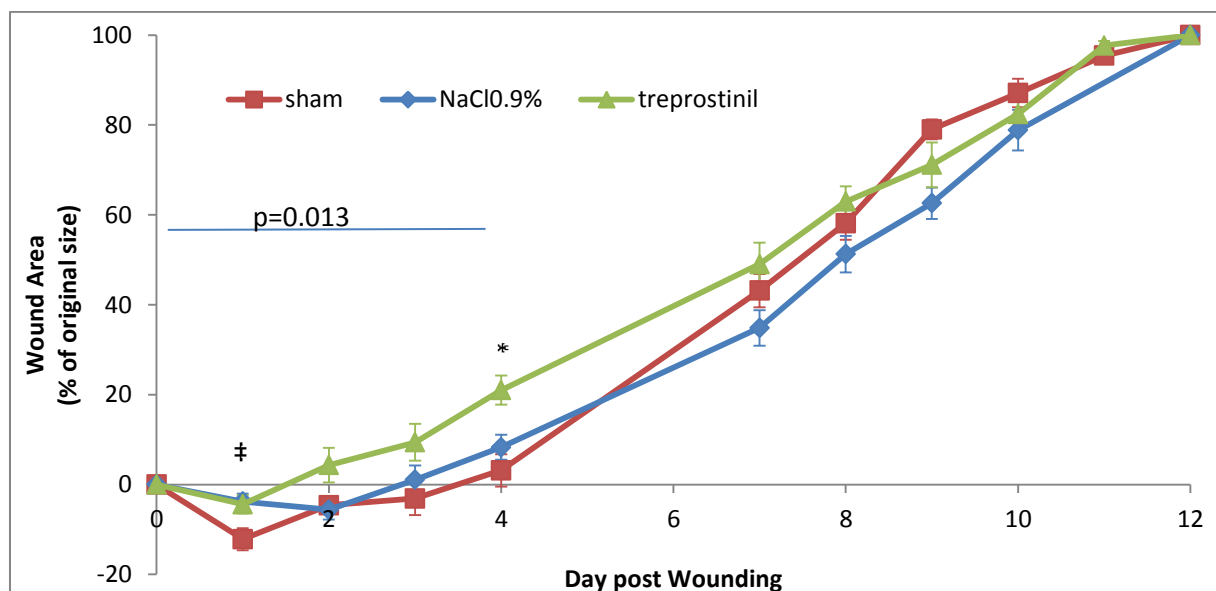


Figure 2. Effect of iontophoresis of treprostinil and NaCl 0.9% on wound healing process on HOCl mice in comparison with sham group. \* $p < 0.05$  for treprostinil vs sham and control; ‡  $p < 0.05$  for treprostinil and control vs sham.

### *uPAR<sup>-/-</sup> model*

During the early phase, we observed a significant difference in wound healing process between sham and treprostinil groups ( $p=0.009$ ). On day 1, mean %WH<sub>1</sub> in sham group was about  $-16.0\pm 8.7\%$  and  $-6.8\pm 6.4\%$  in treprostinil group ( $p=0.011$ ). On day 4, mean %WH<sub>4</sub> in sham group was about  $25.0\pm 16.5\%$  and  $41.6\pm 11.9\%$  in treprostinil group ( $p=0.014$ ). No difference was observed during the late phase between groups ( $p=0.216$ ) (figure 3).

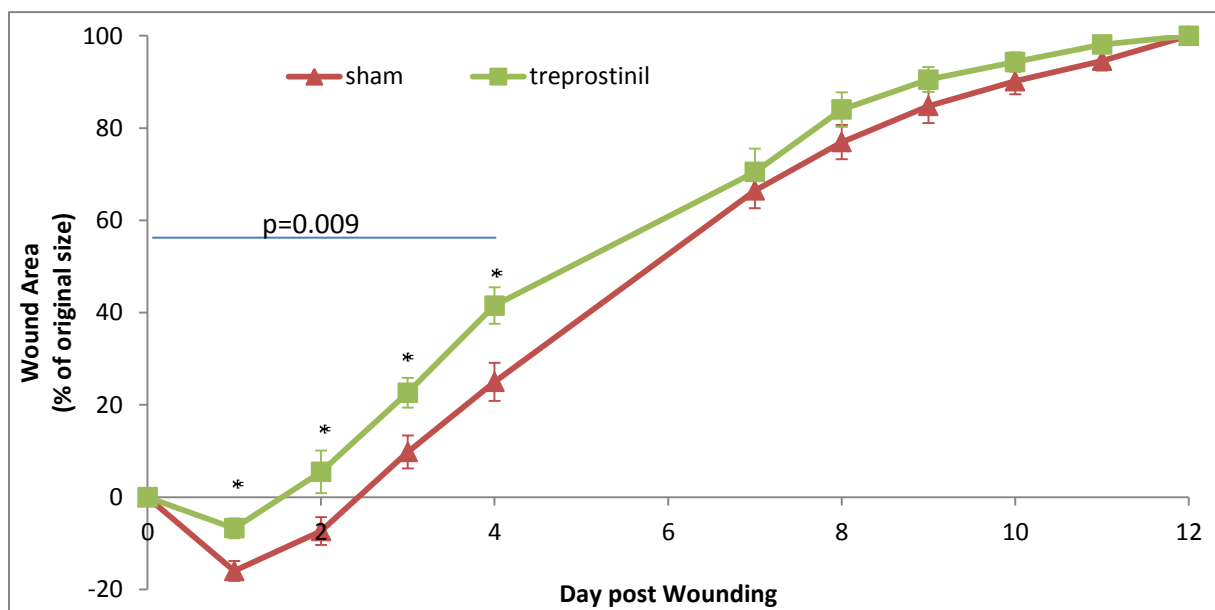


Figure 3. Effect of iontophoresis of treprostinil 0.64mM on wound healing process on  $uPAR^{-/-}$  mice in comparison with sham group. \* $p < 0.05$

### **Effect of the concentration of treprostinil in $uPAR$ model during the early phase**

During the early phase both treprostinil 2.5mM and 0.64mM solutions significantly improved wound healing in comparison with sham group ( $p=0.003$ ). Post-hoc comparison between treprostinil 0.64mM and treprostinil 2.5mM respective effects was not significant ( $p=0.838$ ). However, treprostinil 2.5mM induced a significant increase of WH%<sub>7</sub> on day 7 ( $p = 0.023$ ) (figure 4).

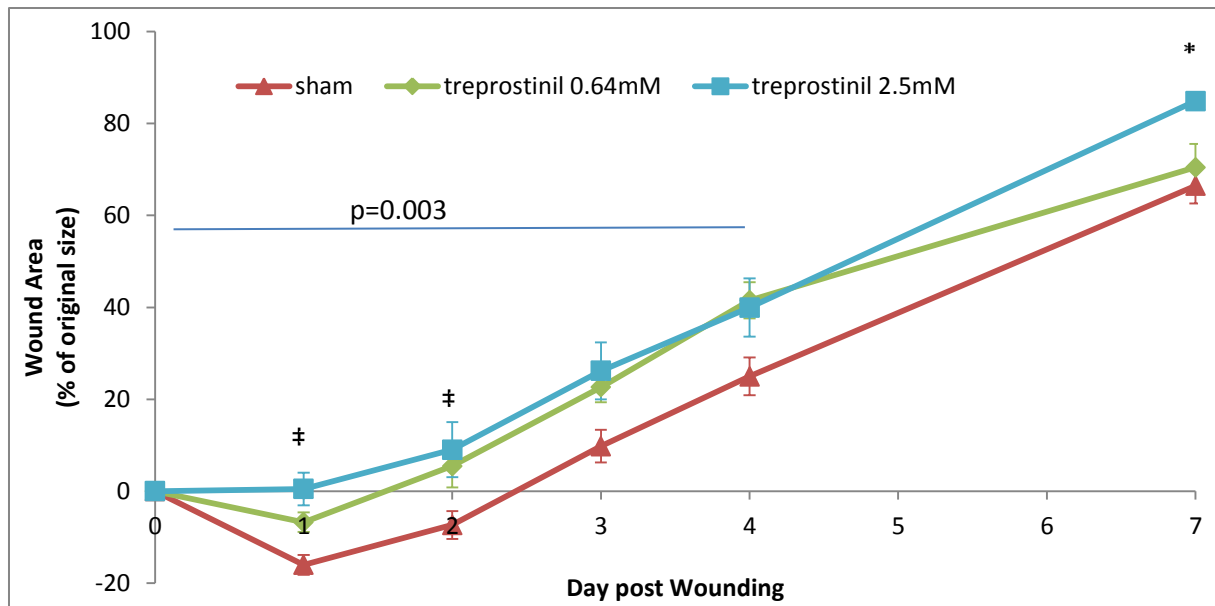


Figure 4. Effect of iontophoresis of treprostinil 2.5mM on wound healing process on  $uPAR^{-/-}$  male mice in comparison with sham group. \* $p < 0.05$  for treprostinil 2.5mM vs treprostinil 0.64mM. ‡  $p < 0.005$  for treprostinil 0.64mM and 2.5mM vs sham

#### Basal skin microvascular response to SNP and Ach

Microvascular response to SNP and Ach were both significantly reduced in HOCl mice in comparison with PBS mice. Decrease percentages were  $40.0 \pm 8.8\%$  ( $p = 0.001$ ) and  $26.9 \pm 5.6\%$ , ( $p < 0.001$ ) for SNP and Ach respectively. In  $uPAR^{-/-}$  mice, a slightly decrease was also observed for both SNP and Ach in comparison with  $uPAR^{+/+}$  but data were not significantly different (figure 5).

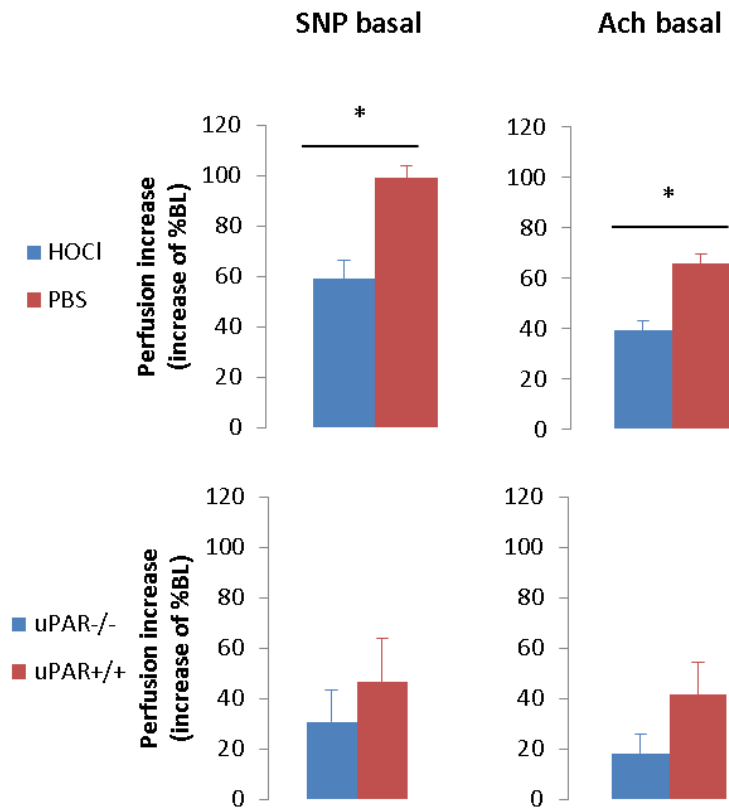


Figure 5. Basal skin microvascular response to SNP and Ach iontophoresis on HOCl and uPAR<sup>-/-</sup> mice in comparison with their respective control. Data are expressed as increase of percentage of baseline.

### Post-recovery skin microvascular response to SNP and Ach

One week after full recovery, no difference was found with iontophoresis of Ach between treprostinil, control and sham group in both models of scleroderma. The same result was observed with the iontophoresis of SNP.

### Effect of treprostinil iontophoresis on dermal thickness

*[in progress]*

### Cutaneous vs systemic concentration of treprostinil after iontophoresis

*[in progress]*

## DISCUSSION

Scleroderma is a complex pathology and there is none existing animal model that can encompass all aspect of the disease related to fibrosis and vasculopathy. In the last decade, many chemical models have been proposed to explore various components of SSc (Asano & Sato, 2013; Avouac et al., 2013; Batteux, Kavian, & Servettaz, 2011; Beyer, Schett, Distler, & Distler, 2010). Among these, a HOCl-induced fibrotic model was recently described as a promising tool to study fibrosis in SSc (Batteux et al., 2011; Servettaz et al., 2009). According to authors, reactive oxygen species generated by intradermal injections of hypochlorous acid (HOCl) modify the phenotype of fibroblasts and lead to dermal fibrosis. To assess wound healing in a model of vascular dysfunction we used the uPAR mouse model, a recently described genetic models of SSc (Manetti et al., 2013). Urokinase-type plasminogen activator receptor is presented as a key component of the fibrinolytic system, and its inactivation was shown to be implicated in SSc-related excessive extracellular matrix production, microvascular abnormalities and impaired angiogenesis (D'Alessio, Gerasi, & Blasi, 2008). Here we first demonstrate that wound healing process is delayed in HOCl and uPAR models of scleroderma.

The primary objective of this study was to assess the iontophoresis of treprostinil on excisional ulcer healing. Treprostinil is a prostacyclin receptor (IP) agonist that induces vascular relaxation of smooth muscle and is used to treat advanced digital ischemia (Engel & Rockson, 2005). IP activation by treprostinil may also be efficient in wound healing since PGI<sub>2</sub> play a role in the promotion of cell migration like fibroblasts (Hatane et al., 1998). Treprostinil is not only a IP agonist but a strong EP<sub>2</sub> agonist too (Whittle, Silverstein, Mottola, & Clapp, 2012). EP<sub>2</sub> activation by butaprost, another PGI<sub>2</sub> analogue, induced the



inhibition of myofibroblasts differentiation and a collagen production (Kolodsick et al., 2003). Improving this EP2 pathway with treprostinil may serve as a potent antifibrotic therapeutic strategy.

Iontophoresis, as drug delivery device, presented two major advantages. In the first hand, it permitted a local administration of treprostinil over the wound without any invasive procedure. In the second hand, the iontophoretic direct current delivered for drug transport presented a cascade of beneficial effects on wound healing. Indeed, exogenous current can mimic the endogenous current-dependent recruitment of inflammatory and proliferative factors (Baltzis et al., 2014; Huttenlocher & Horwitz, 2007), enhances angiogenesis in vivo by fostering directed migration of microvascular (but not macrovascular) endothelial cells (Bai, McCaig, Forrester, & Zhao, 2004) and finally increases microvascular skin perfusion through PGI<sub>2</sub> release, a phenomenon commonly referred to as 'current-induced vasodilation' (Gohin et al., 2011; Matthieu Roustit & Cracowski, 2013).

To our knowledge, this work demonstrated for the time the positive effect of iontophoresis of treprostinil to improve significantly the healing process on excisional cutaneous wounds induced on two various models of scleroderma. The data obtained in both HOCl and uPAR models indicated that the main effect of treprostinil 0.64mM was observed 4 days post-wounding. Our hypothesis is that the pharmacological effects of treprostinil associated to the current properties are mostly efficient to establish the granulation tissue required for the proliferative phase of wound healing process and which is highly dependent of vascular conditions and angiogenesis. The observed effect reflects the synergistic action between the early current effect in cellular recruitment and an improved transport of nutriment and oxygen through vasodilating effect of treprostinil during the first

four days. A fourfold increase of treprostinil concentration did not improve the wound healing process during the first week. This is consistent with a plateau effect of treprostinil as concentration increases, a phenomenon ever described by Blaise et al (Blaise et al., 2011). Interestingly, treprostinil high concentration (2.5mM) induced an increase on wound healing percentage on day 7 in comparison with low concentration (0.64mM). One explanation we proposed is this is due to a release phenomenon that prolonged the effect of treprostinil during the week-end (drug-free period). This should be easily confirmed by intradermal dosing 24h and 48h post-administration in a future experiment. Concerning the current effect alone we showed that it can improve wound healing but effect was limited to the very early phase when neutrophil and fibroblasts are highly recruited for the inflammatory process. Unfortunately, in this protocol we were not able to test various current shapes and intensities like we ever did before (Kotzki et al., 2015) but this could be proposed to further explore the electrical effect on wound healing. To date, the choice between direct, alternative, high-voltage pulsed or low-intensity direct currents to improve cutaneous wound healing is still under debate (Gardner, Frantz, & Schmidt, n.d.; Thakral et al., 2013)

First limitation in this study is that we failed to produce a delayed full recovery time point. Whether it was HOCl, PBS, uPAR<sup>-/-</sup> or uPAR<sup>+/+</sup>, all model were fully re-epithelized 12 days post wounding. The catch-up effect observed from the seventh day of wound healing in sham groups between SSc model and their respective control model can be imputable to the loss or the uncoupling of the anti-contraction ring during the week-end. Contraction, the predominant mechanism of wound healing in rodent, is stronger than re-epithelialization and granulation tissue formation (Davidson, 1998; Galiano et al., 2004), thus when this phenomenon is not limited by an artificial device the delay between healthy and diseased

animal in our models disappears. A second possibility to explain this lack of difference of full recovery time point is that our disease models (HOCl and uPAR<sup>-/-</sup>) mostly affect the early stages of wound healing than the terminal stage of re-epithelialization.

Since digital ulcer formation in SSc is complex and involves multifactorial vascular abnormalities, the choice of an excisional wound model in our study should be discussed too. To our knowledge there is no method to induce comparable ulcers in mice and none murine model of SSc-related ulcers exists. Future experiments may be considered to explore different wounds models on our models of scleroderma, in particular ischemic models. Many methods exist to induce ischemic wounds, and a recent study demonstrated that such kind of lesions can be induced by applying and removing a magnet to a dorsal region of mouse skin (Fromy, Lingueglia, Sigaudou-Roussel, Saumet, & Lazdunski, 2012).

In conclusion, treprostinil iontophoretically-administrated improved the early phase of wound healing process on two complementary models of scleroderma. These promising results should lead to assess the iontophoresis of treprostinil on patients with SSc-related digital ulcers in a clinical trial.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We warmly thank Prof. Meuth from University of Munster, Germany, who provided us with the uPAR<sup>-/-</sup> mice, and Prof Carmeliet from VIB Institute, Leuven, Belgium, who authorized to use it.

## **COMPETING INTERESTS**

## **FUNDING**

This study was funded by a grant from the “Association des Sclérodermiques de France.”

## REFERENCES

- Allanore, Y., Simms, R., Distler, O., Trojanowska, M., Pope, J., Denton, C. P., & Varga, J. (2015). Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 1–21. doi:10.1038/nrdp.2015.2
- Amanzi, L., Braschi, F., Fiori, G., Galluccio, F., Miniati, I., Guiducci, S., ... Matucci-Cerinic, M. (2010). Digital ulcers in scleroderma: staging, characteristics and sub-setting through observation of 1614 digital lesions. *Rheumatology*, *49*(7), 1374–1382. doi:10.1093/rheumatology/keq097
- Asano, Y., & Sato, S. (2013). Animal Models of Scleroderma: Current State and Recent Development. *Current Rheumatology Reports*, *15*(12), 1–9. doi:10.1007/s11926-013-0382-7
- Avouac, J., Elhai, M., & Allanore, Y. (2013). Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine*, *80*(1), 23–28. doi:10.1016/j.jbspin.2012.06.005
- Bai, H., McCaig, C. D., Forrester, J. V., & Zhao, M. (2004). DC Electric Fields Induce Distinct Preangiogenic Responses in Microvascular and Macrovascular Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(7), 1234–1239. doi:10.1161/01.ATV.0000131265.76828.8a
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., & Veves, A. (2014). Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances in Therapy*, *31*(8), 817–836. doi:10.1007/s12325-014-0140-x
- Barnes, R., Shahin, Y., Gohil, R., & Chetter, I. (2014). Electrical stimulation vs. standard care for chronic ulcer healing: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Clinical Investigation*, *44*(4), 429–440. doi:10.1111/eci.12244
- Batteux, F., Kavian, N., & Servettaz, A. (2011). New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*, *23*(6), 511–518. doi:10.1097/BOR.0b013e32834b1606
- Beyer, C., Reich, N., Schindler, S. C., Akhmetshina, A., Dees, C., Tomcik, M., ... Distler, J. H. W. (2012). Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *71*(6), 1019–1026. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200862

- Beyer, C., Schett, G., Distler, O., & Distler, J. H. W. (2010). Animal models of systemic sclerosis: Prospects and limitations. *Arthritis & Rheumatism*, *62*(10), 2831–2844. doi:10.1002/art.27647
- Blaise, S., Roustit, M., Hellmann, M., Millet, C., & Cracowski, J.-L. L. (2013). Cathodal iontophoresis of treprostinil induces a sustained increase in cutaneous blood flux in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, *53*(1), 58–66. doi:10.1177/0091270011434352
- Blaise, S., Roustit, M., Millet, C., Ribuot, C., Boutonnat, J., & Cracowski, J.-L. L. (2011). Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *British Journal of Pharmacology*, *162*(3), 557–65. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01045.x
- Blecher, K., Martinez, L. R., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Schairer, D., Chouake, J., ... Friedman, A. J. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *8*(8), 1364–1371. doi:10.1016/j.nano.2012.02.014
- Brueckner, C. S., Becker, M. O., Kroencke, T., Huscher, D., Scherer, H. U., Worm, M., ... Riemekasten, G. (2010). Effect of sildenafil on digital ulcers in systemic sclerosis: analysis from a single centre pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *69*(8), 1475–1478. doi:10.1136/ard.2009.116475
- Chung, L., Shapiro, L., Fiorentino, D., Baron, M., Shanahan, J., Sule, S., ... Wigley, F. M. (2009). MQX-503, a novel formulation of nitroglycerin, improves the severity of Raynaud's phenomenon: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*, *60*(3), 870–877. doi:10.1002/art.24351
- D'Alessio, S., Gerasi, L., & Blasi, F. (2008). uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR-dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro. *Journal of Cell Science*, *121*(23), 3922–3932. doi:10.1242/jcs.037549
- Davidson, J. M. (1998). Animal models for wound repair. *Archives of Dermatological Research*, *290 Suppl*, S1–11.
- Dumoitier, N., Lofek, S., & Mouthon, L. (2014). Pathophysiology of systemic sclerosis: state of the art in 2014. *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*, *43*(10 Pt 2), e267–78. doi:10.1016/j.lpm.2014.08.001
- Eberhardt, A., Szczypiorski, P., & Korytowski, G. (1986). Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition of skin exudate. *Acta Physiologica Polonica*,

37(1), 41–6.

- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6–265sr6. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
- Engel, G., & Rockson, S. G. (2005). Treprostinil for the treatment of severe digital necrosis in systemic sclerosis. *Vascular Medicine*, 10(1), 29–32. doi:10.1191/1358863x05vm579cr
- Erdmann, E., Semigran, M. J., Nieminen, M. S., Gheorghide, M., Agrawal, R., Mitrovic, V., & Mebazaa, A. (2013). Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *European Heart Journal*, 34(1), 57–67. doi:10.1093/eurheartj/ehs196
- Fromy, B., Lingueglia, E., Sigaudou-Roussel, D., Saumet, J. L., & Lazdunski, M. (2012). ASIC3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nature Medicine*, 29(1), 156–178. doi:10.1038/nm.2844
- Gabrielli, A., Avvedimento, E. V., & Krieg, T. (2009). Scleroderma. *New England Journal of Medicine*, 360(19), 1989–2003. doi:10.1056/NEJMra0806188
- Galiano, R. D., Michaels, V. J., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12(4), 485–492. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x
- Gardner, S. E., Frantz, R. A., & Schmidt, F. L. (n.d.). Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: a meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 7(6), 495–503.
- Gargiulo, S., Greco, A., Gramanzini, M., Esposito, S., Affuso, A., Brunetti, A., & Vesce, G. (2012). Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part II: Anesthetic Considerations in Preclinical Imaging Studies. *ILAR Journal*, 53(1), E70–E81. doi:10.1093/ilar.53.1.70
- Gohin, S., Sigaudou-Roussel, D., Conjard-Duplany, A., Dubourg, L., Saumet, J. L., & Fromy, B. (2011). What Can Current Stimulation Tell Us about the Vascular Function of Endogenous Prostacyclin in Healthy Rat Skin In Vivo? *Journal of Investigative Dermatology*, 131(1), 237–244. doi:10.1038/jid.2010.267
- Goldman, R. J., Brewley, B. I., & Golden, M. A. (2002). Electrotherapy reoxygenates inframalleolar ischemic wounds on diabetic patients: a case series. *Advances in Skin & Wound Care*, 15(3), 112–20.
- Hachulla, E., Clerson, P., Launay, D., Lambert, M., Morell-Dubois, S., Queyrel, V., & Hatron,

- P.-Y. Y. (2007). Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *The Journal of Rheumatology*, *34*(12), 2423–2430.
- Hachulla, E., Hatron, P.-Y., Carpentier, P., Agard, C., Chatelus, E., Jegou, P., ... Clerson, P. (2015). Efficacy of sildenafil on ischaemic digital ulcer healing in systemic sclerosis: the placebo-controlled SEDUCE study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, annrheumdis–2014–207001. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207001
- Hachulla, E., Hatron, P.-Y., Carpentier, P., Agard, C., Chatelus, E., Jegou, P., ... Ninet, J. (2015). Efficacy of sildenafil on ischaemic digital ulcer healing in systemic sclerosis: the placebo-controlled SEDUCE study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, annrheumdis–2014–207001. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207001
- Hatane, T., Yoshida, E., Kawano, J., Sugiki, M., Onitsuka, T., & Maruyama, M. (1998). Prostaglandin I<sub>2</sub> analog enhances the expression of urokinase-type plasminogen activator and wound healing in cultured human fibroblast. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1403*(2), 189–198.
- Humbert, M., Lau, E. M. T., Montani, D., Jais, X., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2014). Advances in Therapeutic Interventions for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, *130*(24), 2189–2208. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006974
- Hummers, L. K., Dugowson, C. E., Dechow, F. J., Wise, R. A., Gregory, J., Michalek, J., ... Wigley, F. M. (2013). A multi-centre, blinded, randomised, placebo-controlled, laboratory-based study of MQX-503, a novel topical gel formulation of nitroglycerine, in patients with Raynaud phenomenon. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *72*(12), 1962–1967. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201536
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2007). Wound Healing with Electric Potential. *New England Journal of Medicine*, *356*(3), 303–304. doi:10.1056/NEJMcibr066496
- Jnger, M., Arnold, A., Zuder, D., Stahl, H.-W. W., Heising, S., Jünger, M., ... Junger, M. (2008). Local therapy and treatment costs of chronic, venous leg ulcers with electrical stimulation (Dermapulse <sup/>): A prospective, placebo controlled, double blind trial. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(4), 480–487. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00393.x
- Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J., & Guy, R. H. (2004). Iontophoretic drug delivery. *Advanced*

- Drug Delivery Reviews*, 56(5), 619–658. doi:10.1016/j.addr.2003.10.026
- Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Nicco, C., Chéreau, C., Lemaréchal, H., ... Batteux, F. (2015). Pantethine Prevents Murine Systemic Sclerosis Through the Inhibition of Microparticle Shedding. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 67(7), 1881–90. doi:10.1002/art.39121
- Kawasaki, L., Mushahwar, V. K., Ho, C., Dukelow, S. P., Chan, L. L. H., & Chan, K. M. (2014). The mechanisms and evidence of efficacy of electrical stimulation for healing of pressure ulcer: A systematic review. *Wound Repair and Regeneration*, 22(2), 161–173. doi:10.1111/wrr.12134
- Kloth, L. C. (2005). Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4(1), 23–44. doi:10.1177/1534734605275733
- Koel, G., & Houghton, P. E. (2014). Electrostimulation: Current Status, Strength of Evidence Guidelines, and Meta-Analysis. *Advances in Wound Care*, 3(2), 118–126. doi:10.1089/wound.2013.0448
- Kolodsick, J. E., Peters-Golden, M., Larios, J., Toews, G. B., Thannickal, V. J., & Moore, B. B. (2003). Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(5), 537–44. doi:10.1165/rcmb.2002-0243OC
- Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Boutonnat, J., Blaise, S., Godin-Ribuot, D., & Cracowski, J.-L. (2013). Anodal iontophoresis of a soluble guanylate cyclase stimulator induces a sustained increase in skin blood flow in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 346(3), 424–31. doi:10.1124/jpet.113.205484
- Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Godin-Ribuot, D., & Cracowski, J.-L. (2015). Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 72, 21–26. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.012
- Kowal-Bielecka, O., Landewe, R., Avouac, J., Chwiesko, S., Miniati, I., Czirjak, L., ... Matucci-Cerinic, M. (2009). EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis*, 68(5), 620–628. doi:ard.2008.096677 [pii]10.1136/ard.2008.096677



- Laschke, M. W., Vollmar, B., & Menger, M. D. (2011). The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *European Cells & Materials*, 22, 147–64; discussion 164–7.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., & Weitzberg, E. (2015). Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(9), 623–641. doi:10.1038/nrd4623
- Manetti, M., Rosa, I., Milia, A. F., Guiducci, S., Carmeliet, P., Ibba-Manneschi, L., & Matucci-Cerinic, M. (2013). Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(9), 1700–1709. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203706
- Maria, A. T., Toupet, K., Bony, C., Pirot, N., Vozenin, M.-C., Petit, B., ... Guilpain, P. (2015). Anti-fibrotic, anti-oxidant and immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in HOCl-induced systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatology*, n/a–n/a. doi:10.1002/art.39477
- Matucci-Cerinic, M., Denton, C. P., Furst, D. E., Mayes, M. D., Hsu, V. M., Carpentier, P., ... Seibold, J. R. (2011). Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*, 70(1), 32–38. doi:ard.2010.130658 [pii]10.1136/ard.2010.130658
- Mertz, P., Davis, S., & Cazzaniga, A. (1993). Electrical stimulation: acceleration of soft tissue repair by varying the polarity. *Wounds*, 5.
- Nguyen-Tu, M.-S., Begey, A.-L., Decorps, J., Boizot, J., Sommer, P., Fromy, B., & Sigaudou-Roussel, D. (2013). Skin microvascular response to pressure load in obese mice. *Microvascular Research*, 90, 138–143. doi:10.1016/j.mvr.2013.10.001
- Peirce, S. M., Skalak, T. C., & Rodeheaver, G. T. (2000). Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 8(1), 68–76.
- Polak, A., Franek, A., & Taradaj, J. (2014). High-Voltage Pulsed Current Electrical Stimulation in Wound Treatment. *Advances in Wound Care*, 3(2), 104–117. doi:10.1089/wound.2013.0445
- Rademaker, M., Cooke, E. D., Almond, N. E., Beacham, J. A., Smith, R. E., Mant, T. G., & Kirby,

- J. D. (1989). Comparison of intravenous infusions of iloprost and oral nifedipine in treatment of Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis: a double blind randomised study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *298*(6673), 561–4.  
doi:10.1136/bmj.298.6673.561
- Roustit, M., Blaise, S., Arnaud, C., Hellmann, M., Millet, C., Godin-Ribuot, D., ... Cracowski, J.-L. L. (2012). Iontophoresis of endothelin receptor antagonists in rats and men. *PLoS One*, *7*(7), e40792. doi:10.1371/journal.pone.0040792
- Roustit, M., Blaise, S., & Cracowski, J.-L. (2014). Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *77*(1), 63–71.  
doi:10.1111/bcp.12128
- Roustit, M., & Cracowski, J.-L. L. (2013). Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(7), 373–384. doi:10.1016/j.tips.2013.05.007
- Roustit, M., Gaillard-Bigot, F., Blaise, S., Stanke-Labesque, F., Cracowski, C., Seinturier, C., ... Cracowski, J.-L. (2014). Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *95*(4), 439–45.  
doi:10.1038/clpt.2013.255
- Scorza, R., Caronni, M., Mascagni, B., Berruti, V., Bazzi, S., Micallef, E., ... Vanoli, M. (2001). Effects of long-term cyclic iloprost therapy in systemic sclerosis with Raynaud's phenomenon. A randomized, controlled study. *Clin Exp Rheumatol*, *19*, 503–8.
- Servettaz, A., Goulvestre, C., Kavian, N., Nicco, C., Guilpain, P., Chéreau, C., ... Batteux, F. (2009). Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *182*(9), 5855–64.  
doi:10.4049/jimmunol.0803705
- Singer, A. J., & Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, *341*(10), 738–746. doi:10.1056/NEJM199909023411006
- Sitbon, O., Channick, R. C., Chin, K. M., Frey, A., Gaine, S., Nazzareno, G., ... McLaughlin, V. (2015). Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*. doi:10.1056/NEJMoa1503184
- Smith, H. W., & Marshall, C. J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(1), 23–36. doi:10.1038/nrm2821
- Stasch, J.-P., & Hobbs, A. J. (2009). NO-independent, haem-dependent soluble guanylate

- cyclase stimulators. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (191), 277–308.  
doi:10.1007/978-3-540-68964-5\_13
- Stasch, J.-P., Pacher, P., & Evgenov, O. V. (2011). Soluble Guanylate Cyclase as an Emerging Therapeutic Target in Cardiopulmonary Disease. *Circulation*, 123(20), 2263–2273.  
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981738
- Steen, V., Denton, C. P., Pope, J. E., & Matucci-Cerinic, M. (2009). Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 48 Suppl 3(1), iii19–24. doi:10.1093/rheumatology/kep105
- Straub, A., Stasch, J.-P., Alonso-Alija, C., Benet-Buchholz, J., Ducke, B., Feurer, A., & Fürstner, C. (2001). NO-Independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(6), 781–784. doi:10.1016/S0960-894X(01)00073-7
- Sussman, C., & Bates-Jensen, B. M. (2012). *Wound care: a collaborative practice manual for health professionals*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Tecilazich, F., Dinh, T., Pradhan-Nabzdyk, L., Leal, E., Tellechea, A., Kafanas, A., ... Veves, A. (2013). Role of Endothelial Progenitor Cells and Inflammatory Cytokines in Healing of Diabetic Foot Ulcers. *PLoS ONE*, 8(12), e83314. doi:10.1371/journal.pone.0083314
- Thakral, G., LaFontaine, J., Najafi, B., Talal, T. K., Kim, P., & Lavery, L. A. (2013). Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabetic Foot & Ankle*, 4(12), 1343–1349.  
doi:10.3402/dfa.v4i0.22081
- Whittle, B. J., Silverstein, A. M., Mottola, D. M., & Clapp, L. H. (2012). Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostinil is a potent DP 1 and EP 2 agonist. *Biochemical Pharmacology*, 84(1), 68–75. doi:10.1016/j.bcp.2012.03.012
- Windsor, M. L., Eisenberg, M., Gordon-Thomson, C., & Moore, G. P. (2009). A novel model of wound healing in the SCID mouse using a cultured human skin substitute. *Australasian Journal of Dermatology*, 50(1), 29–35. doi:10.1111/j.1440-0960.2008.00512.x
- Zhao, M. (2009). Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(6), 674–682.  
doi:10.1016/j.semcdb.2008.12.009
- Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., ... Penninger, J. M. (2006). Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 442(7101), 457–460. doi:nature04925 [pii]10.1038/nature04925

## **A. SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **1. Validation of the wound model**

Preliminary experiments were carried out to compare different biopsy punch sizes and whether or not splinting should be performed. Seven-week-old female BALB/c mice were obtained from CERJ (Le Genest-St-Isle, France). Twenty-four hours before experiments, animals were systematically anesthetized with isoflurane 4% and kept under anesthesia with isoflurane 2% during 30 min to perform a back depilating with clipper and depilatory cream. The next day mice were re-anesthetized and received the experimental procedure.

Four pilot studies were conducted to determine the best full-thickness excisional wound protocol. Three studies served to determine the best wound diameter and a last one was necessary to assess the splinting model.

#### *1.1. Size of the wound*

##### *1.1.1. Protocol*

Experiment #1 included eight mice to compare 2, 3 and 4-mm wound diameters. Full-thickness excisional wounds were induced with biopsy punches (Miltex Instrument Company, York, PA). The punch was lightly twisted to create a uniform circular cut through the skin. The resulting circle of skin is then removed using forceps creating a controlled-size cutaneous wound. Cutaneous biopsies were performed on an area of the animal that would not interfere with the animal's movements or be irritated by the animal's normal activities. Each animal received three wounds (2, 3 and 4-mm) randomly applied on both sides of back.

In experiment #2, we aimed at developing the wound healing monitoring protocol. Experiment #2 was conducted with mice from experiment #1 immediately after wounding. Digital photographs of each wound were taken with a camera coupled with a binocular device (Zeiss Stemi 2000-C). In order to photograph the wounds, animals were secured in a uniform fashion with a scale reference for size measurements. Handling and photographing times were kept to a minimum to minimize stress to the animal, as wound healing is a stress sensitive response. In this way, wounds were re-photographed 5 days per week until full recovery. Digital photographs were analyzed using a drawing tablet and image analysis software (Image J, <http://rsbweb.nih.gov/ij>) to assess wound area.

Experiment #3 was conducted in a second step to assess 6-mm wound diameter. Eight mice were enrolled and received a 6-mm punch. Since splinting model was ever approved when experiment #3 started, mice also received an anti-contraction ring.

#### 1.1.2. Reproducibility of the wound size

Repeatability test showed that using 6, 4 and 3 mm biopsies punches produced reproducible wound area while 2 mm punch biopsy was less performant (data are summarized in table S1). Furthermore, original wound area was positively correlated to punch diameter (Pearson correlation coefficient  $r=0.962$ ) (table S; figure S1).

Table S1. Repeatability of excisional wound.

<b>Punch diameter (mm)</b>	<b>Original wound area ± standard deviation (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Coefficient or variation (%)</b>
<b>6</b>	35,41 ± 4,58	9,16
<b>4</b>	15,53 ± 2,79	12,71
<b>3</b>	9,02 ± 2,11	16,53
<b>2</b>	3,08 ± 1,00	23,10

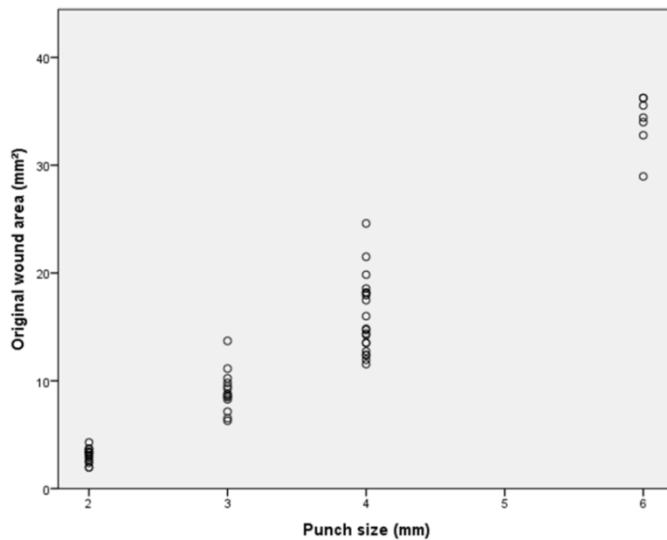


Figure S1. Scatter plot showing Original wound area as function of punch diameter.

Pearson correlation coefficient  $r = 0.962$ .

### 1.1.3. Effect of the size of the wound on healing

Experiment #2 lead to validate the wound healing monitoring protocol based upon daily pictures and the image analysis method. Result from this first pilot study showed that there was no difference between the three groups wound healing process (table S2; figure S2).

Table S2. Statistical analysis of wound healing percentage between 2, 3 and 4 mm groups during the first week and during the whole protocol.

Analysis period	Punch diameter (mm)	Repeated measures ANOVA p_value	AUC ± standard deviation (%.h)	One-way ANOVA p_value
First week analysis (d0 – d4)	2	0,080	11537 ± 1193 h	0,054
	3		12389 ± 1021 h	
	4		12307 ± 795	
Whole protocol analysis (d0 – d12)	2	0,255	47536 ± 2215	0,493
	3		48273 ± 1775	
	4		48202 ± 1409	

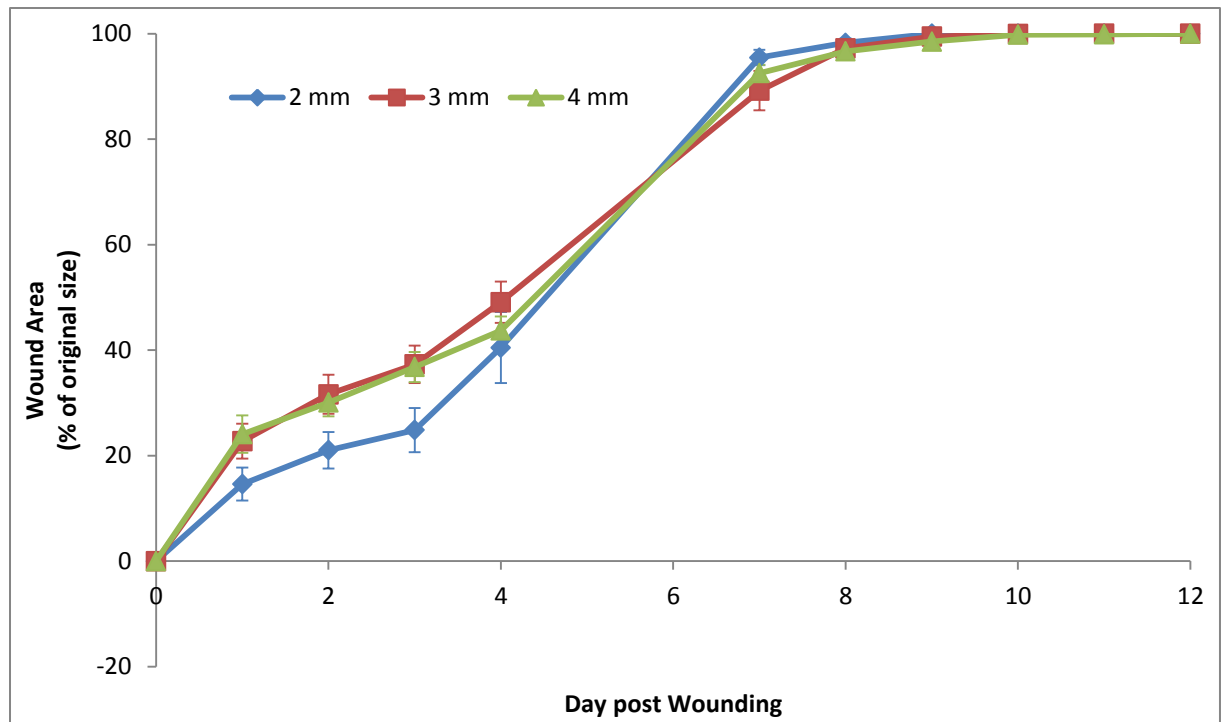


Figure S2. Wound healing percentage of 2, 3 and 4 mm groups.

### 1.2. Splinting model

Eight mice were included in experiment #4. Each animal first received a 4-mm biopsy punch just as described before. In order to limit the early wound contraction phenomenon, a rubber ring (20/27mm) was immediately centered and fixed around the wound with a bi-component epoxide glue and secured with interrupted 3/0 nylon sutures as described by Galiano and Blecher (Blecher et al., 2012; Galiano et al., 2004). Iontophoresis electrode (LI 611, Perilont System, Perimed, Järfälla, Sweden) was inserted into the ring to anticipate future therapeutic protocol. Finally, a synthetic epoxy resin was applied to protect the rubber from mice bites and also to improve adherence with skin (figure S2). Once attached, the device remains installed during the first week. Daily photographs were taken and wound area was measured until full recovery. Data were compared with experiment #2 results.

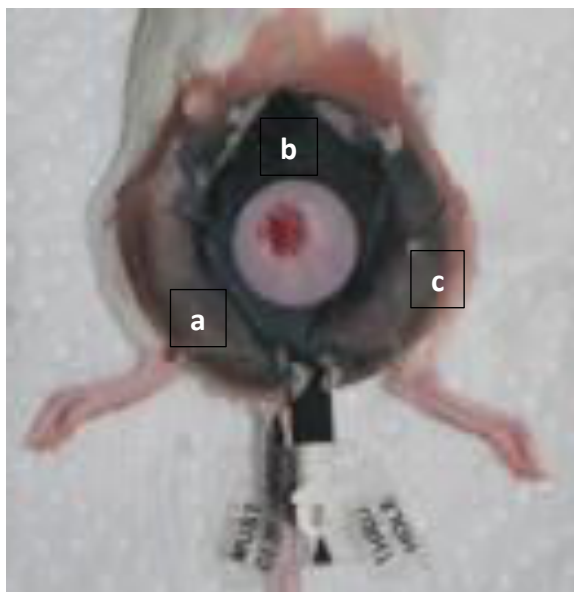


Figure S2. The silicon ring (a) centered and fixed around the full-thickness excisional wound. Iontophoresis electrode (b) is inserted into the ring. Synthetic epoxy resin (c) cover and protect the final device.

Experiment #4 confirmed that anti-contraction ring was able to limit the early contraction phenomenon and induced a delayed wound healing process. Area under curve, expressed in %.h, was  $48201 \pm 1409$  in group with device and  $42224 \pm 1056$  in control group (T-test,  $p < 0.001$ ) (table S3, figure S4).

Table S3. Statistical analysis of wound healing percentage between anti-contraction and control groups during the whole protocol.

Analysis period	group	Repeated measures ANOVA p_value	AUC $\pm$ standard deviation (%.h)	T-test p_value
Whole protocol analysis (d0 – d12)	Anti-contraction	< 0,001	42224 $\pm$ 1056	< 0,001
	Control		48202 $\pm$ 1409	



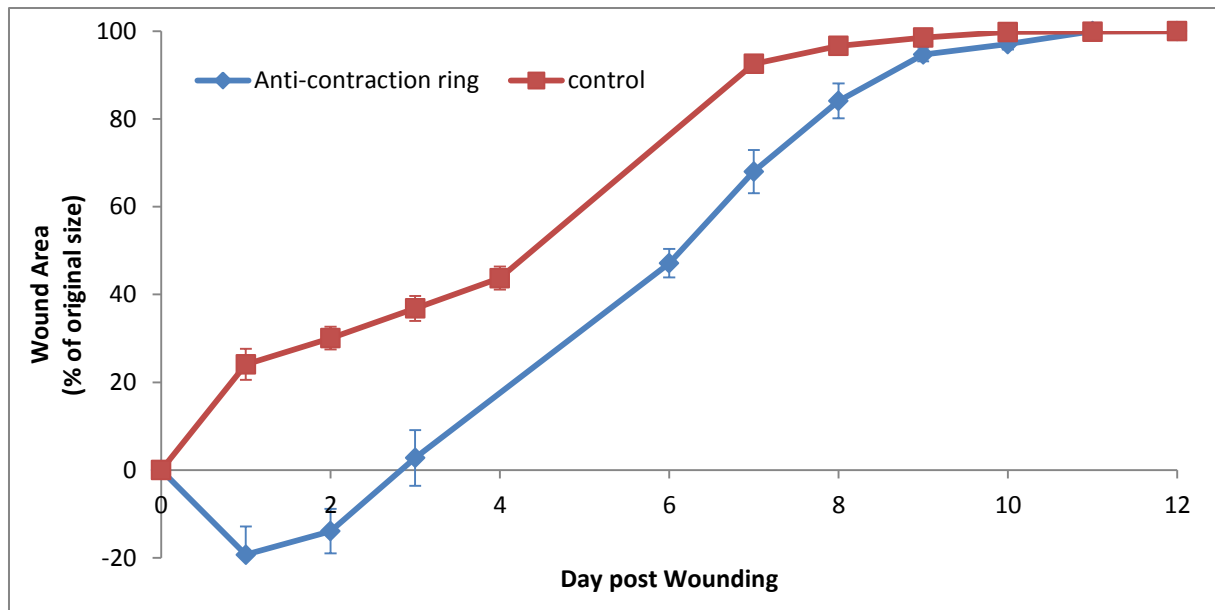


Figure S4. Effect of anti-contraction device on wound healing percentage after a 4 mm biopsy punch in comparison with control group.

## 2. Iontophoresis protocol and experimental procedure

Animals were anesthetized with isoflurane and placed on a thermal pad to maintain the temperature at 37.5°C. A passive electrode (PF 384, Perilont System, Perimed, Järfälla, Sweden) was wrapped around the mouse tail and both active and passive electrode were connected to a constant current generator plugged into a personal computer (Perilont Micro Pharmacology System, Perilont System, Perimed, Järfälla, Sweden). Active electrode was filled with 350  $\mu$ L of treprostinil of vehicle solution. A 100 $\mu$ A current was generated and delivered between the electrodes during 20 minutes. Cutaneous resistance was recorded in real time during the whole sequence.

### **3. Microvascular reactivity assessment**

Before ulcer induction, microvascular reactivity was measured on the whole skin area of interest to determine basal reactivity. After wound recovery, microvascular reactivity was re-assessed. Scarred tissue and healthy peripheral tissue were analyzed distinctly to compare microvascular reactivity of both areas.

Sodium nitroprusside (Serb, Paris, France) (MW 215.9 g mol<sup>-1</sup>) solution was diluted with sterile water to obtain a 38mM solution and acetylcholine was diluted with water saline to obtain a 68mM solution. Iontophoresis probes (LI 611, Perimed, Järfälla, Sweden) were placed on the skin region of interest (ROI) and filled with SNP 38mM or Ach 68mM. A cathodal iontophoresis was performed for 10 min with current set at 100 µA for SNP, and the same protocol with anodal polarity was applied for Ach. Laser Doppler Imaging (LDI) was used to measure skin blood flow variations throughout the challenges. LDI scan head (PeriScan PIM 3 System, Perimed, Järfälla, Sweden) was placed 17 cm above mice skin. The resolution was set at 'medium' (2mm step length) to obtain an acquisition rate of one scan per minute. Skin blood flow was recorded 5 min before, during and 10 min after iontophoresis. Data were expressed as arbitrary perfusion units (PU). In order to take into account inter-individual BL variations, data were subsequently expressed as a percentage change from BL (%BL). Median of the plateau value was calculated over the last five minutes of iontophoresis sequence.

### **4. Quantification of treprostinil**

Twenty-four BALB/c healthy mice were prepared as previously described and randomly allocated to three groups: the first group received a single iontophoresis of treprostinil on healthy skin, the second group received a 6-mm excisional wound followed by

a single iontophoresis over the ulcer, while the third group received a 6-mm excisional wound followed by a single iontophoresis sequence of treprostinil 3 days post-wounding, over granulation tissue. At the end of each iontophoresis sequence, treprostinil solution was collected from the electrode compartment before removing the electrode and stored at 6°C. Exposed area was washed profusely and residual treprostinil adsorbed onto the stratum corneum layer was eliminated by tapes stripping. Peripheral skin exposed to treprostinil iontophoresis was harvested using a scalpel, thoroughly rinsed, dried, weighted and placed into a Precellys® tube containing 500µl of an extraction buffer (methanol/Acetonitril). Extraction of treprostinil from skin was performed by centrifugation with Precellys homogenizers during a 1-min cycle at 5000 rpm. Supernatant was stocked at -80°C. Blood was collected, centrifuged and plasma was stocked at -80°C. Treprostinil was quantified in residual solution, in tissue extract solution and in plasma sample as described by Roustit et al. (M. Roustit et al., 2014). Treprostinil was quantified by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). 100 µl of sample (residual solution, tissue extract solution or plasma) were treated with 120 µL of a precipitation reagent (ZnSO<sub>4</sub> 60 mM/methanol 30/70 v/v) containing the isotope labeled internal standard (6 keto PGF<sub>1α</sub>-d<sub>4</sub>). After vortex-mixing and centrifugation at 20 000 g for 15 min, the supernatant was collected and put in an autosampler vial ready for injection. A two dimensional liquid chromatography was performed. First, an online sample clean-up step was performed on a Perfusion column POROS R1/10 micron 4.6 × 50 mm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with an aqueous mobile phase containing 30% methanol and 0.07% formic acid. Then, the compounds of interest was trapped on the perfusion column were eluted through the analytical column Vydac Denali C18 2 × 150 mm (Grace, Hesperia, CA, USA) housed in the column oven maintained at 60°C. An elution gradient was performed with a mixture of 0.3%

acetic acid in water (eluent A) and acetonitrile (eluent B) with a starting composition of 30% B, increasing to 75% B in 3 min, and with a subsequent clean-up step at 100% for 5 min and a re-equilibration step of 30% B for 1.5 min. The complete two dimensional chromatographic run lasted 11 min per sample.

Measurements was performed on an API 4000 tandem mass spectrometer (ABSciex, Toronto, Canada) equipped with a turbo V<sup>®</sup> ion source. Quantification was achieved in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring two ion transitions for treprostinil (m/z 389.2/331.2 for quantization, m/z 389.2/143.1 for confirmation) and one ion transition for 6 keto PGF1 $\alpha$ -d4 (m/z 373.3/167.1). Calibration curves were calculated by least-square regression with a 1/x weighting with linear regression.

## B. SUPPLEMENTARY RESULTS

### 1. Dermal thickness in HOCl model of scleroderma

Mice that received HOCl injections during 6 weeks presented an increased dermal thickness ( $p < 0.001$ ) (Figure S5). Dermal thickness of mice that received PBS instead was unchanged (data not shown).

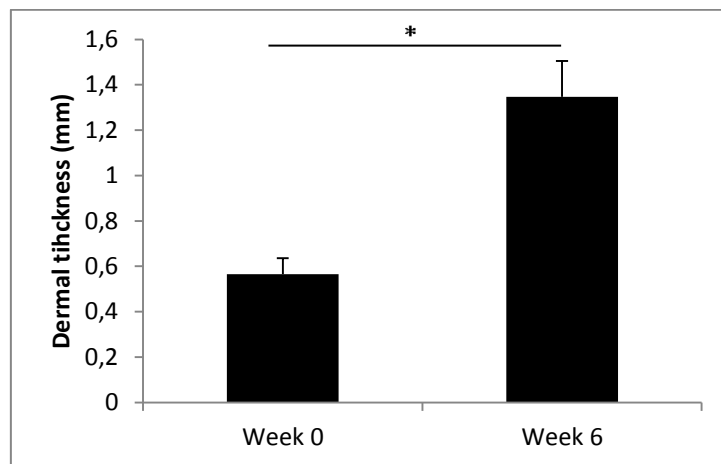


Figure S5. HOCl injection during 6 weeks induced an increase of dermal thickness.\*  
 $p < 0.001$

### 2. Iontophoresis of treprostinil enhanced wound healing process on PBS mice

We observed a significant difference in wound healing process between sham, control and treprostinil groups during the early phase ( $p < 0.001$ ). Post-hoc comparison tests showed that treprostinil increase wound healing process in comparison with both sham and control groups ( $p < 0.001$  with both groups). During the late phase, wound healing was different between the three groups ( $p = 0.014$ ) and treprostinil produced a significant increase in comparison with both sham and control groups ( $p = 0.019$  and  $p = 0.046$ , respectively) (figure S6).

Detailed analysis showed that in sham group the original wound area was significantly lower than in treprostinil group (34.02 mm<sup>2</sup> vs 43.12 mm<sup>2</sup>, p=0.002) and slightly lower than in control group (34.02 mm<sup>2</sup> vs 39.58 mm<sup>2</sup>, p=0.058).

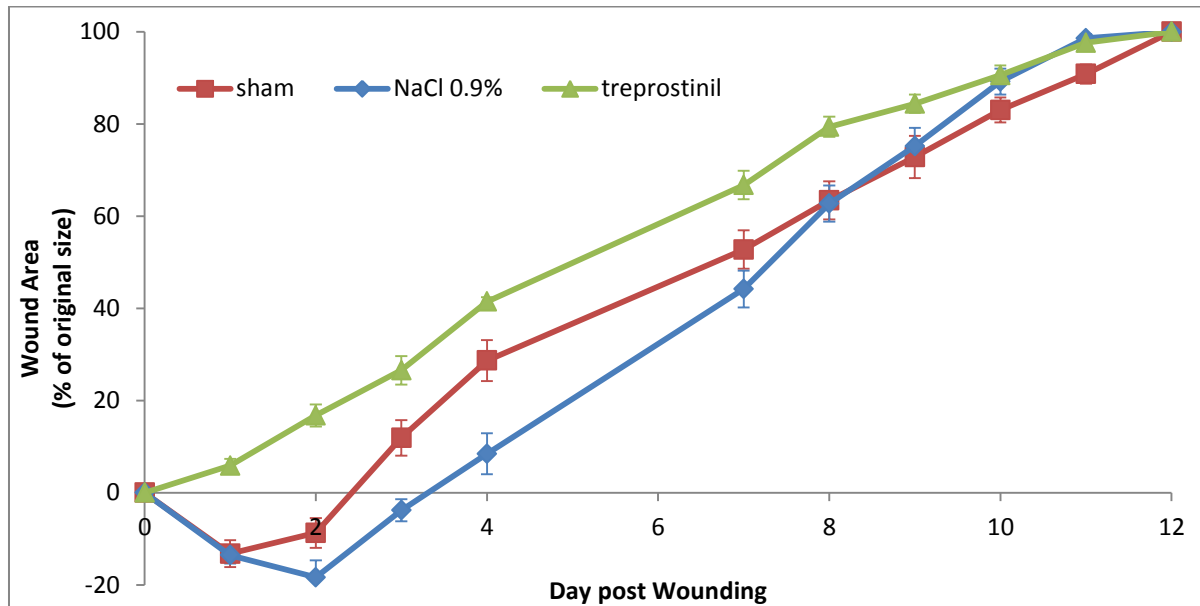


Figure S6. Effect of iontophoresis of treprostinil and NaCl 0.9% on wound healing process on PBS mice in comparison with sham group.

### 3. Iontophoresis of treprostinil enhanced wound healing process on uPAR<sup>+/+</sup> mice

During the early phase, treprostinil treated mice improved wound healing in comparison with sham animals (p=0.015). %WH<sub>1</sub>; %WH<sub>2</sub> and %WH<sub>3</sub> were significantly higher in treprostinil group (p=0.009, p=0.026 and p=0.014, respectively) but %WH<sub>4</sub> was not different between the two groups (p=0.295). During the late phase, wound healing was not different between groups (p=0.173) (figure S7).

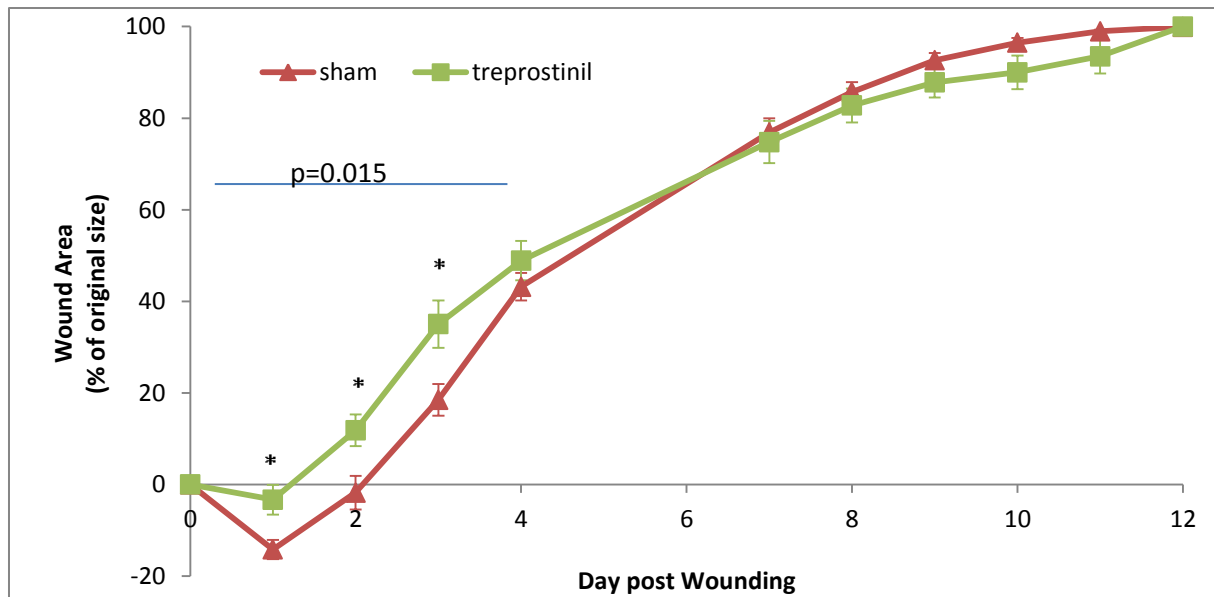


Figure S7. Effect of iontophoresis of treprostini 0.64mM on wound healing process on uPAR<sup>+/+</sup> mice in comparison with sham group. \*p<0.05

#### 4. Iontophoresis of treprostini enhanced wound healing process on HOCl mice with 4-mm wound

We observed a significant difference in wound healing process between sham, control and treprostini groups during the early phase ( $p=0.003$ ). Post-hoc comparison test showed that treprostini group presented an accelerated wound healing process in comparison with sham group ( $p=0.022$ ) and with control group ( $p=0.003$ ). On day 4, %WH<sub>4</sub> was higher in treprostini group than both sham and control groups ( $p = 0.004$  and  $p = 0.002$  respectively). During the late phase, wound healing was different between the three groups ( $p=0.006$ ) and treprostini induced a significant increase in comparison with sham group ( $p=0.024$ ) but not with control group ( $p=0.890$ ) (figure S8).

Original wound area in control group was higher than in sham and treprostini groups with 25.00 mm<sup>2</sup> vs. 16.70 mm<sup>2</sup> and 17.78 mm<sup>2</sup> respectively (1-way ANOVA post-hoc test  $p=0.003$  and  $p=0.009$  respectively).

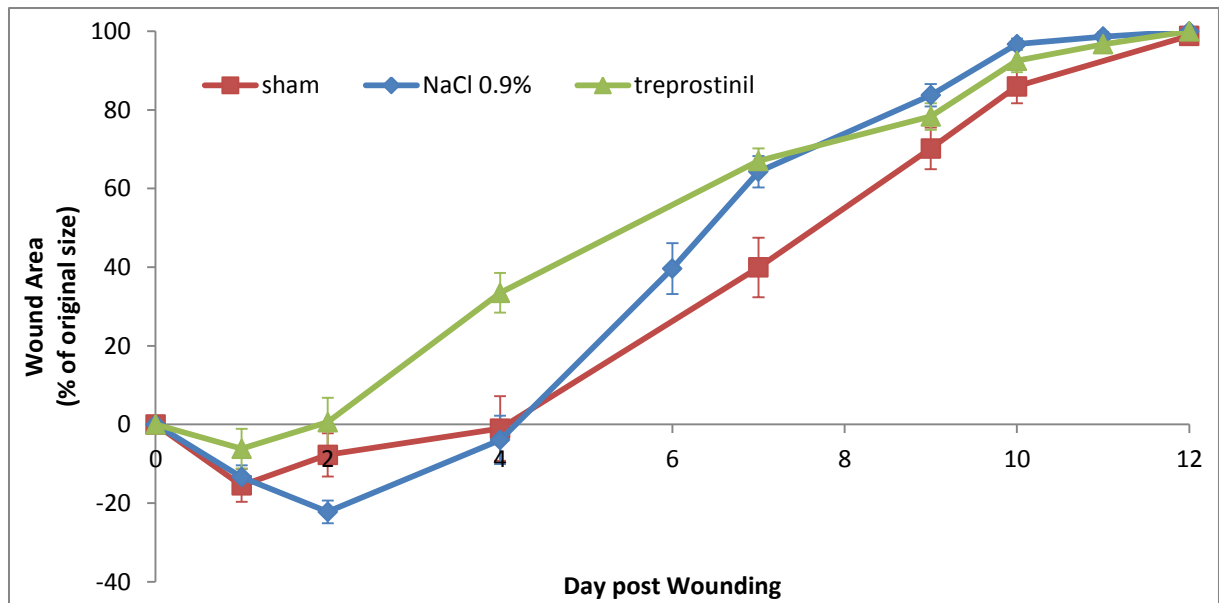


Figure S8. Effect of iontophoresis of treprostinil and NaCl 0.9% on healing process after a 4-mm wound on HOCl mice in comparison with sham group.



### **PARTIE 3. DISCUSSION**

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet à long terme visant à mettre au point une stratégie thérapeutique alternative dans la prise en charge des ulcères digitaux du patient sclérodermique en administrant localement un vasodilatateur par voie iontophorétique. L'idée d'utiliser l'iontophorèse thérapeutique comme voie d'administration est la résultante d'un constat simple : les traitements systémiques engendrent de nombreux effets indésirables et des effets bénéfiques souvent insuffisants. Nous faisons l'hypothèse qu'en administrant un vasodilatateur localement par une méthode active nous serons en mesure de limiter les effets secondaires tout en augmentant la concentration dermique en médicament et ainsi favoriser la cicatrisation des plaies.

Pour mener à bien ce projet, nous avons séparé le travail en deux phases bien distinctes associant études précliniques et études cliniques : A) faisabilité, identification des candidats et tolérance sur peau non lésée ; et B) preuve de concept, preuve d'efficacité et tolérance sur peau lésée. Dans ce travail de thèse j'ai été amené à participer au développement et à l'évaluation préclinique des deux phases.

L'objectif de la phase A est d'identifier un maximum de candidats susceptibles d'induire une augmentation du flux sanguin cutané parmi les classes de vasodilatateurs actifs sur le tonus vasculaire. Un premier modèle animal sur peau saine de rat a été développé pour détecter les molécules capables à la fois d'être transportées par voie iontophorétique et de produire un effet local observable. Quatre classes de molécules ont été étudiées depuis le début du projet: les agonistes du récepteur IP analogues ou non analogue de la PGI<sub>2</sub>, les antagonistes du récepteur à l'endothéline-1, les stimulateurs de la sGC et les activateurs de la sGC. Au total, 12 molécules ont été testées sur le modèle animal de screening. Six ont montré des résultats significatifs (table 2) et pour l'instant quatre ont pu être évaluées chez

le volontaire sain. Les deux derniers candidats n'ayant pas encore d'autorisation de mise sur le marché, leur évaluation chez l'homme n'a pas pu être réalisée à ce jour. L'étape de screening sur animal est absolument nécessaire car chaque molécule possède un profil iontophorétique bien particulier, dépendant des propriétés physicochimiques (charge, polarité, masse moléculaire, taille) et de la formulation (concentration, co-ions, pH), qu'il est impossible de prédire. En comparant brièvement les paramètres des différentes molécules testées nous pouvons effectivement constater que deux molécules comme le cinaciguat et BAY 60-2770 qui sont d'apparence très proches ne produisent finalement pas le même effet. Il est important de préciser que, dans notre modèle, nous utilisons une méthode indirecte pour détecter le transport du candidat dans le derme puisque c'est son effet pharmacodynamique qui est mesuré et non sa concentration tissulaire. Un candidat qui ne produit pas d'effet détectable n'a pas nécessairement un mauvais profil iontophorétique, il se peut tout simplement que la molécule n'ait pas atteint sa cible ou que la cible ne réponde pas comme prévue. Cette incapacité à prédire avec précision le comportement d'un candidat rend obligatoire l'étape préclinique. A l'heure actuelle le treprostinil a franchi avec succès toutes les étapes d'identification, de faisabilité ainsi que de tolérance, et se trouve dans la seconde phase de développement (phase B). Il s'agit du candidat le plus sérieux pour un développement à venir, mais pas ce n'est pas le seul.

Table 2. Propriétés physicochimiques des molécules testées et effet sur la perfusion cutanée sur le modèle de rat

molécules	MW	Surface moléculaire (Å <sup>2</sup> )	Charge à pH 7.4 (%ionisation)	Charge à pH 5 (%ionisation)	Log P	Surface polaire (Å <sup>2</sup> )	Effet sur la perfusion cutanée
epoprostenol	352.46	564	- (99%)	- (79%)	2.42	87	-
iloprost	360.48	565	- (99%)	- (68%)	3.56	78	+
treprostinil	390.51	636	- (99%)	- (95%)	4.00	87	+++
sitaxentan	454.90	549	- (56%)	- (1%)	3.09	107	+
bosentan	551.61	791	- (98%)	- (13%)	4.94	145	-
sin-1	170.17	247	+ (99%)	+ (99%)	-2.06	62	-
CFM 1571	444.95	640	+ (99%)	+ (99%)	3.50	68	+
A-350619	388.95	571	+ (99%)	+ (99%)	4.94	32	++
MRE-269	419.51	658	- (99%)	- (97%)	5.09	75	-
BMY 45778	438.43	581	- (99%)	- (92%)	4.76	98	-
cinaciguat	565.69	878	- (99%)	- (81%)	5.18	87	+
BAY 60-2770	623.22	875	- (99%)	- (83%)	5.30	87	-

Les données encourageantes obtenues lors de la première phase avec les stimulateurs et les activateurs de la guanylate cyclase soluble ouvrent de nouvelles perspectives. Grâce à leur action sur les cellules musculaires lisses, les agonistes de la sGC sont capables de produire une relaxation vasculaire puissante des gros vaisseaux comme cela a été montré avec le riociguat dans l'HTAP et des petits vaisseaux comme nous l'avons observé sur notre modèle animal. A cet effet sur le tonus vasculaire s'ajoute un effet anti-fibrotique particulièrement intéressant et pertinent dans le contexte de la sclérodémie. Beyer et al. ont notamment montré que l'administration d'un stimulateur de la sGC sur deux modèles de fibroses cutanée, TSK-1 et bléomycine, était capable de traiter la fibrose cutanée mais aussi de prévenir sa survenue (Beyer et al., 2012). Ces deux propriétés pharmacologiques font des stimulateurs et surtout des activateurs de la sGC de sérieux candidats pour la seconde phase du développement. Mais avant cela, des expériences sur animal et sur volontaires sains sont encore à prévoir pour s'assurer d'une part que l'effet retrouvé chez l'animal est bien

transposable à l'homme et surtout pour vérifier la tolérance au produit. Un essai de phase II mené avec le cinaciguat sur des patients atteints d'insuffisance cardiaque aigue a dû être arrêté précocement en raison de la survenue d'hypotension sévère chez près d'un tiers des patients traités (Erdmann et al., 2013). Dans cet essai le traitement était administré par voie systémique ce qui peut expliquer l'intensité des hypotensions. En ayant recours à la voie iontophorétique nous espérons limiter ces hypotensions voire les faire disparaître. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont montré que l'iontophorèse de cinaciguat était susceptible de provoquer des hypotensions, mais la baisse de pression artérielle enregistrée était seulement de 5%. Si une telle baisse, correspondant à une hypotension légère, était retrouvée chez l'homme elle ne devrait pas constituer un motif d'arrêt de l'étude. A titre de comparaison les études de tolérances menées chez le volontaire sain et chez le patient SSc avec le treprostinil n'ont montré aucune baisse significative de la pression artérielle. Il faut cependant prendre quelques précautions vis-à-vis des essais de tolérance systémique, que ce soit avec le treprostinil ou avec d'autres molécules. En effet, ces études sont menées sur une peau intègre c'est-à-dire non lésée. Or qu'advient-il lorsque l'administration du vasodilatateur sera appliquée au contact d'un ulcère ? Les études de la première phase du développement ne suffisent pas pour répondre à cette question et seules les études de tolérance de la seconde phase nous y aideront.

La seconde partie du projet a pour objectif de démontrer la faisabilité et l'efficacité de l'iontophorèse de vasodilatateurs sur la cicatrisation d'une plaie dans un contexte de sclérodémie, ainsi que la tolérance systémique aux produits. La partie préclinique de cette phase a requis la mise au point de deux modèles de sclérodémie présentant un retard de cicatrisation : la souris  $uPAR^{-/-}$  et la souris HOCl. Pour les deux modèles, le retard observé concerne surtout la phase précoce de la cicatrisation, c'est-à-dire la période inflammatoire

et le début de la période de prolifération. Au vu de la physiopathologie de ces modèles, ce résultat semble cohérent. La souris uPAR<sup>-/-</sup> est avant tout un modèle de vasculopathie et de fibrose, le retard de cicatrisation dans ce modèle est associé à une dérégulation de la dégradation de la matrice extracellulaire responsable d'un défaut de migration cellulaire et d'angiogénèse. La souris HOCl est un modèle de fibrose associé à un important stress oxydant. Le retard de cicatrisation peut s'expliquer par un défaut de fibrinolyse consécutif à une hyperprolifération des fibroblastes et des composants de la matrice extracellulaire. Les écarts de cicatrisation entre les modèles et leur contrôle respectif atteignent leur maximum entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de cicatrisation, ce qui correspond justement au début de la période de prolifération. Des analyses sur des biopsies de peau prélevées pendant cette période devront être réalisées pour confirmer cette hypothèse avec des données histologiques comme la quantité de collagène ou de myofibroblastes.

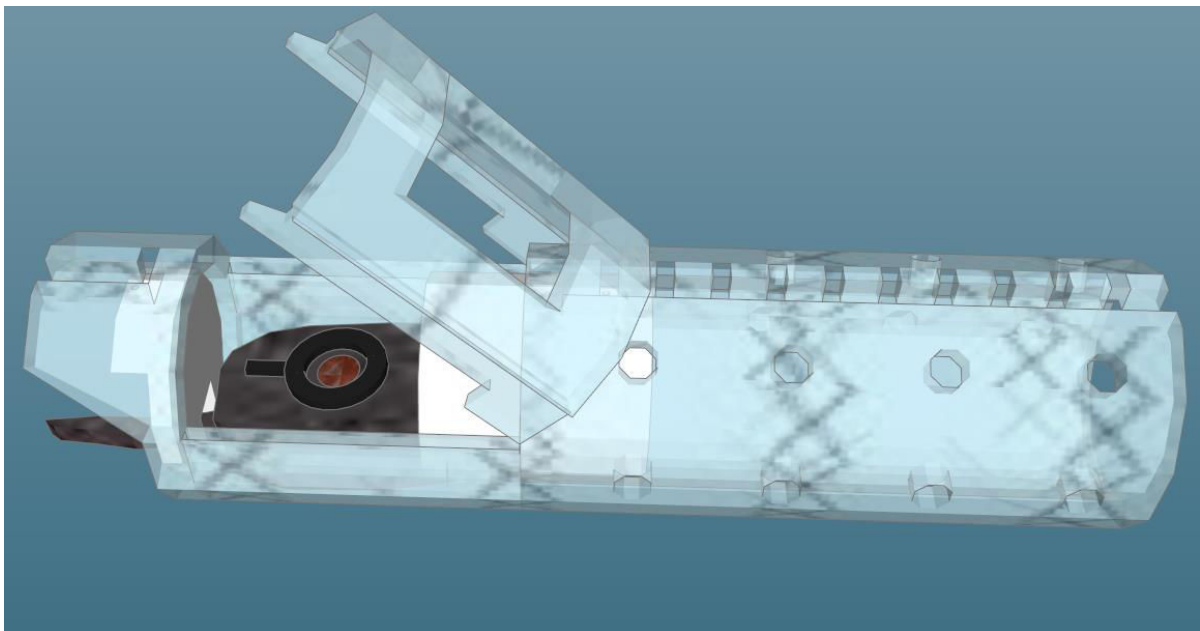
Avec ces deux modèles, nous avons pu montrer que l'iontophorèse de treprostinil améliore la cicatrisation chez les animaux traités. Il s'agit à notre connaissance de la première étude à obtenir ce résultat. En outre, cette amélioration se traduit principalement par une accélération de la cicatrisation entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour par rapport aux animaux non traités. Ceci est cohérent avec l'effet vasodilatateur du treprostinil puisque pendant la phase de prolifération et d'angiogénèse l'approvisionnement en nutriments, en facteurs de croissance et en oxygène est un essentiel. En augmentant le flux sanguin, le treprostinil favorise cet apport tout en améliorant l'efficacité des vaisseaux néoformés. Une expérience supplémentaire sera conduite pour comparer la densité vasculaire pendant cette période de prolifération chez les animaux traités par rapport aux témoins. Bien que très prometteurs, les résultats que nous avons présentés ici sont malheureusement encore insuffisants pour envisager une étude sur des patients sclérodermiques avec des ulcères digitaux. En effet,

notre travail n'a pas encore répondu à la question de la tolérance liée à l'utilisation de l'iontophorèse sur une plaie ouverte. Même si nous avons montré que le treprostinil se retrouve en quantité très faible (inférieur à 1.8 pg/ml) dans la circulation générale après 20 minutes de courant sur une peau non lésée de patients sclérodermiques, rien ne permet d'affirmer que ce taux restera aussi faible si la iontophorèse est appliquée sur une plaie ouverte. Il est probable que les molécules de treprostinil accèdent à la circulation générale en grande quantité, en tout cas tant que le caillot de fibrine n'est pas formé. De plus, lorsqu'une brèche survient sur la peau, le potentiel au cœur de liaison chute brutalement. La surface de peau péri-lésionnelle restée intacte présente alors une polarité négative plus forte que celle dans la lésion. En théorie, cette différence de polarité doit faciliter le transport du courant (et du treprostinil) vers le centre de la plaie. En effet, au cours d'une iontophorèse cathodale en condition physiologique normale, la polarité négative de la peau freine le transport des anions. En appliquant un courant cathodal autour et dans la plaie, le courant emprunte un chemin dirigé vers le niveau de polarité le plus faible c'est-à-dire vers le cœur de la lésion. Le risque d'un tel phénomène serait que le treprostinil se retrouve en forte concentration au centre de la liaison et pénètre dans la circulation générale en forte quantité.

Deux expériences seront menées sur souris saines pour tenter de répondre à cette question. La première consistera à comparer les concentrations plasmatiques et dermiques de treprostinil après iontophorèse entre un groupe d'animaux sans lésion, un groupe d'animaux avec une lésion cutanée sans caillot de fibrine et un groupe d'animaux avec une lésion cutanée où le caillot de fibrine s'est formé. Cette étude devrait nous apporter des informations sur le passage systémique et sur la concentration dermique du treprostinil avec ou sans lésion et surtout avec ou sans caillot. Une seconde expérience s'intéressera à la

mesure de pression artérielle chez des souris pendant l'iontophorèse de treprostinil, avec ou sans lésion, avec ou sans caillot de fibrine. La mesure de pression artérielle sera prise par pléthysmographie sur animal vigile. Techniquement, nous ne sommes pas encore capables de reproduire le protocole de iontophorèse sur un animal conscient mais nous développons un tube de contention spécialement ajouré au niveau dorsal pour rendre accessible l'électrode de iontophorèse (figure 23). Avec à ce tube nous espérons être en mesure de faire des séquences de iontophorèse thérapeutique, des tests de réactivité vasculaire, de la mesure de pression artérielle et des photographies de cicatrisation sans avoir à anesthésier l'animal.

Figure 23. Tube de contention avec une fenêtre amovible donnant accès à la partie dorsale de l'animal



L'anesthésie est une limite importante dans nos modèles. Comme l'a très bien décrit Gargiulo dans deux articles publiés en 2012, l'utilisation d'anesthésiques dans les expériences animales n'est pas triviale et le choix d'une molécule anesthésiante doit être motivé par une connaissance aigüe des propriétés pharmacologiques et des risques

d'interférences avec l'objet d'étude (Gargiulo et al., 2012). L'anesthésie gazeuse est préférable pour les protocoles longs comme le nôtre, les molécules comme l'halothane, l'isoflurane ou sevoflurane préservent mieux la fonction cardiovasculaire que les anesthésiques injectables, ils sont également moins hépatotoxiques ou néphrotoxiques et permettent un réveil plus rapide. En revanche, ces anesthésiques gazeux provoquent une dépression respiratoire, une vasodilatation ou encore une hypotension supérieure à certains agents injectables. Par ailleurs, l'auteur rapporte que plusieurs études ont montré un effet direct de l'anesthésie sur la mesure de flux sanguin au niveau des membres postérieurs. Que ce soit les barbituriques, le mélange xylazine/kétamine ou l'isoflurane, tous modifient la perfusion sanguine de manière plus ou moins importante. Concernant les études de flux sanguin cutané, la majorité des études rapportées ont utilisé un anesthésique injectable, souvent un mélange à base de kétamine. Une étude publiée par l'équipe du Dr. Sigaudou-Roussel a montré que la réactivité microvasculaire endothélium-dépendante pouvait être altérée chez les animaux anesthésiés par isoflurane à forte dose ( $2.1 \pm 0.3\%$ ), probablement en raison d'une inactivation de la voie du NO. Dans notre étude sur les modèles de cicatrisation, tous les animaux des groupes « contrôle » et « treprostinil » reçoivent une anesthésie de 30 minutes par jour, 5 jours consécutifs pendant deux semaines. En choisissant une anesthésie gazeuse nous avons peut-être interféré avec le processus de cicatrisation ou avec l'effet pharmacologique du treprostinil, mais en contrepartie nous avons évité les risques associés à une injection quotidienne d'anesthésique. En développant l'iontophorèse sur animaux vigiles nous améliorerons considérablement notre modèle d'étude préclinique et nos chances d'une meilleure transposition des résultats à l'homme.



Nous avons démontré que l'iontophorèse de treprostnil accélère la cicatrisation des plaies sur le modèle HOCl. La cinétique de cicatrisation des animaux du groupe contrôle n'a pas montré de différence avec le groupe « sham » mis à part au premier jour de cicatrisation. Cette absence de différence peut s'expliquer par un effet trop faible du courant continu sur la cicatrisation. En utilisant un courant continu pulsé, il est possible que nous obtenions de meilleurs résultats dans le groupe recevant le courant seul mais également dans le groupe traité.

L'importance de disposer d'un modèle préclinique performant est essentielle dans le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique. Il sert à démontrer la faisabilité d'une procédure, à faire des études de concept, à donner un aperçu de ce qui peut être attendu chez l'homme, à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Nous avons conscience d'un certain nombre de limites dans le modèle tel qu'il est actuellement et nous travaillons d'ores et déjà sur des améliorations. Passage à des lésions ischémiques à la place des lésions par excision, maintien des animaux à un état de veille compatible avec l'analyse microvasculaire, utilisation de protocoles pulsés de iontophorèse sont des pistes que nous allons explorer.

En conclusion, ce travail de thèse montre que l'iontophorèse thérapeutique est une stratégie prometteuse dans la prise en charge des ulcères digitaux de la sclérodémie. Les travaux les plus avancés ont été réalisés avec le treprostnil un analogue de la PGI<sub>2</sub>. Une étude clinique avec des patients sclérodermiques qui présentent des ulcères digitaux est déjà prévue pour évaluer l'effet du treprostnil sur la cicatrisation. D'autres molécules comme les stimulateurs et les activateurs de la guanylate cyclase soluble seront également testés très prochainement sur nos modèles animaux puis chez l'homme si les résultats obtenus sont satisfaisants. Le modèle que nous avons mis en place est destiné à évoluer

pour se rapprocher encore d'avantage de la pathologie humaine mais aussi pour optimiser notre stratégie dans la prise en charge des troubles trophiques de la sclérodémie systémique.

## INDEX

Ach : acétylcholine

eNOS : NO synthase endothéliale

ET-1 : endothéline-1

FDA : Food and Drug Administration

FGF : fibroblast growth factor

GMP : guanosine monophosphate

GMPc : GMP cyclique

hCMV : human cytomegalovirus

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

HVPC : courant continu pulsé de haute tension

IGF: insulin-like growth factor

IP : récepteurs aux prostaglandines de type I2

KGF: keratinocyte growth factor

LDI : imagerie laser Doppler

MMP : métallo-protéinases matricielles

NO : monoxyde d'azote

PDE5 : phosphodiesterase de type 5

PDGF: platelet-derived growth factor

PGI2 : prostacyline ou prostaglandine de type I2

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SNP : nitroprussiate de sodium

SSc : Sclérodémie Systémique

TGF : transforming growth factor

tPA: plasminogène de type tissulaire

UD : ulcère digital

uPA : plasminogène de type urokinase

uPAR : récepteur de uPA

VEGF: vascular endothelial growth factor

<b>Figure 1.</b> Le processus pathologique de la sclérodermie. ....	12
<b>Figure 2.</b> Les différents stades des lésions retrouvées dans la sclérodermie. ....	14
<b>Figure 3.</b> Manifestations vasculaires périphériques de la sclérodermie systémique : phénomène de Raynaud (à gauche) et ulcération digitale (à droite).....	15
<b>Figure 4.</b> Principales cibles pharmacologiques dans le traitement des ulcères digitaux .....	17
<b>Figure 5.</b> Les classes pharmacologiques de la voie NO-sGC-GMPc .....	19
<b>Figure 6.</b> Mécanismes d'action des stimulateurs et des activateurs de la sGC.....	21
<b>Figure 7.</b> Effets secondaires les plus fréquents des principales classes pharmacologiques utilisées dans le traitement des UD. (adapté de Opitz et al., 2011) .....	24
<b>Figure 8.</b> Le champ électrique de lésion apparaît lorsque la barrière épithéliale est rompue .....	27
<b>Figure 9.</b> Les formes de courant utilisées dans les expériences de cicatrisation par électrostimulation .....	29
<b>Figure 10.</b> Protocole de cicatrisation par électrostimulation HVPC du Dr Sussman.....	32
<b>Figure 11.</b> Implication du complexe uPA/uPAR dans la fibrinolyse .....	37
<b>Figure 12.</b> Modèle de SSc induit par des injections intradermique de HOCl .....	39
<b>Figure 13.</b> La phase inflammatoire lors de la cicatrisation cutanée.....	41
<b>Figure 14.</b> Tissu de granulation sur un ulcère digital au niveau de la pulpe à gauche, et sur un échantillon de peau de cochon coloré à l'hématoxyline et l'éosine à droite (E : cellules de l'épiderme).....	42
<b>Figure 15.</b> La phase de prolifération lors de la cicatrisation cutanée .....	43
<b>Figure 16.</b> Photographies de l'ulcération et mesures de la perfusion sanguine par Laser Doppler Imager au niveau de la zone comprimée, juste après le protocole et 24 heures après. (adapté de (Nguyen-Tu et al., 2013)).....	48
<b>Figure 17.</b> Représentation schématique du transport de médicaments par voie iontophorétique à pH physiologique .....	50
<b>Figure 18.</b> Profile d'ionisation de la molécule de treprostinil en fonction du pH (haut), établi à partir des pKa des fonctions acides de la molécule (bas) .....	54

<b>Figure 19.</b> Les principales avancées menée par l'équipe dans le domaine de l'iontophorèse thérapeutique appliquée aux patients atteints de sclérodermie.....	62
<b>Figure 20.</b> Stimulateurs de la sGC et agonistes IP non analogue de la PGI2. ....	64
<b>Figure 21.</b> Effet de l'iontophorèse de cinaciguat (haut) et de BAY 60-2770 (bas) sur le flux sanguin cutané par rapport au contrôle. ....	78
<b>Figure 22.</b> Protocoles de courant pulsé et de courant continu appliqués pendant 20 minutes.....	80
<b>Figure 23.</b> Tube de contention avec une fenêtre amovible donnant accès à la partie dorsale de l'animal ..	134

## REFERENCES

- Allanore, Y., Simms, R., Distler, O., Trojanowska, M., Pope, J., Denton, C. P., & Varga, J. (2015). Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 1–21. doi:10.1038/nrdp.2015.2
- Amanzi, L., Braschi, F., Fiori, G., Galluccio, F., Miniati, I., Guiducci, S., ... Matucci-Cerinic, M. (2010). Digital ulcers in scleroderma: staging, characteristics and sub-setting through observation of 1614 digital lesions. *Rheumatology*, *49*(7), 1374–1382. doi:10.1093/rheumatology/keq097
- Asano, Y., & Sato, S. (2013). Animal Models of Scleroderma: Current State and Recent Development. *Current Rheumatology Reports*, *15*(12), 1–9. doi:10.1007/s11926-013-0382-7
- Avouac, J., Elhai, M., & Allanore, Y. (2013). Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine*, *80*(1), 23–28. doi:10.1016/j.jbspin.2012.06.005
- Bai, H., McCaig, C. D., Forrester, J. V., & Zhao, M. (2004). DC Electric Fields Induce Distinct Preangiogenic Responses in Microvascular and Macrovascular Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(7), 1234–1239. doi:10.1161/01.ATV.0000131265.76828.8a
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., & Veves, A. (2014). Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances in Therapy*, *31*(8), 817–836. doi:10.1007/s12325-014-0140-x
- Barnes, R., Shahin, Y., Gohil, R., & Chetter, I. (2014). Electrical stimulation vs. standard care for chronic ulcer healing: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Clinical Investigation*, *44*(4), 429–440. doi:10.1111/eci.12244
- Batteux, F., Kavian, N., & Servettaz, A. (2011). New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*, *23*(6), 511–518. doi:10.1097/BOR.0b013e32834b1606
- Beyer, C., Reich, N., Schindler, S. C., Akhmetshina, A., Dees, C., Tomcik, M., ... Distler, J. H. W. (2012). Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *71*(6), 1019–1026. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200862

- Beyer, C., Schett, G., Distler, O., & Distler, J. H. W. (2010). Animal models of systemic sclerosis: Prospects and limitations. *Arthritis & Rheumatism*, *62*(10), 2831–2844. doi:10.1002/art.27647
- Blaise, S., Roustit, M., Hellmann, M., Millet, C., & Cracowski, J.-L. L. (2013). Cathodal iontophoresis of treprostinil induces a sustained increase in cutaneous blood flux in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, *53*(1), 58–66. doi:10.1177/0091270011434352
- Blaise, S., Roustit, M., Millet, C., Ribuot, C., Boutonnat, J., & Cracowski, J.-L. L. (2011). Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *British Journal of Pharmacology*, *162*(3), 557–65. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01045.x
- Blecher, K., Martinez, L. R., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Schairer, D., Chouake, J., ... Friedman, A. J. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *8*(8), 1364–1371. doi:10.1016/j.nano.2012.02.014
- Brueckner, C. S., Becker, M. O., Kroencke, T., Huscher, D., Scherer, H. U., Worm, M., ... Riemekasten, G. (2010). Effect of sildenafil on digital ulcers in systemic sclerosis: analysis from a single centre pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *69*(8), 1475–1478. doi:10.1136/ard.2009.116475
- Chung, L., Shapiro, L., Fiorentino, D., Baron, M., Shanahan, J., Sule, S., ... Wigley, F. M. (2009). MQX-503, a novel formulation of nitroglycerin, improves the severity of Raynaud's phenomenon: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*, *60*(3), 870–877. doi:10.1002/art.24351
- D'Alessio, S., Gerasi, L., & Blasi, F. (2008). uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR-dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro. *Journal of Cell Science*, *121*(23), 3922–3932. doi:10.1242/jcs.037549
- Davidson, J. M. (1998). Animal models for wound repair. *Archives of Dermatological Research*, *290 Suppl*, S1–11.
- Dumoitier, N., Lofek, S., & Mouthon, L. (2014). Pathophysiology of systemic sclerosis: state of the art in 2014. *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*, *43*(10 Pt 2), e267–78. doi:10.1016/j.lpm.2014.08.001
- Eberhardt, A., Szczypiorski, P., & Korytowski, G. (1986). Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition of skin exudate. *Acta Physiologica Polonica*,

37(1), 41–6.

- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6–265sr6. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
- Engel, G., & Rockson, S. G. (2005). Treprostinil for the treatment of severe digital necrosis in systemic sclerosis. *Vascular Medicine*, 10(1), 29–32. doi:10.1191/1358863x05vm579cr
- Erdmann, E., Semigran, M. J., Nieminen, M. S., Gheorghide, M., Agrawal, R., Mitrovic, V., & Mebazaa, A. (2013). Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *European Heart Journal*, 34(1), 57–67. doi:10.1093/eurheartj/ehs196
- Fromy, B., Lingueglia, E., Sigaud-Roussel, D., Saumet, J. L., & Lazdunski, M. (2012). ASIC3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nature Medicine*, 29(1), 156–178. doi:10.1038/nm.2844
- Gabrielli, A., Avvedimento, E. V., & Krieg, T. (2009). Scleroderma. *New England Journal of Medicine*, 360(19), 1989–2003. doi:10.1056/NEJMra0806188
- Galiano, R. D., Michaels, V. J., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12(4), 485–492. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x
- Gardner, S. E., Frantz, R. A., & Schmidt, F. L. (n.d.). Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: a meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 7(6), 495–503.
- Gargiulo, S., Greco, A., Gramanzini, M., Esposito, S., Affuso, A., Brunetti, A., & Vesce, G. (2012). Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part II: Anesthetic Considerations in Preclinical Imaging Studies. *ILAR Journal*, 53(1), E70–E81. doi:10.1093/ilar.53.1.70
- Gohin, S., Sigaud-Roussel, D., Conjard-Duplany, A., Dubourg, L., Saumet, J. L., & Fromy, B. (2011). What Can Current Stimulation Tell Us about the Vascular Function of Endogenous Prostacyclin in Healthy Rat Skin In Vivo? *Journal of Investigative Dermatology*, 131(1), 237–244. doi:10.1038/jid.2010.267
- Goldman, R. J., Brewley, B. I., & Golden, M. A. (2002). Electrotherapy reoxygenates inframalleolar ischemic wounds on diabetic patients: a case series. *Advances in Skin & Wound Care*, 15(3), 112–20.
- Hachulla, E., Clerson, P., Launay, D., Lambert, M., Morell-Dubois, S., Queyrel, V., & Hatron,



- P.-Y. Y. (2007). Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *The Journal of Rheumatology*, *34*(12), 2423–2430.
- Hachulla, E., Hatron, P.-Y., Carpentier, P., Agard, C., Chatelus, E., Jegou, P., ... Clerson, P. (2015). Efficacy of sildenafil on ischaemic digital ulcer healing in systemic sclerosis: the placebo-controlled SEDUCE study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, annrheumdis-2014-207001. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207001
- Hatane, T., Yoshida, E., Kawano, J., Sugiki, M., Onitsuka, T., & Maruyama, M. (1998). Prostaglandin I<sub>2</sub> analog enhances the expression of urokinase-type plasminogen activator and wound healing in cultured human fibroblast. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1403*(2), 189–198.
- Humbert, M., Lau, E. M. T., Montani, D., Jais, X., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2014). Advances in Therapeutic Interventions for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, *130*(24), 2189–2208. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006974
- Hummers, L. K., Dugowson, C. E., Dechow, F. J., Wise, R. A., Gregory, J., Michalek, J., ... Wigley, F. M. (2013). A multi-centre, blinded, randomised, placebo-controlled, laboratory-based study of MQX-503, a novel topical gel formulation of nitroglycerine, in patients with Raynaud phenomenon. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *72*(12), 1962–1967. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201536
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2007). Wound Healing with Electric Potential. *New England Journal of Medicine*, *356*(3), 303–304. doi:10.1056/NEJMcibr066496
- Jnger, M., Arnold, A., Zuder, D., Stahl, H.-W. W., Heising, S., Jünger, M., ... Junger, M. (2008). Local therapy and treatment costs of chronic, venous leg ulcers with electrical stimulation (Dermapulse <sup/>): A prospective, placebo controlled, double blind trial. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(4), 480–487. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00393.x
- Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J., & Guy, R. H. (2004). Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*(5), 619–658. doi:10.1016/j.addr.2003.10.026
- Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Nicco, C., Chéreau, C., Lemaréchal, H., ... Batteux, F. (2015). Pantethine Prevents Murine Systemic Sclerosis Through the Inhibition of Microparticle Shedding. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *67*(7), 1881–90.

doi:10.1002/art.39121

- Kawasaki, L., Mushahwar, V. K., Ho, C., Dukelow, S. P., Chan, L. L. H., & Chan, K. M. (2014). The mechanisms and evidence of efficacy of electrical stimulation for healing of pressure ulcer: A systematic review. *Wound Repair and Regeneration*, 22(2), 161–173. doi:10.1111/wrr.12134
- Kloth, L. C. (2005). Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4(1), 23–44. doi:10.1177/1534734605275733
- Koel, G., & Houghton, P. E. (2014). Electrostimulation: Current Status, Strength of Evidence Guidelines, and Meta-Analysis. *Advances in Wound Care*, 3(2), 118–126. doi:10.1089/wound.2013.0448
- Kolodsick, J. E., Peters-Golden, M., Larios, J., Toews, G. B., Thannickal, V. J., & Moore, B. B. (2003). Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoïd receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(5), 537–44. doi:10.1165/rcmb.2002-0243OC
- Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Boutonnat, J., Blaise, S., Godin-Ribuot, D., & Cracowski, J.-L. (2013). Anodal iontophoresis of a soluble guanylate cyclase stimulator induces a sustained increase in skin blood flow in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 346(3), 424–31. doi:10.1124/jpet.113.205484
- Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Godin-Ribuot, D., & Cracowski, J.-L. (2015). Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 72, 21–26. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.012
- Kowal-Bielecka, O., Landewe, R., Avouac, J., Chwiesko, S., Miniati, I., Czirjak, L., ... Matucci-Cerinic, M. (2009). EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis*, 68(5), 620–628. doi:ard.2008.096677 [pii]10.1136/ard.2008.096677
- Laschke, M. W., Vollmar, B., & Menger, M. D. (2011). The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *European Cells & Materials*, 22, 147–64; discussion 164–7.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., & Weitzberg, E. (2015). Strategies to increase nitric oxide

- signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(9), 623–641.  
doi:10.1038/nrd4623
- Manetti, M., Rosa, I., Milia, A. F., Guiducci, S., Carmeliet, P., Ibba-Manneschi, L., & Matucci-Cerinic, M. (2013). Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(9), 1700–1709. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203706
- Maria, A. T., Toupet, K., Bony, C., Pirot, N., Vozenin, M.-C., Petit, B., ... Guilpain, P. (2015). Anti-fibrotic, anti-oxidant and immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in HOCl-induced systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatology*, n/a–n/a.  
doi:10.1002/art.39477
- Matucci-Cerinic, M., Denton, C. P., Furst, D. E., Mayes, M. D., Hsu, V. M., Carpentier, P., ... Seibold, J. R. (2011). Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*, 70(1), 32–38. doi:ard.2010.130658 [pii]10.1136/ard.2010.130658
- Mertz, P., Davis, S., & Cazzaniga, A. (1993). Electrical stimulation: acceleration of soft tissue repair by varying the polarity. *Wounds*, 5.
- Nguyen-Tu, M.-S., Begey, A.-L., Decorps, J., Boizot, J., Sommer, P., Fromy, B., & Sigaudou-Roussel, D. (2013). Skin microvascular response to pressure load in obese mice. *Microvascular Research*, 90, 138–143. doi:10.1016/j.mvr.2013.10.001
- Peirce, S. M., Skalak, T. C., & Rodeheaver, G. T. (2000). Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 8(1), 68–76.
- Polak, A., Franek, A., & Taradaj, J. (2014). High-Voltage Pulsed Current Electrical Stimulation in Wound Treatment. *Advances in Wound Care*, 3(2), 104–117.  
doi:10.1089/wound.2013.0445
- Rademaker, M., Cooke, E. D., Almond, N. E., Beacham, J. A., Smith, R. E., Mant, T. G., & Kirby, J. D. (1989). Comparison of intravenous infusions of iloprost and oral nifedipine in treatment of Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis: a double blind randomised study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 298(6673), 561–4.  
doi:10.1136/bmj.298.6673.561

- Roustit, M., Blaise, S., Arnaud, C., Hellmann, M., Millet, C., Godin-Ribuot, D., ... Cracowski, J.-L. L. (2012). Iontophoresis of endothelin receptor antagonists in rats and men. *PLoS One*, 7(7), e40792. doi:10.1371/journal.pone.0040792
- Roustit, M., Blaise, S., & Cracowski, J.-L. (2014). Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(1), 63–71. doi:10.1111/bcp.12128
- Roustit, M., & Cracowski, J.-L. L. (2013). Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(7), 373–384. doi:10.1016/j.tips.2013.05.007
- Roustit, M., Gaillard-Bigot, F., Blaise, S., Stanke-Labesque, F., Cracowski, C., Seinturier, C., ... Cracowski, J.-L. (2014). Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 95(4), 439–45. doi:10.1038/clpt.2013.255
- Scorza, R., Caronni, M., Mascagni, B., Berruti, V., Bazzi, S., Micallef, E., ... Vanoli, M. (2001). Effects of long-term cyclic iloprost therapy in systemic sclerosis with Raynaud's phenomenon. A randomized, controlled study. *Clin Exp Rheumatol*, 19, 503–8.
- Servettaz, A., Goulvestre, C., Kavian, N., Nicco, C., Guilpain, P., Chéreau, C., ... Batteux, F. (2009). Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), 5855–64. doi:10.4049/jimmunol.0803705
- Singer, A. J., & Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, 341(10), 738–746. doi:10.1056/NEJM199909023411006
- Sitbon, O., Channick, R. C., Chin, K. M., Frey, A., Gaine, S., Nazzareno, G., ... McLaughlin, V. (2015). Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*. doi:10.1056/NEJMoa1503184
- Smith, H. W., & Marshall, C. J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1), 23–36. doi:10.1038/nrm2821
- Stasch, J.-P., & Hobbs, A. J. (2009). NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (191), 277–308. doi:10.1007/978-3-540-68964-5\_13
- Stasch, J.-P., Pacher, P., & Evgenov, O. V. (2011). Soluble Guanylate Cyclase as an Emerging Therapeutic Target in Cardiopulmonary Disease. *Circulation*, 123(20), 2263–2273.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981738

- Steen, V., Denton, C. P., Pope, J. E., & Matucci-Cerinic, M. (2009). Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, *48 Suppl 3*(1), iii19–24. doi:10.1093/rheumatology/kep105
- Straub, A., Stasch, J.-P., Alonso-Alija, C., Benet-Buchholz, J., Ducke, B., Feurer, A., & Fürstner, C. (2001). NO-Independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *11*(6), 781–784. doi:10.1016/S0960-894X(01)00073-7
- Sussman, C., & Bates-Jensen, B. M. (2012). *Wound care: a collaborative practice manual for health professionals*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Tecilazich, F., Dinh, T., Pradhan-Nabzdyk, L., Leal, E., Tellechea, A., Kafanas, A., ... Veves, A. (2013). Role of Endothelial Progenitor Cells and Inflammatory Cytokines in Healing of Diabetic Foot Ulcers. *PLoS ONE*, *8*(12), e83314. doi:10.1371/journal.pone.0083314
- Thakral, G., LaFontaine, J., Najafi, B., Talal, T. K., Kim, P., & Lavery, L. A. (2013). Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabetic Foot & Ankle*, *4*(12), 1343–1349. doi:10.3402/dfa.v4i0.22081
- Whittle, B. J., Silverstein, A. M., Mottola, D. M., & Clapp, L. H. (2012). Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostinil is a potent DP 1 and EP 2 agonist. *Biochemical Pharmacology*, *84*(1), 68–75. doi:10.1016/j.bcp.2012.03.012
- Windsor, M. L., Eisenberg, M., Gordon-Thomson, C., & Moore, G. P. (2009). A novel model of wound healing in the SCID mouse using a cultured human skin substitute. *Australasian Journal of Dermatology*, *50*(1), 29–35. doi:10.1111/j.1440-0960.2008.00512.x
- Zhao, M. (2009). Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *20*(6), 674–682. doi:10.1016/j.semcdb.2008.12.009
- Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., ... Penninger, J. M. (2006). Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, *442*(7101), 457–460. doi:nature04925 [pii]10.1038/nature04925