



HAL
open science

Fragilité cutanée et cicatrisation retardée de l'ulcère de pression avec la neuropathie diabétique: étude dans un modèle murin

Noëlle Remoué

► **To cite this version:**

Noëlle Remoué. Fragilité cutanée et cicatrisation retardée de l'ulcère de pression avec la neuropathie diabétique: étude dans un modèle murin. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT: 2020LYSE1010 . tel-02467724

HAL Id: tel-02467724

<https://theses.hal.science/tel-02467724v1>

Submitted on 5 Feb 2020

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1010

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat :
Biologie moléculaire et cellulaire

Soutenue publiquement le 23/01/2020, par :
Noëlle Remoué

**Fragilité cutanée et cicatrisation
retardée de l'ulcère de pression avec la
neuropathie diabétique : étude dans un
modèle murin**

Devant le jury composé de :

Pr BOLZINGER Marie-Alexandrine, PU, Université Lyon 1	Présidente
Pr BERTHOD François, PU, Université de Laval (Canada)	Rapporteur
Dr DEMIOT Claire, MCU, Université de Limoges	Rapporteuse
Pr MISERY Laurent, PU-PH, CHRU de Brest	Rapporteur
Dr AUXENFANS Céline, PH, HCL Hôpital Edouard Herriot	Examinatrice
Dr SIGAUDDO-ROUSSEL Dominique, DR, CNRS UMR 5305	Directrice de thèse
Dr BOUSCHBACHER Marielle, Responsable industrielle, Labo. URGO	Invitée

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOSNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Résumé

La peau est un organe complexe et sa réparation fait intervenir de multiples cellules et molécules selon un processus spatio-temporel fin. Lorsque ce processus est perturbé, la cicatrisation n'aboutit plus, elle est dite chronique, et c'est un problème majeur de santé publique, causant morbidité et mortalité importantes.

Le « pied diabétique » est l'une de ces plaies chroniques et est responsable, en l'absence de traitement actuellement efficace, de l'amputation d'un l'orteil, du pied ou de la jambe de près de 10 % des patients diabétiques au cours de leur vie.

La neuropathie périphérique, dysfonction et destruction des fibres nerveuses, est une complication du diabète qui touche 30 à 50 % des patients et est le facteur de risque principal dans le développement du pied diabétique.

Ainsi, afin d'améliorer la compréhension de la survenue du pied diabétique et de sa mauvaise cicatrisation, dans ce travail de thèse nous avons étudié sur la souris l'impact de la neuropathie diabétique et de sa sévérité sur i/ la structure et les propriétés physiques de la peau pouvant conduire à une fragilité, puis sur ii/ la durée de fermeture de la lésion, les processus de cicatrisation modifiés, et les molécules différemment exprimées.

Pour ceci, nous avons développé et breveté un modèle d'induction de lésions sur souris combinant les facteurs à l'origine du pied diabétique : pression et friction. Ce modèle original a permis d'observer que la peau est fragilisée dès l'atteinte de petites fibres nerveuses cutanées avec le diabète, et que l'atteinte supplémentaire des grosses fibres nerveuses myélinisées aggrave cette fragilité. Cela conduit à des ulcères de pression dont la cicatrisation est d'autant plus retardée que la neuropathie diabétique est sévère. Cette durée de fermeture de la lésion semble due à un retard de réépidermisation, notamment via une dérégulation de l'expression, de l'assemblage et de la maturation du complexe RAMP1-CLR-RCP, récepteur du CGRP.

Mots clés : peau, cicatrisation, diabète, neuropathie, ulcère de pression, épiderme, neuromédiateurs, CGRP.

Abstract

The skin is a complex organ and its repair involves multiple cells and molecules in a specific spacio-temporal process. When this process is disrupted, healing is no longer successful, leading to chronic wound, which is a major public health issue, causing significant morbidity and mortality.

The "diabetic foot ulcer" is one of these chronic wounds and is responsible, in the absence of effective treatment, for amputation of a toe, foot or leg of almost 10 % of diabetic patients during their lifetime.

Peripheral neuropathy, which is a dysfunction and destruction of nerve fibers, is a complication of diabetes that affects 30-50% of patients and is the major risk factor in diabetic foot ulcer development.

Thus, in order to improve the understanding of diabetic foot ulcer occurrence and its impaired healing process, in this thesis work we studied on mice the impact of diabetic neuropathy and its severity on i/ the structure and the physical properties of skin that can lead to fragility, then on ii/ the duration of wound closure, the impaired healing processes, and the molecules differently expressed.

For this, we developed and patented a mouse lesion induction model combining the factors responsible for the diabetic foot ulcer: pressure and friction. This original model allowed to observe that the skin is weakened as soon as small cutaneous nerve fibers are affected by diabetes, and that the additional degradation of the myelinated large nerve fibers increases this fragility. This leads to pressure ulcers with the more severe neuropathy, the more wound healing delay. This PhD study highlighted the involvement of the CGRP pathway, via the deregulation of the expression, the assembly and the maturation of its receptor complex RAMP1-CLR-RCP, that could participate in delaying reepithelialization.

Thesis title: "Cutaneous fragility and delayed healing process of pressure ulcer with diabetic neuropathy: study in a mouse model".

Key words: skin, wound healing, diabetes, neuropathy, pressure ulcer, epidermis, neuromediators, CGRP.



Lieu de réalisation de la thèse

Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP)
UMR-5305 CNRS UCBL1 Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTi)
Equipe : Fonctionnalité et Dynamique du Tissu Cutané
7 passage du Vercors
69367 LYON Cedex 07
France

Financement

Ce travail de thèse a été entièrement financé par les Laboratoires URGO, département Recherche Innovation et Développement (thèse CIFRE).

Encadrement

La thèse a été encadrée par Dr Dominique Sigaud-Roussel (CNRS 5305) et Dr Marielle Bouschbacher (Laboratoires URGO).

À Jérôme, à Alban ... et à ma thèse

« Tu es entré dans ma vie, tu y occupes la première place, tu as opéré ce changement spectaculaire, cette merveilleuse dévastation, rien ne sera plus pareil, rien n'est déjà plus pareil. »

Philippe Besson, En l'absence des hommes

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES ILLUSTRATIONS	12
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ET BREVET	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
ÉTAT DE L'ART	21
I. Fonctions et structure de la peau humaine	23
1. L'épiderme.....	24
2. La jonction dermo-épidermique ou lame basale.....	26
3. Le derme.....	26
4. Le tissu adipeux dermique.....	27
5. Les annexes de la peau	28
6. L'innervation cutanée.....	29
a. Les fibres nerveuses autonomes.....	30
b. Les fibres nerveuses sensibles	30
i. Le récepteur TRPV1	32
ii. Le récepteur TRPA1	33
c. La communication nerfs-peau	33
II. La cicatrisation de la peau	34
1. Les phases de la cicatrisation non pathologique.....	34
a. La phase d'hémostase.....	34
b. La phase inflammatoire	35
c. La phase de prolifération cellulaire.....	36
d. La phase de remodelage	37
2. Le rôle des neuromédiateurs dans la cicatrisation.....	38
a. Les neurotransmetteurs.....	38
i. L'acétylcholine.....	38
ii. Les catécholamines	39
b. Les neuropeptides : la substance P et le CGRP en détail	39
i. La substance P	39
ii. Le CGRP	40
c. Les neurotrophines : cas du NGF	43
III. La souris, modèle d'étude de la cicatrisation	45
1. Intérêts de la souris de laboratoire	45
2. Comparaison de la structure et du processus de cicatrisation entre peaux humaine et murine.....	45
IV. Diabète et cicatrisation cutanée	49
1. Le diabète : définition, types, causes et complications.....	49
2. Etiologie de l'ulcère du pied diabétique.....	50
a. Contraintes physiques.....	51
i. Définition de la lésion de pression	51
ii. Classification des lésions de pression.....	52
iii. Étiologie de la lésion de pression	53
b. Atteinte vasculaire	55
c. Neuropathie périphérique	55
d. Risque infectieux.....	57
3. Marqueurs biologiques cutanés et défaut de cicatrisation.....	57
a. Modèles murins pour l'étude du développement et de la cicatrisation de l'ulcère du pied diabétique	58

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	63
MATÉRIELS ET MÉTHODES	67
I. Techniques in vivo sur animal	69
1. Animaux.....	69
2. Induction du diabète de type 1	69
a. Mesure de la glycémie	69
b. Injection de streptozotocine	69
3. Evaluation de la neuropathie périphérique.....	70
a. Test « Tail Flick »	70
b. Mesure de la MNCV	71
c. Densité IENF.....	73
4. Dépilation des souris	73
5. Caractérisation structurelle et physique de la peau non lésée	74
a. Mesure des épaisseurs des couches cutanées.....	74
b. Mesure de l'hydratation cutanée	75
c. Mesure des propriétés mécaniques cutanées	75
6. Induction d'une lésion d'excision pour la validation de la grille CROMT	76
7. Induction d'un ulcère de pression et suivi de sa cicatrisation	76
a. Induction d'un ulcère de pression	76
b. Suivi de la cicatrisation de l'ulcère de pression par évaluation macroscopique.....	78
i. Mesure de la surface macroscopique de lésion	78
ii. Evaluation macroscopique du jour de fermeture	78
8. Mise à mort et prélèvement d'échantillons de peau	79
a. Mise à mort de la souris.....	79
b. Prélèvement d'échantillon de peau.....	79
II. Méthode de validation de la grille CROMT pour l'évaluation visuelle de la fermeture d'une lésion chez la souris	80
1. Étude A	80
a. Photos présentées et description du panel de volontaires	80
b. Recrutement et déroulement de l'étude	81
c. Analyse des résultats	81
2. Étude B	81
a. Photos présentées et description du panel de volontaires	82
b. Recrutement et déroulement de l'étude	82
c. Analyse des résultats	82
III. Technique de culture ex vivo de peau de souris.....	83
1. Culture de peau <i>ex vivo</i> et induction d'une lésion de pression	83
2. Etude de la cicatrisation <i>ex vivo</i>	84
a. Évaluation histologique.....	84
b. Test de viabilité cellulaire au MTT	84
c. Analyse du sécrétome.....	84
IV. Technique d'analyse de l'expression génique	86
1. Extraction des ARN	86
2. RTqPCR des ARN messagers	87
a. Transcriptase inverse	87
b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel	88
c. Interprétation des résultats	88
V. Techniques de biochimie	89
1. Extraction des protéines.....	89
2. Dosage des protéines	89
3. Séparation, détection et identification des protéines.....	89
4. Immunoprécipitation.....	91
VI. Techniques d'histologie et d'imagerie	93

1. Inclusion en paraffine des échantillons	93
2. Coloration histologique à l'hématoxyline-éosine-safran (HES)	93
3. Marquage immunofluorescent.....	93
4. Observations microscopiques	95
VII. Analyses statistiques	95
TRAVAIL DE THÈSE	97
I. Mise en place des modèles de souris diabétique neuropathique, d'ulcère de pression, et d'un outil d'évaluation de la cicatrisation	99
1. Validation du modèle de souris diabétique avec deux degrés d'atteinte neuropathique	99
2. Développement d'un modèle d'induction d'ulcère de pression chez la souris.....	101
3. Développement d'un outil d'aide à l'évaluation visuelle de la fermeture d'une lésion chez la souris	104
II. Effet de la sévérité de la neuropathie diabétique sur la fragilité cutanée à la pression.....	109
III. Effet de la sévérité de la neuropathie diabétique sur la durée et le processus de cicatrisation de l'ulcère de pression.....	113
1. Étude macroscopique et histologique jusqu'à fermeture d'un ulcère de pression avec la sévérité de la neuropathie diabétique	113
2. Étude des marqueurs biologiques altérés par la neuropathie diabétique au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression	119
a. Étude de la cinétique d'expression du CGRP et de son récepteur RAMP1-CLR-RCP	120
b. Cinétique d'expression d'autres marqueurs biologiques pouvant participer au retard de cicatrisation	124
i. Cinétique d'expression de la Substance P, de son récepteur NK1R, et de l'enzyme NEP.....	124
ii. Cinétique d'expression du NGF et de ses récepteurs TrkA et p75NTR	125
iii. Cinétique d'expression de la périostine	126
IV. Analyse de la réépithélialisation post-compression dans un modèle <i>ex vivo</i>	129
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	133
I. Le degré d'atteinte neuropathique semble impacter négativement la résistance cutanée à la pression/friction	135
1. Caractérisation de la neuropathie diabétique.....	135
2. Impact de la neuropathie diabétique sur la peau non lésée	138
3. Implication de la neuropathie diabétique dans la gravité de la lésion avec la neuropathie diabétique....	139
II. Le diabète et la sévérité de la neuropathie induisent un retard de fermeture de la lésion, potentiellement via l'altération du récepteur au CGRP et de la périostine	142
1. Fermeture de l'ulcère de pression.....	142
2. Retard de réépithélialisation potentiellement due à l'altération du récepteur au CGRP	144
3. Défaut de contraction de la lésion	146
CONCLUSION.....	151
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
ANNEXES	181
Annexe 1. Chapitre de livre publié	183
Annexe 2. Normalisation des résultats de western-blot.....	213
Annexe 3. Brevet déposé sur le modèle d'induction d'un ulcère de pression chez la souris	214
Annexe 4. Expression des marqueurs biologiques au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression chez les souris 8 semaines	238
1. Cinétique d'expression du CGRP et de son récepteur RAMP1-CLR-RCP à 8 semaines.....	239
2. Cinétique d'expression de SP, NK1R, NEP, NGF, p75NTR, TrkA et périostine à 8 semaines	240
Annexe 5. Article rédigé sur l'expression du CGRP et de son récepteur pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression avec le diabète.....	241

Liste des abréviations

α -SMA	Smooth muscle actin alpha
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGE	Advanced glycation end products
ANOVA	Test d'analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C4wk, C8wk	Groupe de souris Contrôle 4/8 semaines après l'injection de tampon citrate
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CLR	Calcitonin receptor-like receptor
D4wk, D8wk	Groupe de souris Diabétique 4/8 semaines après l'injection de STZ
db/db	Souris avec déficience du gène de la leptine induisant un diabète de type 2
ECE-1	Endothelin-converting enzyme 1
EGF	Epidermal growth factor
EPUAP	European Pressure Ulcer Advisory Panel
FGF	Fibroblast growth factor
GRD	Ganglions de la racine dorsale
HE(S)	Hématoxyline éosine (safran)
IENF	Intraepidermal nerve fiber
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 receptor
JDE	Jonction dermo-épidermique
K10	Kératine 10
K14	Kératine 14
KGF	Keratinocyte growth factor
IL	Interleukine
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
mmHg	Millimètre de mercure (unité de pression)
MMP	Matrix metallopeptidases
MNCV	Motor nerve conduction velocity
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NEP	Neutral endopeptidase
NGF	Nerve growth factor
NK1R	Neurokinin 1 receptor, récepteur de la substance P
NPUAP	National Pressure Ulcer Advisory Panel
p75NTR	Neurotrophin receptor p75
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGP9.5	Protein gene product 9.5
PPPIA	Pan Pacific pressure injury alliance
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase (PCR) quantitative
RAMP	Receptor Activity Modifying Protein
RCP	Receptor component protein
SP	Substance P
sRAGE	Récepteur soluble des AGE
STZ	Streptozotocine
TA	Température ambiante
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TRPA1	Transient receptor potential ankyrin 1
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Liste des illustrations

Figure 1. Prévalence et complications du diabète en France.	17
Figure 2. Schéma de la structure générale de la peau.	23
Figure 3. Structure de l'épiderme et marqueurs protéiques.	24
Figure 4. Localisation du derme papillaire et réticulaire sur une photo d'une coupe de peau colorée à l'HE.	26
Figure 5. Photo d'une coupe de tissu adipeux dermique colorée à l'HE.	27
Figure 6. Schéma et photo d'une coupe de peau contenant des annexes cutanées colorée à l'HE.	28
Figure 7. Photo d'une coupe de peau humaine avec un immunomarquage des fibres nerveuses.	29
Figure 8. Schéma de l'innervation cutanée.	30
Figure 9. Les phases de cicatrisation cutanée non pathologique.	34
Figure 10. Les types cellulaires et molécules impliquées pendant la cicatrisation cutanée.	35
Figure 11. Récepteurs membranaires des peptides de la superfamille des « calcitonin gene peptides » et affinité respective pour leurs ligands.	41
Figure 12. Schéma du récepteur fonctionnel du CGRP composé du complexe de RAMP1, CLR et RCP.	41
Figure 13. Schéma de A/ la régulation et B/ l'activité directe dans la cicatrisation de NGF, TRPV1, SP et CGRP.	44
Figure 14. Comparaison morphologique de la peau humaine et de la peau de souris.	45
Figure 15. Comparaison histologique de la peau humaine et de la peau de souris.	46
Figure 16. Lien supposé entre l'hyperglycémie et la survenue des complications vasculaires chez les diabétiques de type 1 et 2.	50
Figure 17. Classification actuelle des lésions de pression selon le NPUAP.	53
Figure 18. Mécanismes de la neuropathie diabétique.	56
Figure 19. Modèles de lésions utilisés chez la souris pour l'étude de la cicatrisation des plaies diabétiques.	59
Figure 20. Phases et processus de cicatrisation altérés par le diabète pouvant conduire à la chronicité des lésions.	59
Figure 21. Schéma de l'installation utilisée pour déterminer la sensibilité thermique nociceptive cutanée.	71
Figure 22. Schéma de l'installation pour la mesure de la vitesse de conduction nerveuse du nerf sciatique.	72
Figure 23. Photo des aimants utilisés pour induire un ulcère de pression.	77
Figure 24. Schéma des découpes de peau réalisées sur les lésions de pression ou cicatrices pour l'analyse protéique, d'expression génique et en coupe.	79
Figure 25. Grille CRoMT pour l'évaluation visuelle des lésions chez la souris.	80
Figure 26. Les 30 photos de peau/lésion de souris présentées au Panel A pour l'Étude A.	81
Figure 27. Photo et schéma pour la réalisation d'une lésion de pression sur peau ex vivo.	83
Figure 28. Photo de deux extraits d'ARN séparés sur gel après révélation.	87
Figure 29. Évolution de la glycémie et du poids des souris contrôles et diabétiques.	99
Figure 30. Évaluation de l'atteinte nerveuse chez les souris diabétiques à 4 et 8 semaines, comparativement aux souris contrôles du même âge.	100
Figure 31. Photos macroscopiques des lésions maximales obtenues à J5 chez souris contrôles et diabétiques après induction par compression seule, et photos des coupes histologiques colorées à l'HES,	102
Figure 32. Photos macroscopiques de l'évolution des lésions de pression avec/sans film, avec/sans friction chez souris contrôles et diabétiques.	103
Figure 33. Photos macroscopiques des lésions obtenues à J5 chez souris contrôles et diabétiques avec le modèle d'induction d'ulcère de pression breveté, photo des coupes histologiques colorées à l'HES.	103
Figure 34. Photos des 20 lésions de l'Étude B, scores CRoMT médians donnés par le Panel B et évaluation histologique de la réépithélialisation par un laboratoire indépendant.	106
Figure 35. Scores CRoMT de lésions sur souris de l'Étude B, coupes histologiques correspondantes colorées à l'HES et immunomarquages de protéines de différenciation épidermique.	107
Figure 36. Caractérisation histologique de la peau des souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.	110
Figure 37. Caractérisation des propriétés mécaniques et d'hydratation de la peau des souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.	111

Figure 38. Photos macroscopiques des lésions de pression induites chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk et surfaces lésées maximales.....	111
Figure 39. Evolution macroscopique des lésions de pression induites chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk et scores CROMT correspondants.	114
Figure 40. Evolution macroscopique de la surface lésée rapportée en pourcentage de la surface maximale chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.....	115
Figure 41. Évolution histologique des lésions de pression induites chez les souris contrôles 4wk et 8wk.	116
Figure 42. Évolution histologique des lésions de pression induites chez les souris diabétiques 4wk et 8wk.....	117
Figure 43. Mesure de l'épaisseur maximale du néoépiderme au cours de la cicatrisation des lésions de pression induites chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.....	118
Figure 44. CGRP protein expression during pressure ulcer healing	120
Figure 45. Spacio-temporal expression of RAMP1 and CLR during skin pressure ulcer healing.....	122
Figure 46. RAMP1, CLR and RCP protein expression during pressure ulcer healing.....	123
Figure 47. Immunoprecipitation of RCP partners to identify presence of mature CGRP complex receptor.	123
Figure 48. Expression protéique de la SP, de son récepteur NK1R, et de la Neuroendopeptidase (NEP) dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques.	125
Figure 49. Expression protéique du NGF et de ses récepteurs p75NTR et TrkA dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques.....	126
Figure 50. Expression protéique de la périostine dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques.....	127
Figure 51. Suivi histologique et macroscopique de peau de souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk post-compression <i>ex vivo</i>	130
Figure 52. Taux relatif de cytokines sécrétées post-compression <i>ex vivo</i> par la peau de souris diabétique versus peau contrôle 4wk.....	131
Figure 53. Expression génique et protéique du CGRP dans la peau non lésée des C4wk et D4wk.....	137
Figure 54. Expression génique et protéique du CGRP dans la peau lésée à J5 des C4wk et D4wk.....	144
Figure 55. Photos représentatives de western-blot avec un anticorps anti-actine et du signal des protéines totales en coloration Rouge ponceau dans la peau non lésée et lésée chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.....	213
Figure 56. Photos représentatives de la peau des souris juste avant l'induction des lésions de pression.....	238
Figure 57. Expression protéique du CGRP, de RAMP1, CLR et RCP et immunoprécipitation de RCP dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques 8wk.	239
Figure 58. Expression protéique de SP, NK1R, NEP NGF, p75NTR, TrkA et périostine dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques 8wk.....	240
Tableau 1. Description des différents types de fibres nerveuses de la peau.....	31
Tableau 2. Catégories de stimuli cutanés et récepteurs/innervation associés.....	31
Tableau 3. Système SINBAD pour la classification clinique de l'ulcère du pied diabétique.....	51
Tableau 4. Liste des anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines par Western Blot	91
Tableau 5. Liste des anticorps utilisés pour la détection des protéines par immunofluorescence	95
Tableau 6. Scores médians donnés par le Panel A aux photos de lésion de l'Étude A, et pourcentage d'experts estimant la lésion fermée.	106
Tableau 7. Spécificité et sensibilité de détection d'un néoépiderme fermé et organisé par les critères CROMT défini d'une lésion visuellement fermée.	107

Liste des communications scientifiques et brevet

Posters scientifiques

- “Characterization of the impact of peripheral neuropathy-associated diabetes on skin fragility, excision and pressure ulcer healing in a mice model”
Remoué N, Bouschbacher M, Sigaucho-Roussel D.
Poster présenté lors de 2 congrès :
 - 3rd EPUAP Focus Meeting (European Pressure Ulcer Advisory Panel), 4 - 6 Avril 2016, Berlin, Allemagne
 - 5th Congress of WUWHS (World Union of Wound Healing Societies), 25 - 29 septembre 2016, Florence, Italie

Communications orales

- “Study of the impact of the degree of peripheral neuropathy associated to diabetes on pressure ulcer incidence and healing process”
Remoué N, Bouschbacher M, Sigaucho-Roussel D.
Congrès NeuroDiab, 9 - 11 septembre 2017, Coimbra, Portugal.
- “Impact of nerve fiber dysfunction associated to diabetes on skin homeostasis, pressure ulcer incidence and healing process”
Remoué N, Bouschbacher M, Sigaucho-Roussel D.
Congrès ScarConETRS (European Tissue Repair Society), 31 mai - 2 juin 2018, Amsterdam, Pays-Bas.
- “Impact of diabetes on CGRP signaling pathway in pressure ulcer healing process”
Remoué N, Bouschbacher M, Sigaucho-Roussel D.
Congrès joint EPUAP & Société Française de l’Escarre, 18-20 septembre 2019, Lyon, France.
Obtention du prix de la meilleure présentation orale catégorie Étudiants.

Chapitre de livre

- “Chapter 12 - Animal models in chronic wound healing research” dans “Innovations and emerging technologies in wound care”
Remoué N, Bonod C, Fromy B, Sigaucho-Roussel D.
A. Gefen, Editor. 2020, Academic Press. p. 197-224.

Brevet

- “Modèle pour l’évaluation de traitements pour la cicatrisation des ulcères de pression”
Demandeurs : URGO Recherche Innovation et Développement, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1
Date de dépôt de brevet à l’INPI : 12 juin 2018 (FR1855141)
Date de demande d’extension PCT (international) : 11 juin 2019 (PCT/FR2019/051398)
Inventeurs : Noëlle Remoué, Dominique Sigaucho-Roussel

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La peau est un organe complexe et sa réparation fait intervenir de multiples cellules et molécules selon un processus spatio-temporel fin. Lorsque ce processus est perturbé, la cicatrisation n'aboutit plus et devient un problème majeur de santé publique, causant morbidité et mortalité importantes.

L'une des principales pathologies à l'origine de ces plaies chroniques est le diabète. Le diabète, qu'il soit de type 1 ou de type 2, est caractérisé par une hyperglycémie chronique, et touchait 422 millions de personnes dans le monde en 2016, dont 5,1 millions en France (soit 8% de la population). Ces chiffres sont en perpétuelle augmentation, et la Fédération Internationale du Diabète estime qu'une personne sur 10 sera diabétique en 2040 dans le monde [Centre Européen d'Etude du Diabète].

La fréquence du diabète augmente avec l'âge, notamment en raison de la forte proportion du diabète de type 2 dit diabète « gras », et touche ainsi 1 homme sur 5 âgés de 70 à 85 ans et 1 femme sur 7 âgées de 75 à 85 ans (Figure 1A). L'augmentation du nombre de personnes vivant avec du diabète et l'allongement de la durée de vie des diabétiques contribuent à augmenter le nombre d'incidents de santé (Figure 1B).

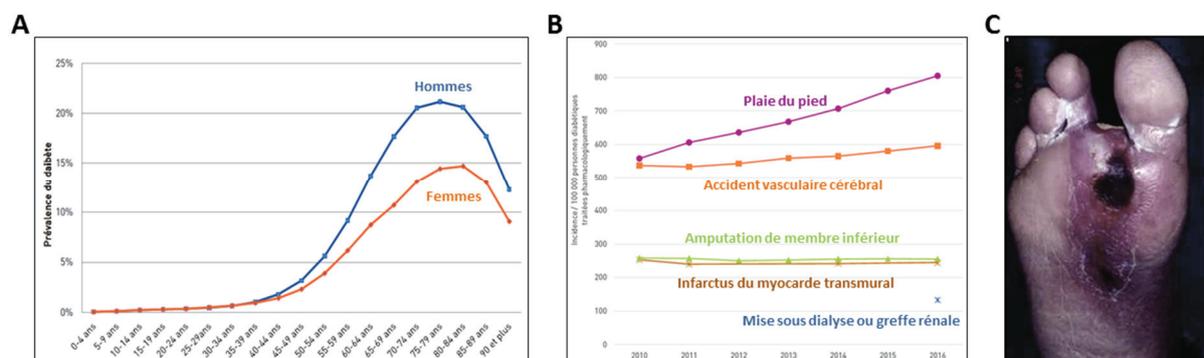


Figure 1. Prévalence et complications du diabète en France.

A/ Répartition par âge et sexe de la prévalence du diabète traité pharmacologiquement en France en 2016 (hors Mayotte). B/ Évolution de l'incidence des hospitalisations pour complications liées au diabète en France entre 2010 et 2016 (hors Mayotte). Graphiques A et B tirés de [Fosse-Edorh *et al.* 2018]. C/ Photo d'une plaie de pied diabétique d'après www.merckmanuals.com.

La plaie du pied, première cause d'hospitalisation des patients diabétiques

La cause d'hospitalisation la plus fréquente liée au diabète est la plaie du pied (Figure 1B et C), avec plus de 26700 personnes en 2016 en France [Fosse-Edorh *et al.* 2018], dont le coût de prise en charge par l'Assurance Maladie était de 990 millions d'euros en 2015 [Assurance Maladie 2017].

Le « pied diabétique » est une lésion qui se caractérise par une ulcération des tissus du pied (peau/muscle/os) dont le délai de cicatrisation est allongé [Pradhan *et al.* 2009] et peut durer plusieurs mois. Cette lésion se retrouve à la croisée des différentes complications diabétiques dont trois principales : la neuropathie, l'artériopathie et le risque infectieux.

La neuropathie prédispose les diabétiques aux ulcères

Le diabète fragilise la peau [Argyropoulos *et al.* 2016, Okano *et al.* 2016], augmentant le risque de lésions. Le pied est tout particulièrement sujet à la pression, facteur clé dans le développement de la plaie du pied diabétique car cela crée une ischémie tissulaire, privant la peau d'oxygène et de nutriments.

De plus, le diabète provoque l'apparition progressive d'une neuropathie, dysfonctionnement

des nerfs de l'organisme, pouvant altérer les fonctions autonomes, motrices et sensorielles. La neuropathie provoque ainsi une sécheresse cutanée fragilisant davantage la peau, une déformation des pieds augmentant la pression locale, et une perte de sensibilité retardant la prise de conscience de la plaie et sa prise en charge médicale [Jeffcoate *et al.* 2003]. Ainsi la neuropathie, qui touche 30 à 50% des patients [Pradhan *et al.* 2009], est le facteur de risque principal dans le développement d'ulcère du pied chez le diabétique [Reiber *et al.* 1999].

Le développement de traitements efficaces pour la plaie du diabétique nécessite une meilleure compréhension des mécanismes biologiques perturbés

La cicatrisation d'une plaie cutanée implique l'interaction de cellules et de facteurs biologiques. Certains de ces facteurs sont connus comme étant perturbés avec le diabète et peuvent contribuer à retarder la fermeture des plaies [Harding *et al.* 2002]. Cependant, peu de traitements ont montré leur efficacité pour l'ulcère du diabétique, notamment car la plupart des études réalisées pour augmenter la compréhension des plaies chroniques sont faites *in vivo* sur l'animal avec des plaies d'excision (coupure nette de la peau) [Grada *et al.* 2018], un type de plaie très différent de l'ulcère de pression (ischémie, nécrose, ...) retrouvé chez les patients diabétiques.

À l'heure actuelle, outre le traitement étiologique, la prise en charge des ulcères diabétiques repose sur les soins locaux (débridement, reperfusion, protection) et le contrôle de l'infection qui peuvent aider à la cicatrisation mais ne sont pas optimum. Seule la décharge totale du pied diabétique a montré une cicatrisation efficace en cas d'artériopathie [Braun *et al.* 2014], mais cette solution est difficile à mettre en place et n'a pas prouvé d'efficacité sur les patients atteints de neuropathie.

De ce fait, par le manque de connaissance des mécanismes de cicatrisation de l'ulcère de pression et la pénurie de traitements spécifiques, 5 à 10 % des patients diabétiques subiront une amputation d'un l'orteil, du pied ou de la jambe au cours de leur vie [Centre Européen d'Etude du Diabète].

Ainsi ce travail de thèse s'est attaché à reproduire l'ulcère de pression dans un modèle de souris diabétique neuropathique pour tenter de répondre à 2 questions :

- **Le degré d'atteinte neuropathique a-t-il une influence sur la fragilité cutanée et la gravité de l'ulcère de pression ?**

En effet la plupart des patients sont diagnostiqués neuropathiques lors de la découverte d'une plaie chronique. La neuropathie est alors déjà à un stade avancé [Vouillarmet *et al.* 2019]. Il est ainsi important de savoir si le fait de diagnostiquer très tôt la neuropathie peut permettre un meilleur suivi du patient et éviter la survenue d'un ulcère de pression.

- **Comment le diabète et l'aggravation de la neuropathie altèrent la cicatrisation de l'ulcère de pression et quels sont les marqueurs biologiques modifiés pouvant y contribuer ?**

Dans cette étude nous avons étudié le délai de fermeture de l'ulcère de pression et les processus de cicatrisation. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux neuromédiateurs qui ont un rôle démontré dans la cicatrisation cutanée et qui peuvent être libérés par les nerfs et/ou de multiples types cellulaires de la peau. Nous avons également suivi d'autres marqueurs biologiques déjà connus pour leur rôle dans la cicatrisation non pathologique. Ainsi les

marqueurs modifiés par le diabète et l'évolution de la neuropathie sont des pistes pour le développement futur de traitements plus adaptés aux ulcères de pression des diabétiques.

En parallèle, nous avons également développé un **modèle *ex vivo* de plaie et suivi de la cicatrisation** à partir de la peau des souris contrôles ou diabétiques neuropathiques, ceci afin de déterminer si ce modèle peut, au moins en partie, répondre aux questions précédentes, et ainsi représenter un modèle alternatif permettant de diminuer l'utilisation de l'animal.

Dans ce mémoire est exposé un état de l'art concis de la peau et de ses grandes phases de cicatrisation ; pour détailler d'avantage les molécules étudiées pendant ce travail de thèse, leurs rôles et interactions connus, et les conséquences biologiques cutanées du diabète et de la neuropathie. Sont ensuite présentés les travaux ayant abouti à des résultats marquants. Une discussion détaillée des résultats obtenus et les perspectives envisagées concluront ce document.

ÉTAT de l'ART

I. Fonctions et structure de la peau humaine

La peau, d'une surface de 1,5 à 2 m² chez l'adulte [Redlarski *et al.* 2016], est un organe complexe qui protège son hôte de son environnement, tout en permettant une interaction avec ce dernier. La peau est un arrangement dynamique et intégré de cellules, de tissus et d'éléments matriciels où l'on peut distinguer **trois couches principales** : l'épiderme en surface (épithélium kératinisé), puis le derme (tissu conjonctif), et enfin le tissu adipeux dermique en profondeur [Goldsmith *et al.* 2012, Driskell *et al.* 2014]. Ces couches sont traversées par des annexes (phanères et glandes) et des fibres nerveuses (Figure 2).

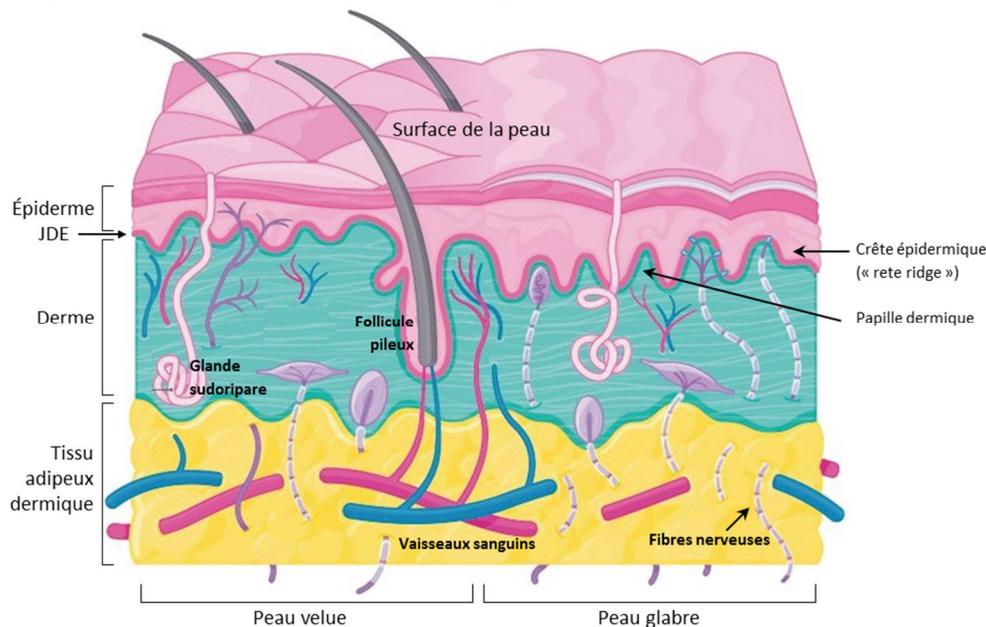


Figure 2. Schéma de la structure générale de la peau.

La peau est composée de l'épiderme en surface, du derme, et du tissu adipeux dermique en profondeur. La jonction dermo-épidermique (JDE) sépare l'épiderme du derme qui forment des invaginations l'un dans l'autre appelées crêtes épidermiques et papilles dermiques respectivement. La peau comporte des follicules, des glandes, des fibres nerveuses et un réseau lymphatique (non représenté) et sanguin. Adapté de [Gould 2018].

Dans la peau, le derme et le tissu adipeux dermique sont richement vascularisés par un réseau sanguin très structuré d'artérioles de moyen puis petit calibre, de capillaires et de veinules (Figure 2). A l'inverse, l'épiderme, comme tout épithélium, n'est pas vascularisé ; il est nourri par imbibition à partir des réseaux capillaires des papilles dermiques [Braverman 2000]. De même, le système lymphatique est présent dans le derme et le tissu adipeux dermique et absent de l'épiderme. Bien que structurellement distincts, les systèmes sanguin et lymphatique sont fonctionnellement interconnectés et agissent ensemble pour assurer l'équilibre des fluides et des protéines dans les tissus, la nutrition cellulaire et le bon fonctionnement immunologique [Skobe *et al.* 2000].

Ainsi la peau assure diverses **fonctions fondamentales** pour l'organisme, médiées par une ou plusieurs de ses couches principales :

- Contre les agressions extérieures :
 - protection mécanique contre la pression et le cisaillement grâce à la résistance, la déformabilité et l'élasticité de la peau assurées par l'épiderme, la matrice extracellulaire du derme et le tissu adipeux [Diridollou *et al.* 2000, Hendriks *et al.* 2006, Joodaki *et al.* 2018] ;
 - protection contre les agents infectieux notamment par son pH acide (4,1-5,8) [Proksch 2018],

les peptides antimicrobiens produits au niveau de l'épiderme [Clausen *et al.* 2016], la flore bactérienne non pathogène [Byrd *et al.* 2018], et les cellules immunitaires présentes dans le derme et l'épiderme [Matejuk 2018] ;

- protection contre les radiations solaires grâce à la mélanine [Fajuyigbe *et al.* 2018] et à l'acide urocanique [Kammeyer *et al.* 1995] présents dans l'épiderme et qui ont la capacité d'absorber les ultraviolets ;
- Pour la protection hydrique, la régulation thermique et le métabolisme :
 - barrière physique contre la perte en eau de l'organisme, en particulier grâce à la structure fine de la couche externe de l'épiderme [Feingold *et al.* 2014] ;
 - rôle dans la thermorégulation grâce au réseau vasculaire [Walløe 2015] et par la production de sueur [Gagnon *et al.* 2018] ;
 - rôle de réserve énergétique assuré par le tissu adipeux [Cohen *et al.* 2016] ;
 - synthèse de vitamine D [Makarova *et al.* 2017] ;
- Rôle sensoriel (texture, température, douleur, ...) assurée par l'innervation cutanée [Zimmerman *et al.* 2014].

Ces fonctions sont notamment assurées par la structure et la composition cellulaire et protéique de la peau, décrites ci-après.

1. L'épiderme

L'épiderme est la partie la plus externe de la peau et est composé à 90% de kératinocytes, formant un épithélium squameux stratifié kératinisé [Moll *et al.* 2008]. Répartis entre ces kératinocytes sont également présents des mélanocytes (responsables de la production de mélanine), des cellules de Langerhans (présentatrices d'antigènes [Deckers *et al.* 2018]), et des cellules de Merkel ayant un rôle neurosensoriel [Boulais *et al.* 2007].

L'épiderme est en renouvellement permanent et on peut distinguer quatre couches, reflétant les stades de différenciation verticale des kératinocytes orientée vers l'extérieur, de la couche basale à la couche cornée (Figure 3).

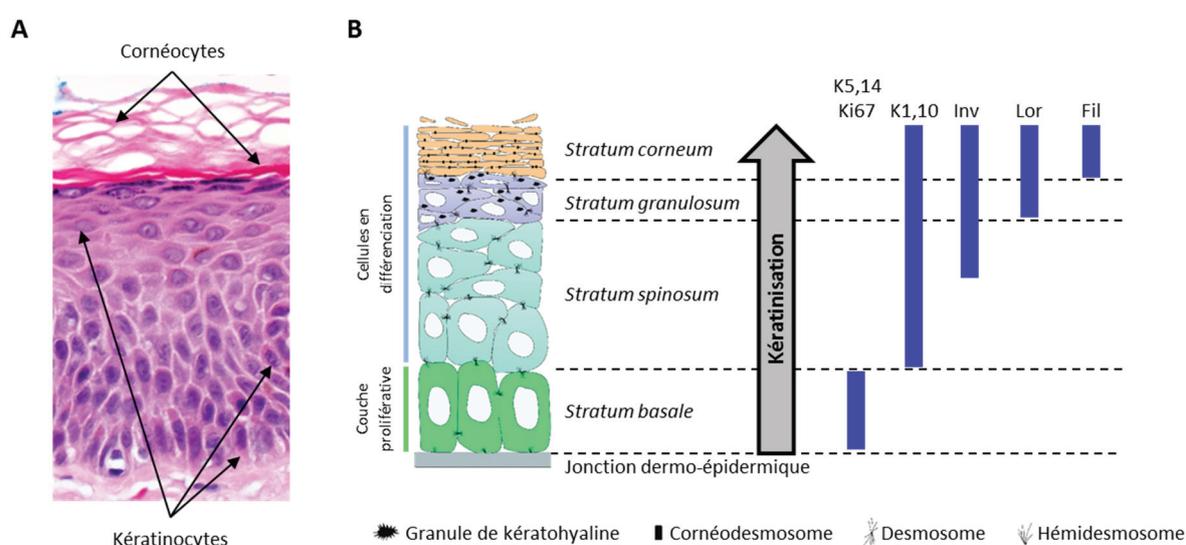


Figure 3. Structure de l'épiderme et marqueurs protéiques.

A/ Photo d'un coupe d'épiderme colorée à l'hémaloxiline-éosine (HE) adaptée de <https://tissupath.com.au>. B/ Structure de l'épiderme et marqueurs protéiques exprimés durant la prolifération et la différenciation. Adapté de [Denecker *et al.* 2008, Sandilands *et al.* 2009, Strudwick *et al.* 2015]. K, kératine ; Inv, involucrine ; Lor, loricrine, Fil, filaggrine.

La couche basale ou germinative (*Stratum basale*)

La couche basale est la couche la plus profonde de l'épiderme et est constituée d'une seule assise de kératinocytes de forme cubique. Ils assurent le renouvellement de l'épiderme par leur capacité proliférative [Lim *et al.* 2013] identifiable par des marqueurs tels que Ki67 et PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). De plus, ces kératinocytes basaux assurent la stabilité physique de l'épiderme grâce aux kératines 5 et 14 (K5, K14) qu'ils expriment [Fuchs *et al.* 1980, Omary *et al.* 2004] et aux hémidesmosomes fortement ancrés au derme sous-jacent via la jonction dermo-épidermique [Borradori *et al.* 1999].

La couche épineuse ou de Malpighi (*Stratum spinosum*)

Les kératinocytes de cette couche entrent en différenciation via un mécanisme d'autophagie [Akinduro *et al.* 2016]. Ils ont une forme polygonale dans les couches inférieures puis aplaties dans les couches supérieures. Les kératinocytes épineux et ceux des couches supérieures sont liés les uns aux autres par de nombreux desmosomes reliés eux-mêmes aux filaments intracellulaires de kératines 1 et 10 (K1, K10), cet assemblage conférant à l'épiderme résistance physique et extensibilité [Moll *et al.* 2008]. L'expression de K10 est également impliquée dans l'arrêt de la prolifération et l'entrée en différenciation des kératinocytes [Paramio *et al.* 1999]. L'involucrine, dont la synthèse débute au niveau des kératinocytes épineux supérieurs, participe ensuite à la constitution de l'enveloppe cornée [Eckert *et al.* 2004].

La couche granuleuse (*Stratum granulosum*)

Les kératinocytes granuleux, de forme aplatie, synthétisent les molécules nécessaires à la formation de la couche suivante. Ainsi on peut observer dans leur cytoplasme des grains de kératohyaline composés notamment d'un assemblage de profilaggrine (précurseur de la filaggrine) et de loricrine [Mehrel *et al.* 1990, Yoneda *et al.* 2012] ; et des corps d'Odland (ou corps lamellaires, ou kératinosomes) dans lesquels sont stockés des lipides et des enzymes [Menon *et al.* 2018]. Cette couche participe à la fonction barrière de la peau grâce aux jonctions serrées inter-kératinocytaires qui limitent le passage de molécules aussi petites que des ions [Bäsler *et al.* 2016].

La couche cornée (*Stratum corneum*)

Le passage de la couche granuleuse à la couche cornée est caractérisé par la mort des kératinocytes, devenant ainsi des cornéocytes. Durant la cornification, une enveloppe cornée rigide se forme au niveau de la membrane plasmique interne par l'assemblage covalent de protéines (dont loricrine, filaggrine, involucrine, kératines) [Steinert *et al.* 1995, Candi *et al.* 2005]. Concomitamment, le contenu des corps d'Odland est extrudé [Ponec *et al.* 2001] et les lipides (céramides, acides gras, cholestérol) s'assemblent enzymatiquement en structures lamellaires (« lamelles lipidiques ») parallèles à la surface de la peau [Madison 2003]. De même, les desmosomes sont modifiés en cornéodesmosomes, notamment par l'association extracellulaire de la cornéodesmosine [Rawlings *et al.* 2005].

La structure de la couche cornée, telle un mur de briques et de ciment [Elias 1983], prodigue à la peau la capacité à retenir l'eau de l'organisme. Cependant, une faible quantité d'eau (appelée TEWL, *transepidermal water loss*) traverse cette couche, et sa mesure permet d'estimer la qualité de la fonction barrière de la peau.

La déshydratation croissante dans les couches les plus externes du *Stratum corneum* ainsi que la diminution du pH en surface favorisent la protéolyse enzymatique conduisant à la desquamation des cornéocytes [Rawlings *et al.* 2005].

2. La jonction dermo-épidermique ou lame basale

La jonction dermo-épidermique (JDE) est une membrane basale à l'interface entre épiderme et derme et dont les constituants sont synthétisés par les kératinocytes et les fibroblastes du derme papillaire [Briggaman *et al.* 1975]. C'est un assemblage de protéines matricielles (dont collagènes de type IV et VII, laminines, nidogène, et protéoglycanes) fixées aux intégrines $\alpha6\beta4$ des hémidesmosomes, et aux intégrines $\alpha3\beta1$ [Goldsmith *et al.* 2012, Breitzkreutz *et al.* 2013].

Par sa structure, la JDE assure l'adhérence de l'épiderme au derme, et permet de réguler les échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments, en particulier l'apport de nutriments à l'épiderme non vascularisé [Briggaman *et al.* 1975] favorisé par les invaginations du derme dans l'épiderme appelées papilles dermiques. La JDE a également un rôle fondamental lors de la réépidermisation pendant la cicatrisation cutanée en servant, notamment grâce aux laminines, de support pour l'adhésion et la migration des kératinocytes [Iorio *et al.* 2015].

3. Le derme

Le derme est compris entre l'épiderme et le tissu adipeux dermique. C'est un tissu conjonctif qui est principalement composé d'une matrice extracellulaire produite par des fibroblastes, la principale population cellulaire dermique. Le derme contient également des cellules endothéliales formant les systèmes vasculaire et lymphatique [Braverman 2000, Skobe *et al.* 2000], des cellules dendritiques dermiques, des monocytes/macrophages, des lymphocytes et des neutrophiles [Sorrell *et al.* 2004].

La structure du derme

Le derme est classiquement divisé en deux régions qui diffèrent par la composition et l'organisation de leur matrice extracellulaire respective : le derme papillaire surplombe le derme réticulaire (Figure 4) [Driskell *et al.* 2015].

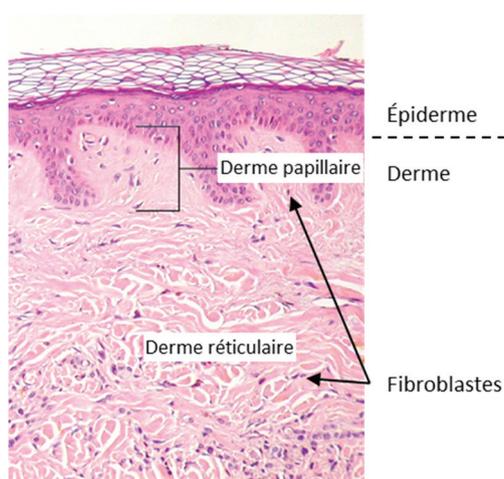


Figure 4. Localisation du derme papillaire et réticulaire sur une photo d'une coupe de peau colorée à l'HE.
Adapté de [Biga *et al.* 2019].

Le derme papillaire, situé juste sous l'épiderme, est un tissu conjonctif lâche de fibres collagéniques et élastiques orientées perpendiculairement à l'épiderme. Le derme réticulaire, situé sous le derme papillaire et d'épaisseur plus importante, est un tissu conjonctif plus dense composé d'un entrecroisement de faisceaux de grosses fibres présentant une orientation parallèle à la surface de la peau [Sorrell *et al.* 2004, Patton *et al.* 2018].

Les cellules majoritaires de derme : les fibroblastes

Les fibroblastes ont une origine mésenchymateuse. Ils sont plus nombreux et métaboliquement plus actifs dans le derme papillaire où ils sont de morphologie fusiforme, que dans le derme réticulaire où ils ont une forme étoilée. Cependant il n'existe à ce jour pas de marqueur spécifique pour les discriminer [Driskell *et al.* 2015].

Les fibroblastes synthétisent et sécrètent la majorité des composants de la matrice extracellulaire, ainsi que des enzymes (les MMP, *matrix metalloproteinase*, et leurs inhibiteurs, les TIMP, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) permettant de dégrader et remodeler cette matrice [Woessner 1991]. Ces cellules interviennent également dans la régulation physiologique de la peau en sécrétant un large panel de cytokines et facteurs de croissance, jouant un rôle majeur dans les interactions dermo-épidermiques au cours de la cicatrisation, détaillé dans la partie II.1. de l'état de l'art.

La matrice extracellulaire du derme

La matrice extracellulaire (MEC) du derme est composée d'un réseau de fibres de collagène entremêlées à des fibres élastiques d'élaunine et d'élastine baignant dans un mélange de protéoglycanes, de glycoprotéines, d'eau et d'acide hyaluronique, mais le derme papillaire et le derme réticulaire diffèrent par la composition et l'organisation respective de cette matrice [Sorrell *et al.* 2004]. Le derme papillaire est caractérisé par des faisceaux de fibres de collagène minces et peu organisés, constitués principalement de collagènes de type I et de type III, qui contrastent avec les faisceaux de fibres épais et bien organisés du derme réticulaire [Cormack 1987]. Les faisceaux de fibres de collagène dans le derme papillaire contiennent plus de collagène de type III que ceux du derme réticulaire [Meigel *et al.* 1977]. Cependant, le collagène de type I reste le constituant principal du derme [Epstein 1974].

Les collagènes et les fibres élastiques, ainsi que le nombre d'invaginations dermo-épidermiques, confèrent résistance et élasticité à la peau, lui permettant d'absorber les chocs en se déformant puis en reprenant sa position d'origine [Langton *et al.* 2017].

4. Le tissu adipeux dermique

Le tissu adipeux blanc dermique, anciennement appelé hypoderme [Driskell *et al.* 2014], est un tissu quantitativement important (15 à 50% du poids total). Il est composé majoritairement d'adipocytes (cellules mésenchymateuses différenciées) (Figure 5), et de leurs précurseurs, les préadipocytes. Entre ces cellules existe la fraction stroma-vasculaire qui contient des lymphocytes, des myélocytes (granulocytes immatures), des macrophages, des péricytes, des cellules endothéliales et des cellules souches mésenchymateuses [Bora *et al.* 2017]. La composition de cette fraction a montré son intérêt pour la médecine régénérative et pour la cicatrisation cutanée [Cardoso *et al.* 2016].

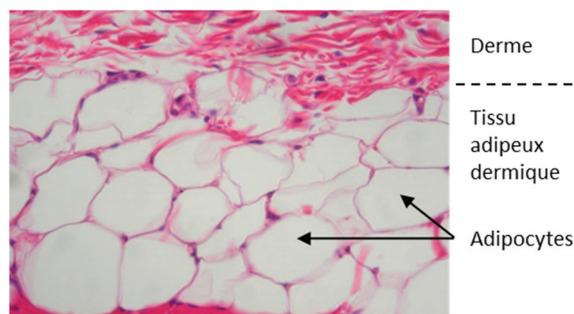


Figure 5. Photo d'une coupe de tissu adipeux dermique colorée à l'HE.

Adapté de [Hart 2019].

Les adipocytes possèdent la capacité de stocker des lipides sous forme de triglycérides et de les libérer sous forme d'acides gras, gérant ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les approvisionnements [Flier 1995]. La deuxième fonction du tissu adipeux dermique est celle de la synthèse et la sécrétion d'adipokines, en faisant un organe endocrinien à part entière, pouvant agir au niveau local (par voie autocrine ou paracrine) ou systémique et influencer tous les autres organes impliqués dans la physiologie [Cohen *et al.* 2016]. Ce tissu joue également un rôle protecteur contre les chocs [Diridollou *et al.* 2000, Joodaki *et al.* 2018] et un rôle dans la thermorégulation par le caractère isolant de la graisse [Anghel *et al.* 2007].

5. Les annexes de la peau

Les annexes cutanées (Figure 6) regroupent les glandes sébacées, les glandes sudoripares, et les phanères (poils, cheveux, ongles).

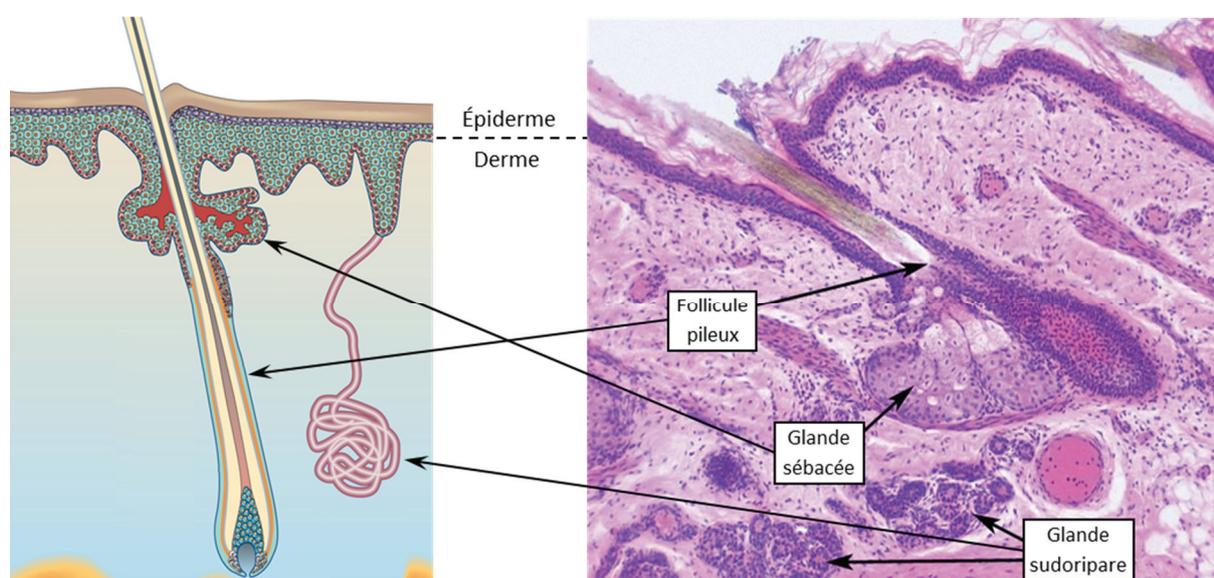


Figure 6. Schéma et photo d'une coupe de peau contenant des annexes cutanées colorée à l'HE.
Adapté de [Fuchs *et al.* 2002, Gallik 2013]

Les glandes sudoripares se situent dans le derme et produisent la sueur, participant à la régulation thermique [Gagnon *et al.* 2018]. Il existe deux types de glandes sudoripares : apocrines et éccrines. Les glandes éccrines déversent la sueur directement à la surface de l'épiderme ; à l'inverse, les glandes sudoripares apocrines, qui ne s'activent qu'à la puberté, sécrètent la sueur au niveau des follicules pileux [Jung *et al.* 2018].

Les glandes sébacées sont également localisées dans le derme et associées aux follicules pileux, où elles sécrètent le sébum qui est composé de lipides, de squalène et de débris cellulaires [Zouboulis *et al.* 2016].

La sueur et le sébum sont miscibles et forment un film hydrolipidique à la surface de la peau, qui participe à la fonction barrière contre la perte en eau et l'agression par des agents chimiques ou biologiques [Zouboulis 2004].

Le follicule pileux forme une invagination de l'épiderme dans le derme. Cependant, les cellules qui participent à la production et à la maturation de la fibre, situées tout le long de cette invagination, sont différentes, bien qu'apparentées, des kératinocytes interfolliculaires et des fibroblastes [Joost *et al.* 2016, Bernard 2017]. La formation du follicule et ces différentes cellules ne seront pas détaillées dans ce mémoire.

6. L'innervation cutanée

Le système nerveux est composé du système nerveux central et du système nerveux périphérique. Le système nerveux central comprend l'encéphale, la moelle épinière et la rétine. Le système nerveux périphérique comprend quant à lui les nerfs entre le système nerveux central et le reste de l'organisme [Alberts 2012]. Ainsi, l'innervation de la peau (Figure 7) appartient au système nerveux périphérique.

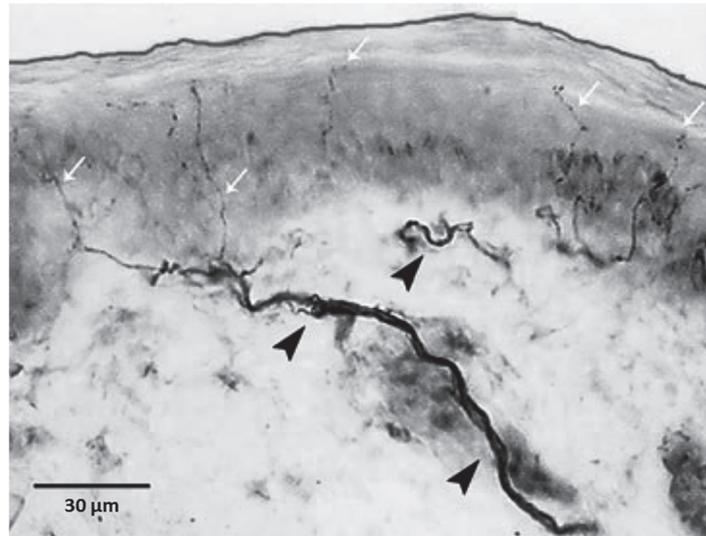


Figure 7. Photo d'une coupe de peau humaine avec un immunomarquage des fibres nerveuses.

L'anticorps anti-PGP9.5 (*protein gene product 9.5*) utilisé marque spécifiquement les fibres nerveuses. Les flèches blanches indiquent les fibres nerveuses épidermiques, les pointes noires indiquent les fibres nerveuses au niveau du derme. Photo adaptée de [Lauria *et al.* 2005].

La peau est innervée par différents types de fibres : les fibres nerveuses sensibles, qui transmettent notre sens du toucher ; et, en plus faible nombre, les fibres nerveuses autonomes [Breathnach 1977, Munger *et al.* 1988]. Contrairement aux autres types cellulaires de la peau, le corps cellulaire des fibres nerveuses sont contenus dans des ganglions : les ganglions de la racine dorsale pour les nerfs sensitifs et les ganglions paravertébraux pour les nerfs autonomes (Figure 8). Ainsi lors d'une lésion cutanée, les fibres nerveuses et les récepteurs au niveau de la peau sont détruits, mais les corps cellulaires persistent dans les ganglions qui se situent le long de la moelle épinière [Abraira *et al.* 2013, Laverdet *et al.* 2015].

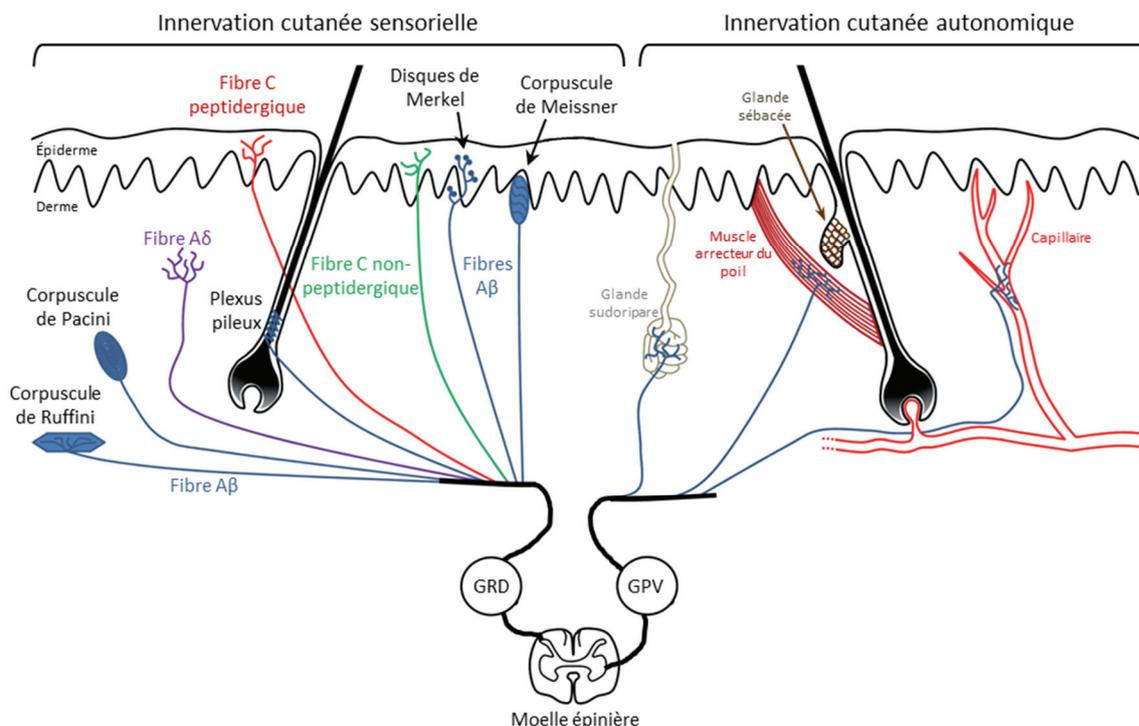


Figure 8. Schéma de l'innervation cutanée.

Les nerfs cutanés proviennent de corps cellulaires situés dans les ganglions de la racine dorsale (GRD) ou les ganglions paravertébraux (GPV). Ils forment différents sous-types de terminaisons nerveuses situées dans le derme et l'épiderme. L'innervation cutanée sensorielle est composée de corpuscules de Pacini, de Ruffini et de Meissner, de disques de Merkel et de fibres Aδ et C à terminaisons libres. L'innervation autonome cutanée est composée de fibres nerveuses adrénergiques innervant les capillaires, les muscles du poil et les glandes sudoripares apoclines (non illustrées dans le schéma), et de fibres nerveuses cholinergiques innervant les glandes sudoripares éccrines. Adapté de [Laverdet *et al.* 2015].

a. Les fibres nerveuses autonomes

Les fibres nerveuses autonomes/efférentes proviennent presque entièrement de neurones sympathiques et leurs terminaisons se limitent au derme, où elles innervent vaisseaux sanguins et lymphatiques, muscles érecteurs, glandes sudoripares éccrines et apoclines, et follicules pileux [Brain *et al.* 1999, Vetrugno *et al.* 2003] (Figure 8).

Ces fibres nerveuses sécrètent localement différents neuromédiateurs permettant de moduler leurs activités [Roosterman *et al.* 2006]. Par exemple, l'acétylcholine qu'elles produisent stimule la sécrétion des glandes sudoripares éccrines [Gagnon *et al.* 2018]. Également, les petites artères et artérioles cutanées sont abondamment innervées par des fibres noradrénergiques [Hamberger *et al.* 1964], ce qui permet l'ouverture des anastomoses artérioveineuses, régulant ainsi la température corporelle [Walløe 2015].

b. Les fibres nerveuses sensibles

Contrairement aux fibres nerveuses autonomes, les nerfs sensoriels/afférents innervent aussi bien l'épiderme, le derme que le tissu adipeux sous-cutané sous la forme d'un réseau tridimensionnel [Yamada *et al.* 1996, Tschachler *et al.* 2004, Kelly *et al.* 2005].

Les fibres nerveuses sensorielles initient les sensations agréables ou douloureuses du toucher grâce à leurs terminaisons périphériques qui transforment les stimuli sensoriels en potentiels d'action qui se propagent vers le système nerveux central [Lumpkin *et al.* 2007].

La transmission de ce message se fait plus ou moins vite selon le taux de myéline autour de l'axone. Ainsi dans la peau on retrouve trois types de fibres nerveuses : Aβ, Aδ et C (Tableau

1). Contrairement aux fibres A β , les fibres A δ perdent leur gaine de myéline quand elles entrent dans le derme [Provitera *et al.* 2007]. Les fibres C sont quant à elles totalement amyélinisées et donc ont une vitesse de conduction plus lente, mais elles constituent 60 à 90 % de l'ensemble des fibres sensorielles cutanées [Le Bars *et al.* 2002] et sont les seules fibres à terminaisons libres présentes au niveau de l'épiderme [Reilly *et al.* 1997].

Tableau 1. Description des différents types de fibres nerveuses de la peau.

Adapté de [Laverdet *et al.* 2015]

Type de fibre nerveuse	Quantité de myéline	Diamètre axonal (μm)	Vitesse de conduction (m/sec)
A β	Modérée	6-12	80
A δ	Fine couche de myéline	1-5	4-30
C	Non myélinisée	0,2-1,5	0,5-2

Les fibres nerveuses ont des terminaisons libres ou bien encapsulées (corpuscules de Pacini, Meissner, Ruffini et disques de Merkel) (Figure 8), et peuvent également être classées en fonction de leur modalité sensorielle (Tableau 2). Par exemple, les **thermorécepteurs** réagissent au réchauffement ou au refroidissement de la peau, tandis que les **mécanorécepteurs** réagissent à la pression, à l'étirement ou au mouvement des poils.

Tableau 2. Catégories de stimuli cutanés et récepteurs/innervation associés.

Adapté de [Misery 2014, Laverdet *et al.* 2015]

Sensation	Type de récepteur sensoriel activé	Localisation	Type de fibre nerveuse
La vibration	Mécanorécepteur à adaptation rapide	Corpuscule de Meissner Corpuscule de Pacini	Fibres A β
L'effleurement		Plexus pileux Terminaisons nerveuses libres	
Le touché avec pression	Mécanorécepteur à adaptation lente	Disque de Merkel Corpuscule de Ruffini	Fibres A β
		Terminaisons nerveuses libres	Fibres A δ
La température	Thermorécepteur	Terminaisons nerveuses libres	Fibres A δ Fibres C
La douleur	Nocicepteur		
La démangeaison	Pruricepteur		

En plus de ces neurones qui répondent au toucher et aux températures inoffensifs, certaines fibres nerveuses sensorielles A δ ou C à terminaisons libres ont un seuil d'activation plus élevé [Bessou *et al.* 1969] et initient des sensations douloureuses, elles sont appelés **nocicepteurs**. La majorité des nocicepteurs sont polymodaux, c'est-à-dire qu'ils peuvent être activés par plusieurs stimuli douloureux (mécanique, thermique, chimique) [Lynn *et al.* 1982, Lang *et al.* 1990]. Il a également été démontré l'existence d'une quatrième catégorie de fibres nerveuses, les **pruricepteurs**, responsables de la sensation de démangeaison, stimulés par l'histamine ou la voie PAR-2 (*protease-activated receptor-2*) [Misery 2014] ; certaines fibres nerveuses pouvant être à la fois nocicepteurs et pruricepteurs [Ikoma *et al.* 2006].

Parmi les fibres C nociceptives, on distingue deux sous-populations [Le Bars *et al.* 2002] :

- Les fibres « peptidergiques » qui synthétisent la SP (*substance P*) et le CGRP (*calcitonin gene related peptide*) et qui expriment les récepteurs spécifiques au NGF (*nerve growth factor*) ;
- Les fibres « non-peptidergiques » qui ne synthétisent pas ces molécules mais expriment entre autres le récepteur RET (*receptor tyrosine kinase*).

Outre les terminaisons libres et les corpuscules/disques présentés précédemment, le kératinocyte à lui seul est capable d'initier la nociception en réponse à divers stimuli [Talagas *et al.* 2019], comme démontré par trois récentes études [Baumbauer *et al.* 2015, Pang *et al.* 2015, Moehring *et al.* 2018] utilisant des modèles de souris transgéniques permettant l'activation sélective des kératinocytes sans exciter directement les fibres nerveuses associées.

Des études ont été menées afin d'identifier les récepteurs spécifiques capables de discriminer les sensations et en ont mis en évidence de nombreux, détaillés dans la revue de Lumpkin & Caterina [Lumpkin *et al.* 2007] qui explicite les mécanismes moléculaires de fonctionnement de ces thermo- et mécanorécepteurs.

Contrairement aux thermorécepteurs et pruricepteurs, dont la perception est essentiellement due à l'activation « classique » d'un récepteur membranaire, c'est l'ultrastructure particulière des « organes mécanosensoriels » (corpuscules et disques) qui joue un rôle très important dans leur capacité à sentir les distorsions cutanées [Zimmerman *et al.* 2014]. Cependant, il a été récemment démontré qu'il existe des récepteurs membranaires activés mécaniquement [Coste *et al.* 2012] et que Piezo2 est impliqué dans la sensation du toucher par les cellules de Merkel [Woo *et al.* 2014].

Dans ce mémoire, nous n'exposerons que les récepteurs TRPV1 et TRPA1 qui sont des canaux ioniques.

i. Le récepteur TRPV1

TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*) est l'un des premiers récepteurs membranaires identifiés comme étant impliqués dans la transmission de la sensation de chaleur. Cette protéine est notamment activée par une température supérieure à 43°C [Caterina *et al.* 1997], un pH inférieur à 6 [Tominaga *et al.* 1998], par la capsaïcine (le principal composant piquant des piments) [Thresh 1846, Caterina *et al.* 1997] et l'anandamide (cannabinoïde endogène) [Zygmunt *et al.* 1999]. Le seuil d'activation thermique de TRPV1 peut par ailleurs être abaissé par un environnement pro-inflammatoire [Ji *et al.* 2002].

TRPV1 est fortement exprimé par les fibres nociceptives A δ et C et transmet ainsi un message douloureux lors de son activation [Caterina *et al.* 2001]. TRPV1 est également exprimé par les kératinocytes [Inoue *et al.* 2002], les cellules de Langerhans et les cellules endothéliales [Rio *et al.* 2018].

TRPV1 semble protéger la peau de l'ulcération ou favoriser sa cicatrisation, comme démontré par l'augmentation de la surface cutanée endommagée suite à l'abrasion chimique chez la souris KO pour TRPV1, comparée à la souris « wild-type » [Li *et al.* 2012]. Également, sur un modèle d'abrasion de la cornée (tissu structurellement proche de la peau), la présence de TRPV1 chez la souris a montré qu'il favorisait la contraction de la plaie par les myofibroblastes [Okada *et al.* 2011], ainsi que la réépithélialisation [Sumioka *et al.* 2014].

ii. Le récepteur TRPA1

TRPA1 (*transient receptor potential ankyrin 1*) peut être activé par une multitude de molécules telle que celles contenues dans la cannelle (le cinnamaldéhyde), et par certaines molécules irritantes telles que le toluène. La température peut également activer ce récepteur, mais le seuil (chaleur ou froid) diffère selon les espèces. Chez l'humain et la souris, une température inférieure à 17°C déclenche son activation [Laursen *et al.* 2015].

TRPA1 est exprimé dans les fibres A δ et C, et très souvent dans des fibres exprimant aussi TRPV1 [Lumpkin *et al.* 2007]. Il est également exprimé dans les kératinocytes, et son activation améliore le rétablissement de la barrière cutanée [Denda *et al.* 2010].

Ces dernières années, des études ont montré que l'activation de TRPV1 ou TRPA1 par administration d'agonistes avait des effets sur le métabolisme global, et notamment dans la régulation de la glycémie des animaux diabétiques [Derbenev *et al.* 2016]. De plus TRPV1 semble être directement associé au développement et à la progression du diabète de type 1 et de type 2 [Suri *et al.* 2008].

c. La communication nerfs-peau

Des contacts anatomiques semblables à des synapses ont été décrits entre les terminaisons nerveuses et plusieurs types cellulaires de la peau : kératinocytes [Hilliges *et al.* 1995], mélanocytes [Hara *et al.* 1996], cellules de Merkel [Winkelmann *et al.* 1973], fibroblastes [Fujiwara *et al.* 2013], cellules de Langerhans [Gaudillere *et al.* 1996], mastocytes [Wiesner-Menzel *et al.* 1981] et cellules dendritiques dermiques [Sueki *et al.* 1995].

Après une stimulation nerveuse physique ou chimique, diverses molécules, appelés neuromédiateurs, sont produites et libérées par certaines fibres C, petites fibres A δ et fibres nerveuses autonomes qui agissent sur les cellules cibles neuronales et non neuronales. De plus, des cellules cutanées telles que des kératinocytes [Sloniecka *et al.* 2015], des cellules de Merkel [Leung *et al.* 2000] ou des lymphocytes [Wang *et al.* 2002] se sont révélées capables de libérer des neuromédiateurs.

Il est ainsi admis qu'il existe un réseau de communication entre les systèmes nerveux central et périphérique, les systèmes endocrinien et immunitaire et les cellules de la peau appelé « système neuro-endocrino-immuno-cutané » (SNEIC) [Misery 1997, Steinhoff *et al.* 2003, Roosterman *et al.* 2006]. Ce concept permet notamment d'expliquer l'influence du psychisme dans le déclenchement de certains désordres dermatologiques tels que le psoriasis ou la dermatite atopique.

Ces médiateurs dérivés de nerfs et des cellules cutanées peuvent jouer un rôle régulateur important dans la peau, notamment lors de la cicatrisation des plaies. Certains d'entre eux seront décrits dans la partie II.2 de l'état de l'art.

II. La cicatrisation de la peau

Lorsque la continuité de la barrière cutanée est rompue, un processus de cicatrisation se met en place. La cicatrisation est un phénomène naturel qui fait intervenir de nombreux types cellulaires et marqueurs biologiques de manière très organisée dans le temps.

Le but premier de la cicatrisation est de fermer la brèche rapidement afin d'éviter l'infection [Willyard 2018]. Cependant, chez l'adulte sain, ce processus rapide ne permet pas la restauration parfaite de l'intégrité et de la fonctionnalité cutanées initiales : il y a formation d'une cicatrice [Bayat *et al.* 2003]. À l'opposé, le fœtus et la personne âgée semblent régénérer (reconstruction à l'identique) plutôt que cicatriser ; et certains marqueurs ont été mis en évidence comme impliqués dans ce changement de processus [Rinkevich *et al.* 2015, Nishiguchi *et al.* 2018] et dans la capacité à restaurer la structure et la composition du tissu cutané originel [Ito *et al.* 2007, Plikus *et al.* 2017].

Nous présenterons ici uniquement la cicatrisation cutanée. Les phases, leur durée respective, les types cellulaires impliqués et les molécules sécrétées citées dans cette partie ont essentiellement été décrits à partir d'observations de la cicatrisation de plaies d'excision. Ainsi, il pourrait y avoir des variations avec les autres types de plaie (ulcère de pression, brûlure, incision ...).

1. Les phases de la cicatrisation non pathologique

Lorsque au moins l'épiderme et le derme sont endommagés, la cicatrisation se déroule en quatre phases qui se chevauchent dans le temps : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage ; chacune faisant intervenir des types cellulaires spécifiques (Figure 9).

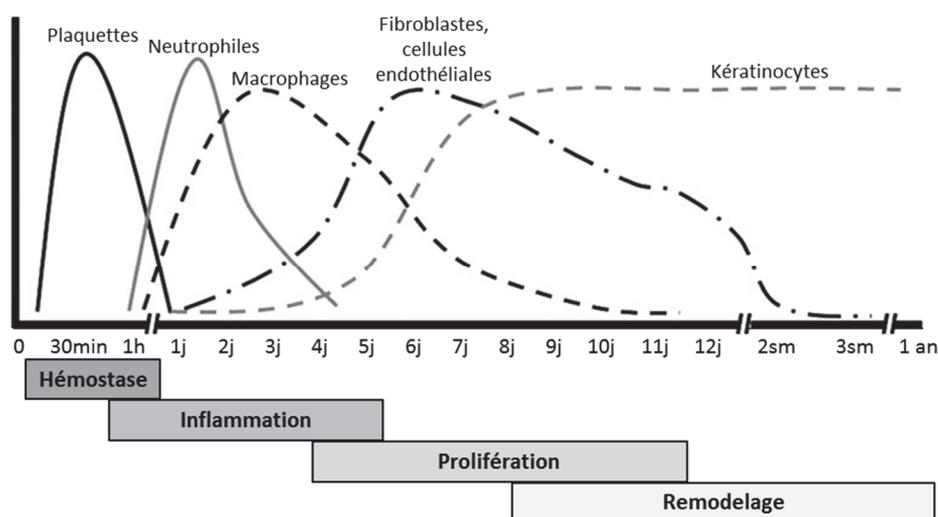


Figure 9. Les phases de cicatrisation cutanée non pathologique.

En haut, la cinétique des différents types cellulaires impliqués lors de la cicatrisation normale de la plaie. En bas, les quatre phases de cicatrisation. j, jour ; sm, semaines. Adapté de [Pence *et al.* 2014]

a. La phase d'hémostase

L'hémostase est la première étape du processus de cicatrisation (Figure 10A). Elle est initiée par le contact des plaquettes avec les protéines matricielles du tissu blessé, notamment le collagène [Nuyttens *et al.* 2011], ce qui entraîne l'activation des plaquettes, leur adhésion à l'endothélium lésé et leur agrégation, stoppant ainsi le saignement [Ruggeri 2002]. Le processus

de coagulation est également activé, la thrombine convertissant le fibrinogène en fibrine [Wolberg 2007], ce qui forme une matrice extracellulaire provisoire permettant par la suite la migration des autres types cellulaires impliqués dans la cicatrisation, tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, et les cellules immunitaires [Laurens *et al.* 2006].

Les plaquettes activées libèrent des chimiokines/chémoattractants qui induisent la migration des cellules immunitaires vers le site de lésion puis leur adhésion, ainsi que plusieurs facteurs de croissance nécessaires aux cellules cutanées, tels que le PDGF (*platelet derived growth factor*), le TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) et le TGF- β (*transforming growth factor beta*) [Golebiewska *et al.* 2015].

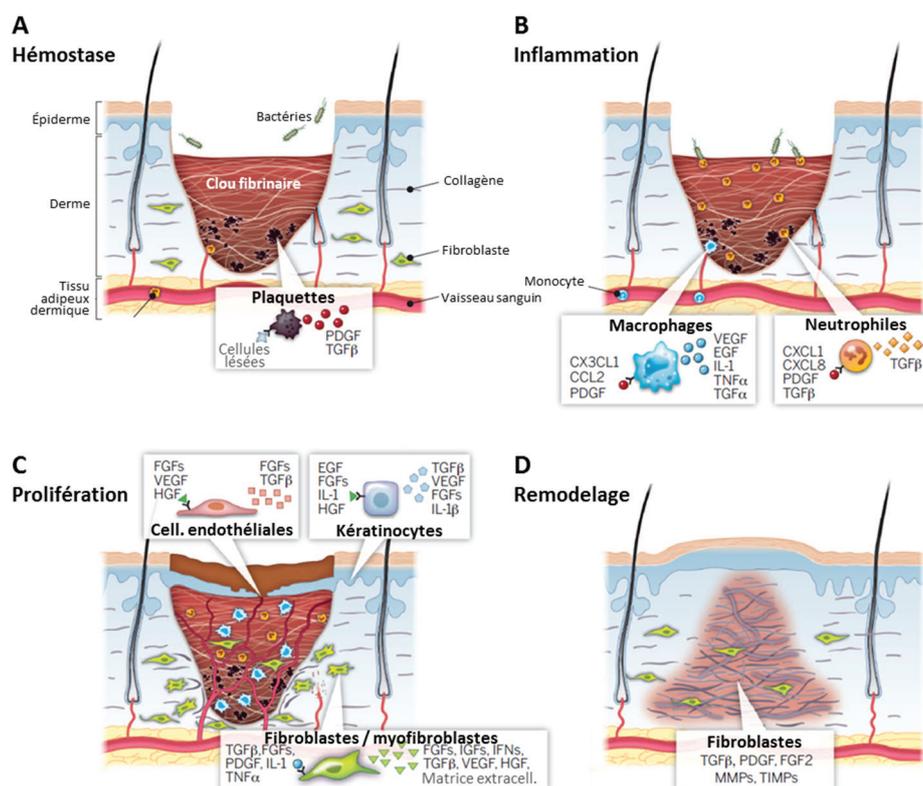


Figure 10. Les types cellulaires et molécules impliqués pendant la cicatrisation cutanée.

Chaque étape de la cicatrisation (A/ hémostase, B/ inflammation, C/ prolifération, D/ remodelage) est caractérisée par des événements moléculaires et cellulaires clés et est coordonnée par un nombre important de facteurs qui sont sécrétés et captés par les cellules de la plaie, dont certains sont représentés ici. Adapté de [Sun *et al.* 2014].

b. La phase inflammatoire

La deuxième phase de la cicatrisation est caractérisée par la migration de cellules immunitaires vers le site de la plaie (Figure 10B), dont les principales sont les neutrophiles et les macrophages. L'expression et l'activation de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires favorisent l'adhésion des cellules immunitaires à l'endothélium, qui migrent ensuite dans l'espace extravasculaire, sous l'effet du gradient de concentration en chimiokines [Vestweber 2015].

Phase pro-inflammatoire : débridement de la plaie et activité anti-infectieuse

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à arriver, jouant un rôle majeur dans le contrôle des infections (par phagocytose, par relargage de substances toxiques, ou par

NETose [Singh *et al.* 2017]), ainsi que dans le débridement de la plaie [Dovi *et al.* 2004] par la production de protéases dégradant la matrice extracellulaire endommagée (notamment la MMP-8 [Martins *et al.* 2013]).

24 à 48h après l'afflux de neutrophiles [Dovi *et al.* 2004], les monocytes résidents et ceux en circulation pénètrent dans la plaie et se différencient en macrophages de phénotype M1 pro-inflammatoire [Mosser 2003], produisant un grand nombre de médiateurs et de cytokines, dont les interleukines-1/6/12 (IL-1, IL-6, IL-12), le TNF- α et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), et participant au débridement de la plaie et à la phagocytose des agents infectieux [Koh *et al.* 2011].

Les neutrophiles ont une grande capacité à dégrader la matrice, ce qui peut être délétère pour la résolution de la cicatrisation. De plus ils produisent une grande quantité de radicaux libres, créant un stress oxydatif local pouvant causer des dommages tissulaires additionnels [Wilgus *et al.* 2003]. Aussi, les macrophages participent à la suppression des neutrophiles présents par de multiples manières, notamment par la phagocytose des neutrophiles apoptotiques selon un processus appelé l'efférocytose [Khanna *et al.* 2010]. Ce processus permet la transition des macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire [Fadok *et al.* 1998].

Phase anti-inflammatoire : stimulation pour la prolifération cellulaire

Les macrophages de phénotype M2 influencent la cicatrisation des plaies par la synthèse de molécules favorisant la prolifération cellulaire et la synthèse protéique telles que le TGF- β 1, le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), ainsi que par la production de protéases et de leurs inhibiteurs qui influent sur le contenu et le remodelage de la MEC. Ils sécrètent également des médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'antagoniste de l'IL-1R (IL-1RA), le récepteur de l'IL-1 de type II et l'IL-10 [Koh *et al.* 2011].

Ainsi la transition M1-M2 des macrophages induit la résolution de la phase inflammatoire qui est nécessaire pour la mise en place de la phase proliférative de la cicatrisation [Mosser 2003].

c. La phase de prolifération cellulaire

Suite à la phase inflammatoire, la matrice extracellulaire provisoire composée de fibrine commence à être remplacée par un tissu conjonctif appelé tissu de granulation, constitué de fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires et matrice extracellulaire (Figure 10C).

Production de matrice extracellulaire et contraction de la plaie

Les fibroblastes provenant des berges non lésées ou dérivant des fibrocytes circulant (sous-population de leucocytes) [Abe *et al.* 2001] migrent dans la plaie sous l'effet de molécules (PDGF, FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- β et IL-1) sécrétées majoritairement par les plaquettes et les cellules immunitaires [Werner *et al.* 2003]. Les fibroblastes utilisent la matrice provisoire comme échafaudage et commencent alors à proliférer. Ils dégradent cette matrice (via la sécrétion des MMP-1, -2, -3, -14, -19 [Löffek *et al.* 2011]) et produisent une grande quantité de collagène de type III et de la fibronectine. Ainsi sous l'effet du changement de propriétés mécaniques du microenvironnement et du TGF- β [Hinz 2007], ainsi que de la périostine [Zhou *et al.* 2010, Kanaoka *et al.* 2018] (sécrétée par les fibroblastes eux-mêmes et les kératinocytes au cours de la cicatrisation [Jackson-Boeters *et al.* 2009]), certains fibroblastes se différencient en myofibroblastes, cellules contractiles riches en α -SMA (*smooth muscle*

actin), qui, par leur force de traction, tirent les berges vers le centre de la plaie, réduisant ainsi progressivement la taille de la plaie [Kordestani 2019].

Angiogenèse

De nouveaux vaisseaux sanguins se forment dans le tissu de granulation par la migration et la prolifération des cellules endothéliales provenant du réseau capillaire préexistant. Cette angiogenèse est induite par divers facteurs pro-angiogéniques produits par les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules immunitaires, notamment le VEGF produit en réponse à l'hypoxie locale [Brown *et al.* 1992, Shweiki *et al.* 1992] et le FGF [Murakami *et al.* 2008].

Réinnervation

La régénération des fibres nerveuses (réinnervation) de la peau lésée commence dès les premiers jours et se poursuit pendant toute la phase de prolifération, si bien que la quantité de fibres PGP9.5 positives dans le néoépiderme/néoderme du rongeur trois semaines post-excision est proche de celle de la peau non lésée [Wallengren *et al.* 1999, Henderson *et al.* 2006]. Les fibres nerveuses nouvellement formées peuvent être identifiées avec le marqueur GAP43 (*growth-associated protein 43*) qui semble être impliqué dans l'orientation de la division cellulaire [Zhao *et al.* 2011]. Il a été démontré que les fibres nerveuses et le système vasculaire interagissent via diverses molécules qu'ils sécrètent et qui façonnent une architecture parallèle des nerfs et des vaisseaux dans la peau [Weinstein 2005].

Réépithélialisation / réépidermisation

Parallèlement à la formation du tissu de granulation, et sous l'action de divers facteurs de croissance libérés par l'épiderme lésé, tels que l'EGF (*epidermal growth factor*), le KGF (*keratinocyte growth factor*) et le FGF-2, les kératinocytes des bords de la lésion ou des annexes cutanées se mettent à migrer et proliférer [Woodley *et al.* 1993].

Deux études récentes sur la souris ont confirmé l'existence de deux compartiments concentriques et distincts dans l'espace ayant une signature moléculaire spécifique : juste au bord de la lésion se trouve une « langue » de kératinocytes migrant et non proliférant (exprimant notamment les MMP-1, -9, -10, -13 leur permettent de dégrader la matrice et diminuer l'adhérence au tissu sous-jacent), suivi d'une zone d'épiderme plus épais contenant des kératinocytes fortement prolifératifs (exprimant notamment la MMP-3) [Saarialho-Kere *et al.* 1994, Aragona *et al.* 2017, Park *et al.* 2017].

Lorsque les kératinocytes migrant se rejoignent il y a alors formation d'un néoépiderme, qui se stratifie et se différencie afin de restaurer la barrière cutanée.

d. La phase de remodelage

Durant la phase de remodelage (Figure 10D), le tissu de granulation se transforme progressivement en tissu cicatriciel mature. Ce processus, pouvant durer plusieurs mois, permet la reconstruction de la peau qui retrouve ainsi une constitution et une fonction proches du tissu non lésé.

Remodelage matriciel

La matrice extracellulaire à prédominance collagène de type III est dégradée par les macrophages et les fibroblastes, puis remplacée par une nouvelle matrice à prédominance collagène de type I par les fibroblastes qui lui confère une meilleure résistance [Krzyszczuk *et*

al. 2018]. La périostine participe au remodelage en stimulant la sécrétion de collagène de type I par les fibroblastes ainsi que sa fibrillogénèse [Norris *et al.* 2007].

Il existe un équilibre fin tout au long de la cicatrisation entre les MMP et les TIMP pour réguler la production et la dégradation de la MEC, TIMP-3 semblant avoir un rôle prépondérant dans le remodelage de la matrice [Martins *et al.* 2013].

Remodelage vasculaire

Pendant le remodelage, la densité vasculaire diminue, et bien que les mécanismes précis de cette régression ne soient pas encore totalement compris, les changements du microenvironnement (collagènes, résistance mécanique) semblent y contribuer [Wietecha *et al.* 2013].

Apoptose cellulaire

La transition de la phase proliférative à la phase de remodelage se caractérise également par la diminution importante du nombre de cellules présentes dans le tissu de granulation / néoderme : les macrophages, les myofibroblastes et une partie de cellules endothéliales entrent en apoptose [Desmouliere *et al.* 1995, Krzyszczyk *et al.* 2018].

2. Le rôle des neuromédiateurs dans la cicatrisation

Outre les chimiokines, facteurs de croissance et enzymes cités dans la partie précédente, il est maintenant reconnu que de nombreux neuromédiateurs sont sécrétés au niveau de la peau et ont une action sur l'homéostasie cutanée et la cicatrisation. Ces molécules peuvent être synthétisées par les fibres nerveuses, mais également les cellules cutanées et les cellules immunitaires.

Le terme exact pour nommer ce groupe de molécules n'est pas bien défini dans la littérature. Aussi dans ce mémoire nous les appellerons « neuromédiateurs ». Ces « neuromédiateurs » peuvent être des neurotransmetteurs, des neuropeptides, des neurohormones ou des neurotrophines. L'activité connue de certains de ces neuromédiateurs sur la cicatrisation est décrite ci-après.

a. Les neurotransmetteurs

L'acétylcholine et les catécholamines sont de petits messagers non-peptidiques. Auparavant, ces molécules étaient décrites uniquement comme des médiateurs sécrétés par les fibres nerveuses autonomes. Cependant de récentes études ont montré qu'ils étaient également sécrétés par des cellules non neuronales et jouaient un rôle important dans l'homéostasie et l'inflammation cutanée.

i. L'acétylcholine

L'acétylcholine est sécrétée au niveau cutané par les neurones autonomes cholinergiques, et de nombreux types cellulaires de la peau des mammifères qui sécrètent ce neurotransmetteur et expriment ses récepteurs (récepteurs muscariniques et nicotiniques) [Wessler *et al.* 2008]. Ainsi il a été montré récemment qu'une faible dose d'acétylcholine en application topique accélère la cicatrisation cutanée en favorisant la migration des kératinocytes et l'angiogenèse [Uberti *et al.* 2018].

ii. Les catécholamines

Les catécholamines (noradrénaline, adrénaline ...) sont sécrétées au niveau de la peau par les neurones autonomes adrénérgiques, les kératinocytes et les mélanocytes [Roosterman *et al.* 2006] ; et les récepteurs adrénérgiques sont notamment exprimés par les kératinocytes, les fibroblastes, les monocytes et les lymphocytes T [Roosterman *et al.* 2006, Ashrafi *et al.* 2016].

La stimulation des récepteurs α -adrénérgiques augmente la production de TGF- β par les fibroblastes cutanés et favorise leur migration et la production de MEC [Ashrafi *et al.* 2016]. Tandis que le blocage des récepteurs β -adrénérgiques accélère la migration des kératinocytes et la réépithélialisation des plaies [Pullar *et al.* 2006].

b. Les neuropeptides : la substance P et le CGRP en détail

Il existe de nombreux neuropeptides sécrétés au niveau de la peau et qui jouent un rôle dans la cicatrisation. Cependant dans cette partie, seuls la substance P et le CGRP seront détaillés. En effet, ces deux neuropeptides sont sécrétés par les nerfs suite à l'activation de TRPV1 ou TRPA1 qui, comme décrit précédemment, semblent être impliqués dans certaines régulations métaboliques du diabète. De plus, la substance P et le CGRP sont deux acteurs majeurs de l'inflammation neurogène cutanée définie comme l'inflammation provoquée (ou amplifiée) par une libération excessive de neuropeptides dans la peau à partir des terminaisons des nerfs sensitifs activés localement ou antidromiquement (du corps cellulaire vers les terminaisons), et entraînent la dégranulation, la vasodilatation et l'extravasation des protéines plasmatiques et des cellules immunitaires [Gouin *et al.* 2017].

i. La substance P

La substance P (SP) est un peptide de 11 acides aminés qui est impliqué dans la transmission centrale de la douleur [Roosterman *et al.* 2006].

Expression cellulaire de la substance P et de son récepteur

Ce neuropeptide et son récepteur de haute affinité **NK-1R** (*tachykinin receptor 1*) sont sécrété/exprimé au niveau de la peau par les fibres nerveuses sensorielles, les cellules endothéliales microvasculaires dermiques, les fibroblastes et les kératinocytes [Quinlan *et al.* 1998, Liu *et al.* 2006, Roosterman *et al.* 2006, Blais *et al.* 2014].

Modulation cellulaire de l'action de la substance P

NK-1R est un récepteur couplé aux protéines G et suite à son activation par la SP, le complexe est rapidement endocyté de manière dépendante du système clathrine/ β -arrestine [Jensen *et al.* 2017], permettant la signalisation intracellulaire. En fonction de la concentration de la substance P, le récepteur peut alors soit être recyclé à la membrane (resensibilisation), soit être retenu prêt du noyau provoquant une insensibilité cellulaire temporaire à ce neuropeptide [Roosterman *et al.* 2004].

L'action de la SP peut également être modulée par la **NEP** (*neutral endopeptidase*). La NEP est une métalloprotéinase qui entre en compétition avec le récepteur NK-1R et dégrade enzymatiquement la SP [Okamoto *et al.* 1994]. La NEP est liée à la membrane plasmique et a été détectée dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les kératinocytes [Olerud *et al.* 1999, Spenny *et al.* 2002].

L'ECE-1 (*endothelin-converting enzyme-1*) est également capable de dégrader la SP, en particulier au niveau des endosomes [Johnson *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2017].

Effet de la substance P sur la cicatrisation

Il a été montré que l'administration exogène de SP accélère la cicatrisation cutanée [Delgado *et al.* 2005]. En effet, la SP est l'un des principaux médiateurs de la perméabilité vasculaire locale, permettant l'extravasation plasmatique des cellules immunitaires [Holzer 1998]. La SP induit également une légère vasodilatation [Branchet-Gumila *et al.* 1999], module la synthèse et la libération de cytokines proinflammatoires (interleukines, TGF- α , TNF- α , ...) par les différents types cellulaires présents dans la plaie, et stimule l'activité cellulaire inflammatoire [Shi *et al.* 2013, Ashrafi *et al.* 2016].

Outre son activité pendant la phase inflammatoire de la cicatrisation, la SP favorise la migration et la prolifération des fibroblastes [Ziche *et al.* 1990a, Parenti *et al.* 1996, Cheret *et al.* 2014], la migration des kératinocytes [Blais *et al.* 2014], la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse [Ziche *et al.* 1990b, Um *et al.* 2016]. Ce neuropeptide stimule également la production de collagènes de type I et III et participe à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [Cheret *et al.* 2014, Um *et al.* 2016]. La SP induit aussi la synthèse et la sécrétion de NGF (*nerve growth factor*) par les kératinocytes [Dallos *et al.* 2006, Shi *et al.* 2013] et les cellules endothéliales microvasculaires dermiques [Gibran *et al.* 2003], le NGF stimulant la croissance des neurites et participant ainsi à la régénération nerveuse lors de la cicatrisation.

Enfin, la SP semble participer à la phase de remodelage en augmentant l'activité de la MMP-2 plusieurs jours post-lésion *ex vivo* [Cheret *et al.* 2014].

ii. Le CGRP

Le CGRP est l'un des neuropeptides les plus abondants dans la peau et est souvent colocalisé avec la SP dans les fibres nerveuses sensorielles cutanées [Gibbins *et al.* 1987]. Il est, comme la SP, impliqué dans la transmission centrale de la douleur [Roosterman *et al.* 2006].

Le CGRP est un peptide de 37 acides aminés. Il existe sous deux isoformes, le CGRP- α (ou CGRP-1) et le CGRP- β (ou CGRP-2) (codés par les gènes CALCA et CALCB respectivement), qui diffèrent par trois acides aminés. Leurs activités biologiques semblent similaires [Roosterman *et al.* 2006, Russell *et al.* 2014], bien que certaines études aient montré une absence/faible activité de la forme beta sur des cellules non cutanées [Mulderry *et al.* 1988, Hirt *et al.* 1997].

Expression cellulaire du CGRP

Au niveau des fibres nerveuses sensorielles, les deux isoformes de CGRP sont exprimés, mais la forme alpha est majoritaire [Mulderry *et al.* 1988, Roggenkamp *et al.* 2013]. Bien que les nerfs (autonomes et sensoriels) soient la source principale de CGRP [Russell *et al.* 2014], ce neuropeptide est également produit par des cellules non neuronales, telles que les cellules endothéliales [Cai *et al.* 1993], les adipocytes et les macrophages [Linscheid *et al.* 2004], les lymphocytes [Wang *et al.* 2002] et les kératinocytes (expression génique des deux isoformes [Shi *et al.* 2013] et sécrétion dans le milieu extracellulaire de la forme beta [Hou *et al.* 2011, Roggenkamp *et al.* 2013]).

Le récepteur au CGRP : un complexe de trois protéines nécessaires pour sa spécificité, sa maturation et son activité

Le CGRP appartient à la superfamille des « calcitonin gene peptides » qui comprend aussi l'amyline, la calcitonine, l'adrénomédulline, et l'adrénomédulline 2 (ou intermédine);

[Wimalawansa 1997, Hay *et al.* 2018]. Toutes ces protéines partagent des sous-unités de récepteurs, dont la combinaison régit l'affinité au ligand (Figure 11).

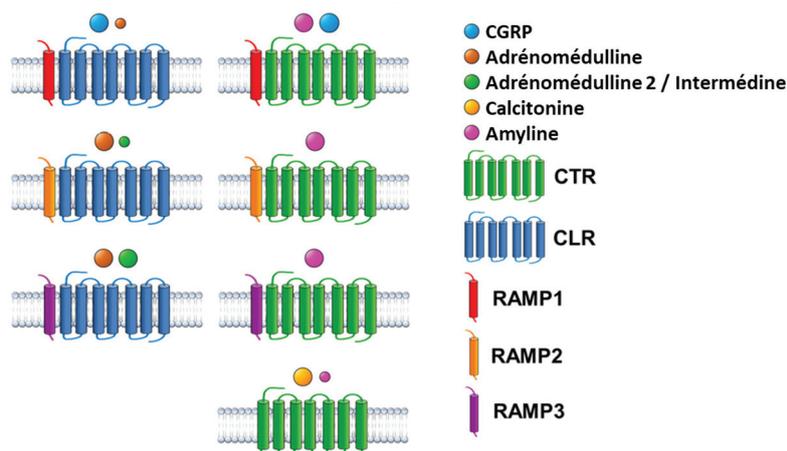


Figure 11. Récepteurs membranaires des peptides de la superfamille des « calcitonin gene peptides » et affinité respective pour leurs ligands.

L'association des RAMP avec le CLR ou le CTR donne divers récepteurs pour le CGRP, l'adrénomédulline, l'adrénomédulline 2 / intermédiaire, la calcitonine et l'amyline, avec chacun une affinité différente pour leurs ligands. Adapté de [Hay *et al.* 2018].

Ainsi, le récepteur de haute affinité et spécificité pour le CGRP est le complexe formé de **RAMP1** (*receptor activity-modifying protein 1*) et de **CLR** (*calcitonin receptor-like receptor*) [Hay *et al.* 2018], aussi bien chez l'humain que chez le rongeur [Husmann *et al.* 2000, Choksi *et al.* 2002, Lennerz *et al.* 2008], au niveau de leur partie extracellulaire [Banerjee *et al.* 2006].

RAMP1 joue un rôle de chaperonne pour CLR en permettant sa glycosylation terminale [McLatchie *et al.* 1998, Fraser *et al.* 1999], condition absolue pour permettre la fixation du CGRP [Hilairat *et al.* 2001b]. En l'absence de CLR, RAMP1 reste au niveau du réticulum endoplasmique où il s'homodimérise [Hilairat *et al.* 2001a]. À l'inverse, CLR peut seul (et non glycosylé) atteindre la membrane plasmique [Flahaut *et al.* 2002, Udawela *et al.* 2006]. Il a ainsi été montré que la formation du complexe RAMP1-CLR n'est possible que lors de leur expression simultanée [Kuwasako *et al.* 2000].

De plus, la transduction du signal suite à la fixation du CGRP ne peut se faire que si la partie intracellulaire de CLR (couplée aux protéines G) interagit avec **RCP** (*receptor component protein*) [Evans *et al.* 2000] au niveau de la membrane [Cueille *et al.* 2004]. RCP n'est pas spécifique du récepteur au CGRP car il est également nécessaire à la transduction du signal pour les récepteurs RAMP2,3-CLR [Prado *et al.* 2001], et peut être localisé au niveau du noyau où il catalyse la transcription de l'ADN en ARN [Uniprot-RCP9].

Ainsi le complexe de protéines jouant le rôle de récepteur fonctionnel au CGRP est **RAMP1-CLR-RCP** (Figure 12).

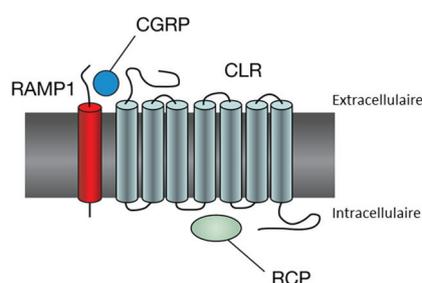


Figure 12. Schéma du récepteur fonctionnel du CGRP composé du complexe de RAMP1, CLR et RCP.

Tiré de [Raddant *et al.* 2011]

Expression cellulaire du récepteur au CGRP

Dans la peau, l'expression des sous-unités du récepteur au CGRP a majoritairement été étudiée au niveau génique (ARN messenger (ARNm)) et peu au niveau protéique. Ainsi les sous-unités sont exprimées par :

- les kératinocytes (ARNm de RAMP1, CLR et RCP) [Albertin *et al.* 2003, Hou *et al.* 2011, Roggenkamp *et al.* 2013] ;
- les fibroblastes (ARNm de RAMP1 et CLR) [Albertin *et al.* 2003] ;
- les cellules endothéliales microvasculaires dermiques (ARNm de RAMP1, CLR, RCP) [Huang *et al.* 2011] ;
- les macrophages dans le tissu de granulation (protéine RAMP1) [Kurashige *et al.* 2014].

Modulation cellulaire de l'action du CGRP

Après fixation du CGRP sur le complexe RAMP1-CLR-RCP, et comme pour la substance P, l'ensemble ligand-récepteur est internalisé de manière dépendante du système clathrine/ β -arrestine [Hilairt *et al.* 2001a, Padilla *et al.* 2007], et le recyclage à la membrane des sous-unités du récepteur ou leur dégradation dépend du temps de présence du CGRP dans le milieu extracellulaire [Cottrell *et al.* 2007].

La NEP dégrade la substance P, mais également, et dans une bien moindre mesure, le CGRP [Katayama *et al.* 1991]. Le CGRP peut aussi être dégradé par l'ECE-1 au niveau intracellulaire [Padilla *et al.* 2007, Hartopo *et al.* 2013], et a des sites de coupure pour l'IDE (*insulin-degrading enzyme*) [Kim *et al.* 2012].

Effet du CGRP sur la cicatrisation

Le CGRP a montré son effet bénéfique sur la durée de la cicatrisation par administration exogène [Khalil *et al.* 1996, Engin 1998], et l'effet négatif de son ablation sur le temps de fermeture de la plaie [Toda *et al.* 2008].

Cet effet est en partie dû au fait que le CGRP est tout d'abord un puissant vasodilatateur [Brain *et al.* 1985], participant ainsi à l'inflammation neurogène. Ensuite, différentes études ont montré un effet soit pro- soit anti-inflammatoire du CGRP, dépendant de la situation [Russell *et al.* 2014]. En effet, le CGRP stimule l'adhésion de cellules immunitaires et la sécrétion de chimiokines et médiateurs pro-inflammatoires par les cellules cutanées environnantes [Sung *et al.* 1992, Roosterman *et al.* 2006, Shi *et al.* 2013]. Mais le CGRP semble principalement avoir des effets anti-inflammatoires localement en diminuant l'œdème chez le rongeur [Clementi *et al.* 1994, Clementi *et al.* 1995], l'accumulation de neutrophiles [Gherardini *et al.* 1998], la production de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des monocytes périphériques [Scholzen *et al.* 1998, Cheret *et al.* 2013, Toriyama *et al.* 2015].

Le CGRP stimule aussi la prolifération des kératinocytes [Seike *et al.* 2002, Roggenkamp *et al.* 2013] et des fibroblastes [Cheret *et al.* 2014], et la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse [Haegerstrand *et al.* 1990, Toda *et al.* 2008, Mapp *et al.* 2012]. Ce neuropeptide favorise également la mise en place du tissu de granulation par l'augmentation du dépôt de collagène de type III et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [Cheret *et al.* 2014, Yan *et al.* 2019]. Le CGRP, tout comme la substance P, induit la synthèse et la sécrétion de NGF par les kératinocytes, favorisant la repousse nerveuse [Dallos *et al.* 2006, Shi *et al.* 2013].

c. Les neurotrophines : cas du NGF

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance essentiels pour la croissance, la prolifération et le maintien des fibres nerveuses. On en dénombre quatre : le NGF (*nerve growth factor*), la NT-3 (*neurotrophin-3*), la NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*) et le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Les neurotrophines peuvent se lier à deux types de récepteurs [Roosterman *et al.* 2006, Cheret *et al.* 2013]:

- p75NTR (*neurotrophin receptor p75*) à faible affinité pour toutes les neurotrophines ;
- les récepteurs Trk (*tropomyosin receptor kinase*) à haute affinité et sélectivité au ligand. Ainsi TrkA lie fortement le NGF, TrkB lie la NT3, la NT-4/5 et le BDNF, et TrkC lie le NT-3.

Le NGF participe à la boucle d'amplification entre la SP, le CGRP et TRPV1

Dans ce travail de thèse nous nous sommes concentrés sur le NGF et ses récepteurs. En effet, comme énoncé précédemment, la substance P et le CGRP stimule la sécrétion de NGF par les cellules cutanées. De plus, le NGF stimule à nouveau la production et la libération de ces deux neuropeptides par l'activation indirecte de TRPV1 des fibres nerveuses [Price *et al.* 2005, Skoff *et al.* 2006]. Il existe donc une boucle d'amplification entre ces molécules et entre cellules cutanées et fibres nerveuses.

Expression cellulaire du NGF et de ses récepteurs

Le NGF est un polypeptide de 241 acides aminés. Ces récepteurs sont **p75NTR** (faible affinité) et **TrkA** (haute affinité). Mais il a été montré que ces deux protéines peuvent s'assembler (TrkA-p75NTR, TrkA-TrkA, TrkA-p75NTR-TrkA (captant 2 NGF)) et ainsi former une multitude de récepteurs possibles [Wehrman *et al.* 2007].

Cette neurotrophine et ses récepteurs sont synthétisés au niveau de la peau par les fibres nerveuses sensorielles et autonomes [Anand *et al.* 1996, Liang *et al.* 1999, Ritter *et al.* 2000], les kératinocytes [Shibayama *et al.* 1996, Liang *et al.* 1999, Marconi *et al.* 2003], les mélanocytes [Marconi *et al.* 2006], les fibroblastes [Palazzo *et al.* 2012] et diverses cellules immunitaires [Roosterman *et al.* 2006].

Effet du NGF sur la cicatrisation

Les récepteurs p75NTR et TrkA semblent entrer en compétition et avoir des effets opposés lors de leur activation par le NGF (apoptose et survie, respectivement) [Yoon *et al.* 1998]. L'effet du NGF observé peut donc dépendre de l'expression respective de ses deux récepteurs dans le type cellulaire considéré, mais aussi de leur éventuelle complexation [Micera *et al.* 2007].

Toutefois, l'ajout de NGF sur une plaie favorise sa cicatrisation [Matsuda *et al.* 1998, Nithya *et al.* 2003]. Cette neurotrophine est d'ailleurs constitutivement sécrétée en grande quantité dans la plaie avec un pic 24h post-excision [Matsuda *et al.* 1998]. Le NGF peut alors être capté par les fibres nerveuses et être transporté de manière rétrograde jusqu'aux GRD, favorisant la survie et la repousse des fibres nerveuses [Rich *et al.* 1987, Lewin *et al.* 1993], et stimulant la production de neuropeptides (dont la SP et le CGRP) [Supowit *et al.* 2001, Price *et al.* 2005, Ackermann *et al.* 2013].

Il a également été montré un effet direct du NGF sur certains types cellulaires. Ainsi, le NGF améliore les fonctions des monocytes/macrophages [Susaki *et al.* 1996], il stimule la prolifération des kératinocytes [Pincelli *et al.* 2000], la migration des fibroblastes et leur

différenciation en myofibroblastes [Palazzo *et al.* 2012], et induit la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires dermiques [Raychaudhuri *et al.* 2001] et l'angiogènèse [Emanueli *et al.* 2002].

Comme décrit précédemment, le NGF, la SP, le CGRP et TRPV1 participent à la cicatrisation cutanée et s'autorégulent. On peut ainsi proposer ce schéma récapitulatif (Figure 13).

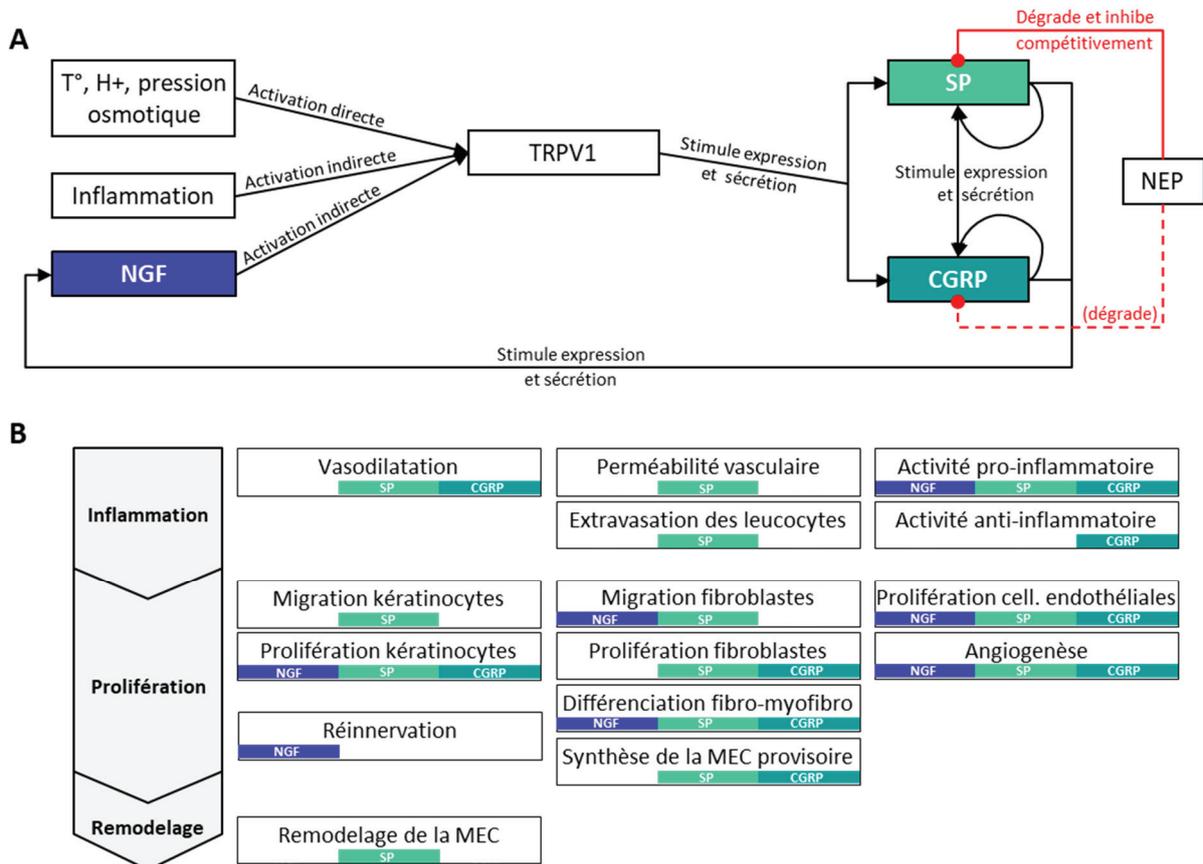


Figure 13. Schéma de A/ la régulation et B/ l'activité directe dans la cicatrisation de NGF, TRPV1, SP et CGRP.

III. La souris, modèle d'étude de la cicatrisation

Dans le domaine de la recherche en biologie de la peau il existe de nombreux modèles : *in vitro* (2D, 3D, co-culture), *ex vivo* (tissu mis en culture) et *in vivo* (animal).

La cicatrisation de la peau est un phénomène faisant participer de nombreux types cellulaires, et les modèles *in vitro* / *ex vivo* actuels ne permettent pas de recréer la complexité du processus de réparation, notamment car il n'y a pas/peu la contribution des systèmes vasculaires, immunitaires et nerveux. Les modèles animaux sont donc essentiels pour élucider les mécanismes physiologiques et pathologiques de la réparation de la peau, en particulier avec le diabète.

1. Intérêts de la souris de laboratoire

La souris est le modèle animal le plus couramment utilisé. En effet, c'est un mammifère dont le génome est très similaire à celui de l'homme [Copeland *et al.* 1993], la souris est facile à manipuler et à entretenir, se reproduit rapidement et est économiquement accessible. Cette espèce peut être standardisée en fonction de l'âge, du sexe, et des prédispositions génétiques, et permet l'utilisation d'un nombre relativement élevé d'animaux pour la validation statistique. De par sa fréquente utilisation, il existe déjà un nombre important de réactifs (anticorps, ...) spécifiques de cette espèce, ce qui facilite le travail expérimental [Sundberg *et al.* 1996].

De plus, des lignées génétiquement modifiées ont été développées pour étudier les voies moléculaires spécifiques de la réparation de la peau [Zomer *et al.* 2018]. Pour ces raisons, la grande majorité des études concernant la cicatrisation des plaies cutanées, dont ce travail de thèse, est réalisée chez la souris.

L'intérêt de différentes espèces animales pour l'étude de la cicatrisation a été révisé dans le chapitre de livre intitulé « Animal models in chronic wound healing research: for innovations and emerging technologies in wound care » [Remoué *et al.* 2020], consultable en Annexe 1 page 183.

2. Comparaison de la structure et du processus de cicatrisation entre peaux humaine et murine

La peau de la souris est semblable à celle de l'humain, mais il existe des différences, en particulier de structure (Figure 14), qui modifient (positivement ou négativement) le processus de cicatrisation tel qu'observé chez l'homme.

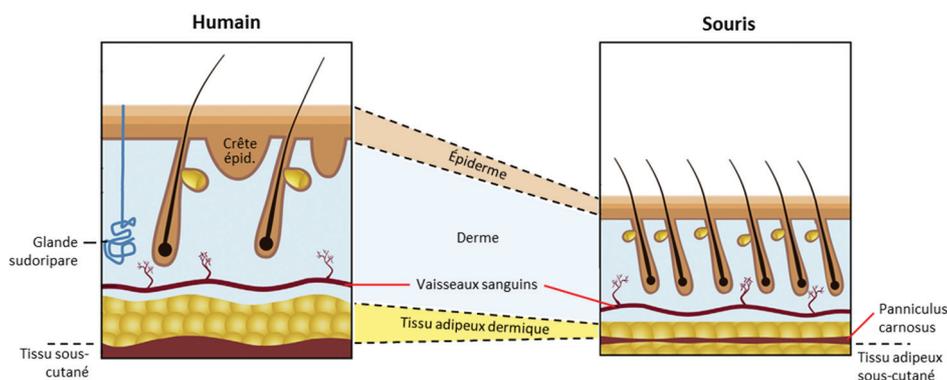


Figure 14. Comparaison morphologique de la peau humaine et de la peau de souris.

Adapté de [Driskell *et al.* 2014, Zomer *et al.* 2018].

Epiderme et derme

La peau de la souris comporte les mêmes couches dans l'épiderme (couches basale, épineuse, granuleuse, cornée) et le derme (réticulaire et papillaire) que dans la peau humaine. Néanmoins, leur épaisseur est très réduite chez la souris (Figures 14 et 15) : environ 17 μ m et 180 μ m contre 117 μ m et 2300 μ m chez l'humain pour l'épiderme et le derme respectivement [Wei *et al.* 2017]. Le nombre réduit d'assises kératinocytaires chez la souris contribue à réduire le temps de renouvellement de l'épiderme : il n'est que de 8-10 jours [Potten 1975, Koster 2009], contre 26-28 jours chez l'humain [Rothberg *et al.* 1961].

Contrairement à la peau humaine, la peau de la souris ne comporte pas de crête épidermique et papille dermique. Cependant, des structures semblables peuvent apparaître lors de la cicatrisation d'une plaie chez la souris et sont souvent décrites comme des «hyperplasies pseudo-épithéliomateuses» ou «hyperplasies pseudo-carcinomateuses» [Sundberg 2004].

Bien que le derme murin soit plus fin que celui de l'humain, il présente des fibres élastiques et amas de collagènes de types I et III semblables à l'humain, avec des résultats similaires pendant la phase de remodelage lors de la cicatrisation [Zomer *et al.* 2018].

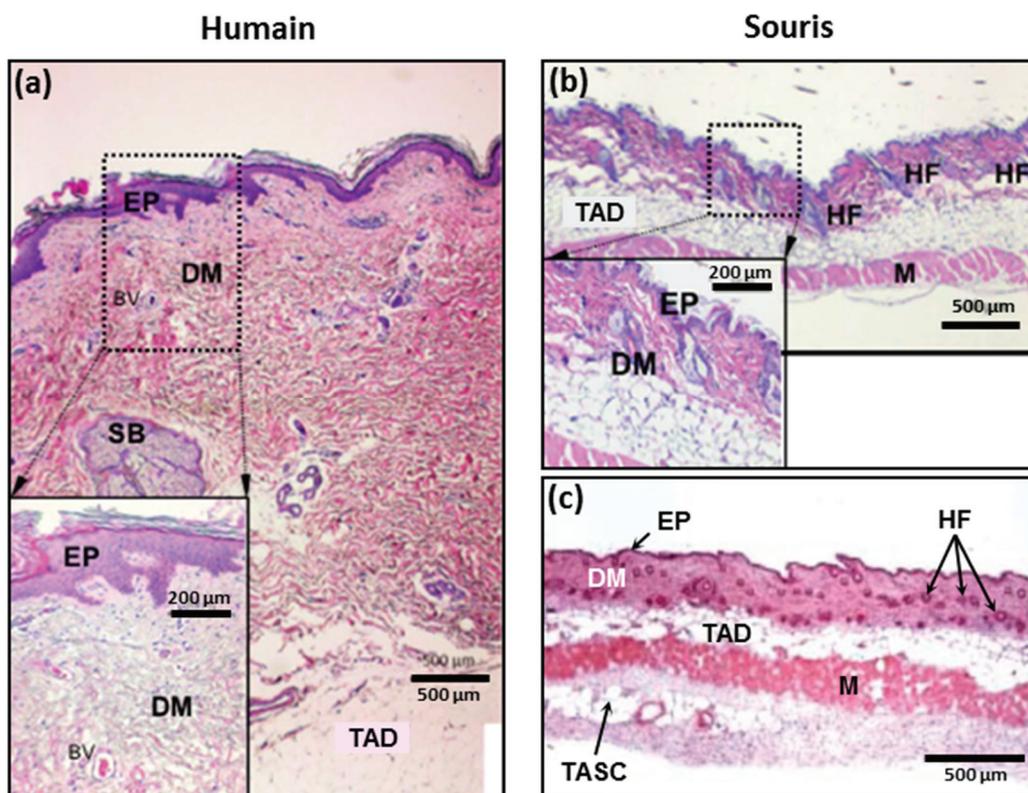


Figure 15. Comparaison histologique de la peau humaine et de la peau de souris.

Coupes de peau (a) humaine et des zones (b) spinale et (c) du flanc de souris colorées à l'HE. EP, épiderme ; DM, derme ; BV, vaisseau sanguin ; SB, glande sébacée ; HF, follicule pileux ; M, muscle ; TAD, tissu adipeux dermique ; TASC, tissu adipeux sous-cutané. Adapté de [O'Brien *et al.* 2014, Wei *et al.* 2017].

Tissu sous-dermique

La structure du tissu graisseux situé sous le derme diffère : chez l'humain il est constitué d'une seule couche (le tissu adipeux dermique), alors que la peau murine comporte deux couches (Figures 14 et 15) : le tissu adipeux dermique et le tissu adipeux sous-cutané [Driskell *et al.* 2014], dont le développement est indépendant [Wojciechowicz *et al.* 2013]. Ces deux tissus graisseux sont séparés par une fine couche de tissu musculaire appelée *Panniculus carnosus*, qui confère à la peau de la souris un fort potentiel de contraction. Ceci s'ajoutant à

l'action des myofibroblastes pendant la cicatrisation, il est estimé qu'une plaie se referme à 90% par contraction chez la souris, contre seulement 25-50% chez l'humain [Hayward *et al.* 1991].

Annexes cutanées

À la différence de l'homme, chez qui les cellules souches des glandes sudoripares éccrines contribuent grandement à la réépidermisation [Rittié *et al.* 2013], la peau de la souris est quasiment dépourvue de glandes sudoripares, avec seulement quelques glandes éccrines au niveau de leurs coussinets [Quick *et al.* 1984, Sundberg *et al.* 1996].

Par contre, la peau de la souris contient beaucoup plus de follicules pileux que la peau humaine [Sundberg *et al.* 1996], et il a été démontré qu'une zone de peau à haute densité capillaire cicatrise plus rapidement qu'une zone avec peu de follicules [Martinot *et al.* 1994]. En effet les cellules souches contenues aux abords du follicule pileux contribuent à la reformation de l'épiderme [Heidari *et al.* 2016], tout comme les cellules du bulbe qui acquièrent un phénotype proche des kératinocytes interfolliculaires lors de la cicatrisation [Joost *et al.* 2018].

Il existe des souches de souris à densité capillaire réduite appelées "hairless". Il s'agit de souches à mutation spontanée ou volontaire pour le gène *Hr*, qui sont souvent utilisées pour les études sur la peau en raison de leur structure cutanée plus proche de l'humain (alopécie et épiderme plus épais [Jung *et al.* 2014]). La souche SKH1 est particulièrement utilisée car elle est non pigmentée et immunocompétente [Benavides *et al.* 2009]. Cependant ces souches de souris sont plus onéreuses et moins de diversité transgénique existe.

Pigmentation cutanée

Contrairement à l'humain, l'épiderme interfolliculaire de la souris est rarement pigmenté [Sundberg 1994]. Chez la souris adulte non-albinos, les follicules sont en phase télogène (phase de repos), mais suite à un traumatisme (plaie, rasage), le poil entre en phase de croissance active (anagène) et le bulbe grossit et se charge de mélanine, faisant apparaître la peau de la souris pigmentée [Sundberg *et al.* 1996].

Innervation cutanée

Il existe peu d'études comparant l'innervation cutanée entre humain et souris, néanmoins les mêmes types de récepteurs sont retrouvés [Koltzenburg *et al.* 1997, Lewin *et al.* 2004, Milenkovic *et al.* 2008]. La peau du corps de la souris étant plus velue, et les follicules étant très innervés, on peut supposer que leur peau est plus sensible au toucher. Cependant, il a été montré que les fibres innervant les follicules dans la peau velue innervent les corpuscules de Meissner dans la peau glabre [Li *et al.* 2011, Wende *et al.* 2012] et utilisent le même récepteur membranaire [Heidenreich *et al.* 2011].

Les cellules de Merkel, présentes au niveau de la couche basale de l'épiderme chez l'homme, ont également été retrouvées chez la souris. Cependant elles sont peu nombreuses dans les zones d'épiderme interfolliculaire et sont abondantes au niveau du bulbe des follicules pileux de la peau murine [Moll *et al.* 1996].

Les pattes de la souris sont glabres et donc semblables à la peau humaine. Cependant il existe des divergences selon la zone analysée car il a été récemment montré que les pattes avant de la souris sont 3 fois plus dotés de mécanorécepteurs (et également plus sensibles) que les pattes arrière, facilitant l'exploration de son environnement par l'animal [Walcher *et al.* 2018].

Système immunitaire

La structure globale du système immunitaire chez l'humain et la souris est assez similaire [Mestas *et al.* 2004]. Cependant, la peau murine contient en outre des cellules T dendritiques épidermiques (appelées DETC) non retrouvées chez l'humain [Jameson *et al.* 2007, Pasparakis *et al.* 2014].

Propriétés mécaniques

Certes la peau de la souris est plus souple que celle de l'humain [Aarabi *et al.* 2007]. Mais il existe une corrélation directe entre le poids de l'animal (humain, porc, lapin, souris), l'épaisseur des couches de peau, et les propriétés mécaniques à l'indentation. Ceci démontre que les constituants des couches de peau, physiquement similaires entre les espèces, le sont également mécaniquement [Wei *et al.* 2017].

Au cours de la vie de la souris jeune et adulte (6 à 34 semaines), les cycles pilaires et la prise de poids modifient grandement la structure et l'épaisseur de la peau. Cependant, pour une localisation donnée, le module élastique de la peau à la compression est constant [Wang *et al.* 2013].

Malgré de nombreuses différences morfo-fonctionnelles, immunitaires et génétiques, les souris ont grandement contribué à la connaissance de la cicatrisation des plaies chez l'homme, mais il est essentiel de connaître les disparités pour analyser et traduire correctement les résultats en vue de l'application chez l'humain.

IV. Diabète et cicatrisation cutanée

1. Le diabète : définition, types, causes et complications

Le diabète est une affection métabolique caractérisée par une glycémie (taux de sucre dans le sang) à jeun élevée (supérieure à 1,26 g/l) et chronique. Il existe plusieurs types de diabètes : les diabètes de type 1 et de type 2, le diabète gestationnel (qui survient pendant la grossesse et disparaît en général à l'accouchement), et des formes de diabète résultant de conditions spécifiques ou génétiques.

Cette hyperglycémie chronique est la conséquence d'une déficience de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline. L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β du pancréas et qui permet aux cellules de stocker le glucose, diminuant ainsi la concentration de glucose dans le sang circulant [Fosse-Edorh *et al.* 2018].

Le diabète de type 1

Il représente environ 10 % des cas de diabète en France et dans le monde, et depuis une vingtaine d'années le nombre de personnes atteintes de diabète de type 1 ne cesse d'augmenter. L'un des signes cliniques spécifiques aux personnes diabétiques de type 1 est l'amaigrissement progressif. Longtemps considéré comme un "diabète de l'enfant", le diabète de type 1 peut survenir à tout âge [INSERM *et al.* 2019b].

Il est causé par la destruction des cellules β du pancréas par lymphocytes T. Il s'agit donc d'une maladie auto-immune, déclenchée par l'association de gènes de prédisposition (principalement du système HLA) et de facteurs environnementaux (infections par des entérovirus) [Morran *et al.* 2015, Chiarelli *et al.* 2019].

Les symptômes apparaissent plusieurs mois, voire plusieurs années, après le début de ces événements, lorsque la plupart de ces cellules productrices d'insuline ont été détruites. Les personnes qui en sont atteintes nécessitent l'injection régulière d'insuline, on parle alors de diabète insulino-dépendant [INSERM *et al.* 2019b].

Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est le plus fréquent avec près de 90 % des cas de diabète. Il survient essentiellement chez l'adulte mais peut apparaître également dès l'adolescence, et peut évoluer sans symptôme pendant plusieurs années [INSERM *et al.* 2019a].

Le principal facteur de risque pour le développement du diabète de type 2 est lié à l'hygiène de vie : une alimentation trop grasse et trop sucrée, combinée à la sédentarité. De plus, il semble exister des profils génétiques (combinaisons de gènes) qui augmentent la susceptibilité à la maladie (par épigénétique) si l'on adopte un mode de vie inadapté [Kwak *et al.* 2016]. Également, certains médicaments (les neuroleptiques notamment) ainsi qu'une modification du microbiote intestinal peuvent participer au déclenchement d'un diabète de type 2 [Wu *et al.* 2014].

Le déséquilibre énergétique en faveur des apports versus les dépenses perturbe le métabolisme. En réponse, l'organisme stimule la sécrétion d'insuline afin de stabiliser la glycémie croissante, mais ceci provoque, à terme, une résistance cellulaire à l'insuline ne permettant plus aux tissus musculaires, adipeux et hépatique de réguler la glycémie [Groop 2000].

Le diabète de type 2 peut être traité par régime hygiéno-diététique, médicaments antidiabétiques et/ou injection d'insuline [INSERM *et al.* 2019a].

Complications

Bien qu'il ait été montré qu'un bon contrôle du niveau glycémique retardait la survenue des complications du diabète, les fluctuations journalières aiguës de la glycémie peuvent avoir des effets nocifs sur les tissus. Ainsi, les personnes atteintes de diabète de type 1 et de type 2 ont un risque significativement plus élevé de développer des complications micro- et macrovasculaires [Hirsch 2015, Evans *et al.* 2016].

L'hyperglycémie aiguë et chronique entraîne une augmentation du stress oxydatif et des réponses inflammatoires, induisant une dysfonction endothéliale, à l'origine de ces anomalies vasculaires [Domingueti *et al.* 2016, Shi *et al.* 2017] (Figure 16).

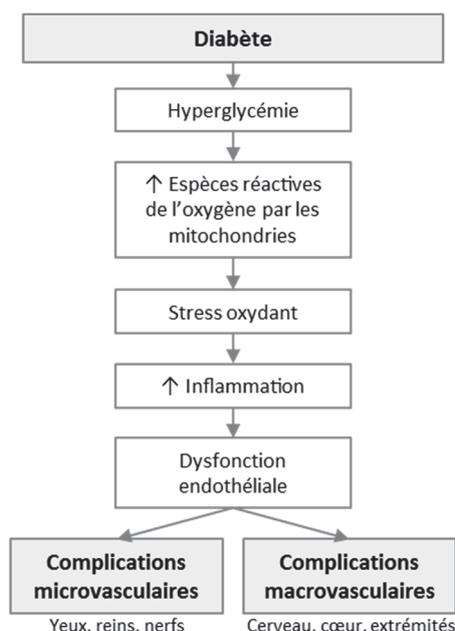


Figure 16. Lien supposé entre l'hyperglycémie et la survenue des complications vasculaires chez les diabétiques de type 1 et 2.

Adapté de [Evans *et al.* 2016, Shi *et al.* 2017].

Les complications microvasculaires incluent des lésions des yeux (rétinopathie) conduisant à la cécité, des reins (néphropathie) avec une insuffisance rénale, et des nerfs (neuropathie) avec des plaies du pied. Les complications macrovasculaires comprennent des maladies cardiovasculaires telles qu'infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux et insuffisance de la circulation sanguine dans les jambes [Huysman *et al.* 2009, Shi *et al.* 2017].

2. Etiologie de l'ulcère du pied diabétique

La peau, organe vascularisé et innervé, est exposée à de multiples agressions extérieures quotidiennes, et le diabète amoindrit ses fonctions. L'ulcère chronique du pied est ainsi la première complication retrouvée chez les diabétiques [Fosse-Edorh *et al.* 2018], causant l'amputation dans 20% des cas [Boulton *et al.* 2005].

Parmi les plaies chroniques dont fait partie l'ulcère du pied diabétique (*diabetic foot ulcer*, DFU en anglais), on peut citer l'ulcère veineux, l'ulcère de pression, l'infection du site opératoire, l'abcès, ou l'ulcère traumatique [Rahim *et al.* 2017].

Une lésion cutanée dite chronique est définie comme un défaut de barrière qui n'a pas cicatrisé après 3 mois. Le plus souvent, la phase inflammatoire est prolongée et la phase proliférative est altérée [Martin *et al.* 2015]. La distinction entre plaie aiguë et chronique a fait

l'objet d'un paragraphe dans le chapitre de livre publié [Remoué *et al.* 2020] (Annexe 1 page 183). Dans la suite de ce mémoire, seul l'ulcère du pied diabétique est détaillé.

L'ulcère apparaît très fréquemment au niveau du pied, en raison des contraintes physiques subies, en particulier la pression, déclenchant la lésion cutanée. Chez le diabétique, la combinaison de complications neurologiques, vasculaires et infectieuses vient fragiliser la peau et perturber les fonctions cellulaires, détériorant le processus de cicatrisation [Jeffcoate *et al.* 2003].

Il existe de nombreux outils pour la classification de l'ulcère du pied diabétique en clinique, la « guideline » actuelle [Monteiro-Soares *et al.* 2019] recommandant le système SYNBAD (Tableau 3).

Tableau 3. Système SINBAD pour la classification clinique de l'ulcère du pied diabétique.
Adapté de [Monteiro-Soares *et al.* 2019].

Catégorie	Définition	Score
Site	Bout du pied	0
	Milieu ou arrière du pied	1
Ischémie	Flux sanguin du pied intact : au moins un pouls palpable	0
	Evidence Clinique du flux sanguin du pied diminué	1
Neuropathie	Sensation protectrice intacte	0
	Sensation protectrice perdue	1
Infection Bactérienne	Absente	0
	Présente	1
Surface	Ulcère < 1 cm ²	0
	Ulcère ≥ 1 cm ²	1
Profondeur	Ulcère confine à la peau et au tissu adipeux	0
	Ulcère atteignant le muscle, le tendon ou plus profond	1
Score total possible		6

a. Contraintes physiques

Les pieds sont une partie du corps humain particulièrement sollicitée lors de la station debout et de la marche, supportant la pression due au poids du corps, mais aussi la pression et le frottement de la chaussure. Ainsi l'ulcère du pied diabétique est en partie une lésion de pression.

i. Définition de la lésion de pression

La lésion de pression est également appelée « escarre » en français, à ne pas confondre avec « eschar » en anglais. Cette lésion est définie par le *National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP) comme suit :

“A pressure injury is localized damage to the skin and underlying soft tissue usually over a bony prominence or related to a medical or other device. The injury can present as intact skin or an open ulcer and may be painful. The injury occurs as a result of intense and/or prolonged pressure or pressure in combination with shear. The tolerance of soft tissue for pressure and shear may also be affected by microclimate, nutrition, perfusion, comorbid conditions, and condition of the soft tissue.” [Edsberg *et al.* 2016].

On peut ainsi définir ce type de lésion comme une lésion localisée de la peau et des tissus mous sous-jacents, généralement située au niveau d'une proéminence osseuse ou liée à un dispositif médical ou autre. La lésion peut ne pas être visible en surface ou être un ulcère ouvert, et survient à la suite d'une pression intense et/ou prolongée ou d'une pression associée à un cisaillement ; le microclimat, la nutrition, la perfusion, les comorbidités et l'état des tissus mous

pouvant modifier la tolérance à la pression et au cisaillement.

Dans cette définition le terme « ulcère de pression » couramment et anciennement utilisé a été remplacé par « lésion de pression » pour mieux correspondre à l'ensemble des stades retrouvés [Edsberg *et al.* 2016].

ii. Classification des lésions de pression

La classification actuelle des lésions de pression est inspirée de celle en 4 grades (et 4 profondeurs) publiée par Shea en 1975 [Shea 1975].

Un consensus entre l'EPUAP (*European PUAP*), le NPUAP, et le PPPIA (*Pan Pacific pressure injury alliance*) a mené à une classification internationale publiée en 2014. En 2016, le NPUAP a publié une nouvelle classification approuvée par l'EPUAP et le PPPIA, mais celle de 2014 reste valide et utilisable puisque seuls quelques termes ont été modifiés [International Pressure Ulcer Guideline 2019]. Nous exposons et utilisons dans ce mémoire la version la plus récente. Elle est imagée en Figure 17 et est ainsi décrite [Edsberg *et al.* 2016] :

- Stade 1 : Peau intacte avec une zone localisée d'érythème qui ne blanchit pas au toucher.
- Stade 2 : Perte de l'épiderme avec derme exposé. Le lit de la plaie est viable, rose ou rouge, humide et peut également se présenter sous la forme d'une cloque remplie de sérum intacte ou rompue. Le tissu adipeux et les tissus plus profonds ne sont pas visibles. Ces lésions résultent généralement d'un microclimat défavorable et d'un cisaillement de la peau.
- Stade 3 : Perte de l'épiderme et du derme avec tissu adipeux visible. Peuvent être présents du tissu de granulation, une épibole (bords enroulés de la plaie), de la fibrine et/ou une zone de nécrose noire (appelées « slough » et « eschar » en anglais, respectivement). Le fascia, le muscle, le tendon, le ligament, le cartilage ou l'os ne sont pas exposés. Si la fibrine ou la nécrose noire occultent l'ampleur de la perte de tissu, il s'agit d'une lésion de pression dite « inclassable ».
- Stade 4 : Perte de peau totale avec tissu profond (fascia, muscle, tendon, ligament, cartilage ou os) exposé. Sont souvent présents fibrine et/ou nécrose noire, affaissement / tunnel / épibole. Si la fibrine ou la nécrose noire occultent l'ampleur de la perte de tissu, il s'agit d'une lésion de pression dite « inclassable ».
- Inclassable : Perte de peau totale avec perte partielle de tissu profond dans laquelle l'ampleur des lésions tissulaires ne peut pas être confirmée car elle est masquée par la fibrine ou la nécrose noire. Si la fibrine et la nécrose noire sont retirées, une lésion de pression de stade 3 ou 4 est révélée.
- Profond (« DTPI », *deep tissue pressure injury*) : Peau intacte ou non intacte qui ne blanchit pas au toucher avec une zone localisée rouge foncé / marron / violacée, ou bien un épiderme qui se soulève révélant une plaie sombre ou une cloque de sang. Cette blessure résulte d'une pression intense et / ou prolongée et de forces de cisaillement à l'interface os-muscle. La plaie peut évoluer rapidement vers une perte tissulaire importante ou peut se résoudre sans perte de tissu.

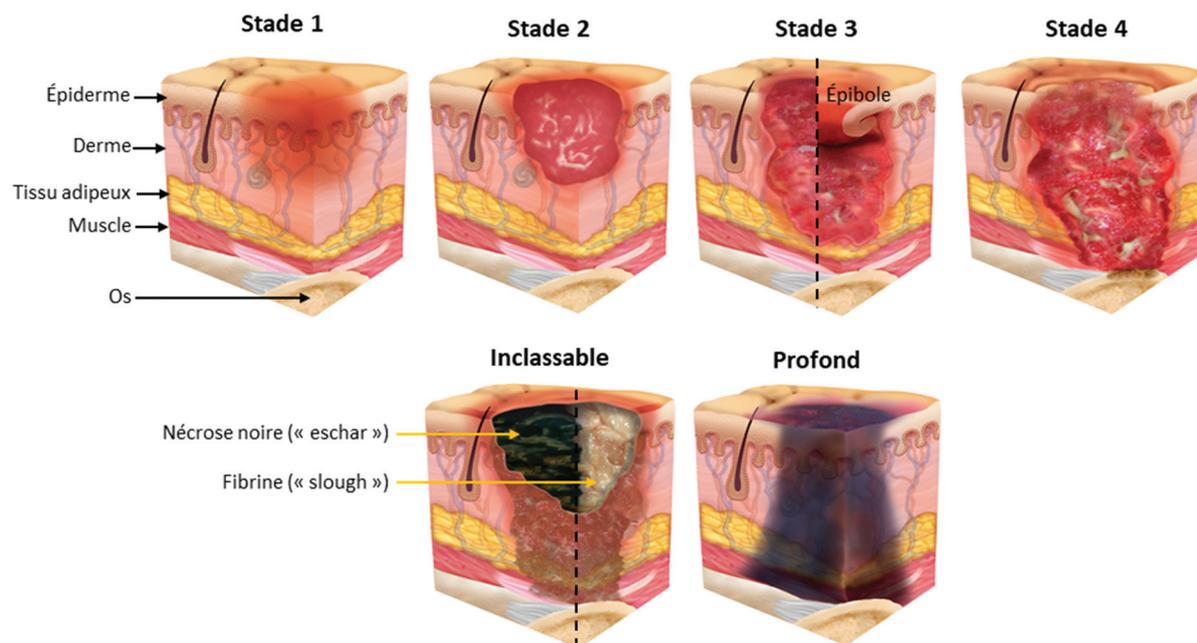


Figure 17. Classification actuelle des lésions de pression selon le NPUAP.

Adapté de [Edsberg *et al.* 2016].

Bien que depuis Shea la classification ait évolué, elle reste basée sur 4 stades. Certains cliniciens considèrent que la compréhension actuelle et future de la lésion de pression devrait faire changer radicalement ce système, pour intégrer par exemple l'origine « top-down » ou « bottom-up » de la lésion (descendante (de l'épiderme vers les tissus profonds) ou ascendante, respectivement), son étiologie, et les facteurs locaux et systémiques ; ceci dans le but de mieux traiter ce type de lésion [Levine 2019].

iii. Étiologie de la lésion de pression

Ce type de lésion est créé par la pression, mais plusieurs facteurs ont été identifiés comme favorisant son apparition. Parmi ces facteurs, les cycles répétés de pression, le cisaillement, la friction et l'humidité sont particulièrement présents au niveau du pied dans la chaussure lors de la marche. Cependant, la relation entre ces facteurs physiques et les mécanismes cellulaires à l'origine de la lésion ne sont pas complètement compris.

La pression

La compression de la peau et des tissus profonds se fait entre un élément extérieur (chaussure, caillou, chaise, lit, ...) et une proéminence osseuse. Le temps de pression nécessaire à induire une lésion est inversement lié à l'intensité de cette pression [Kosiak 1959].

Les premières expérimentations chez le chien ont montré qu'une pression supérieure à 50 mmHg à la surface de la peau provoque un arrêt du flux capillaire et une thrombose veineuse responsables d'une ischémie locale [Kosiak 1959], et une diminution importante du flux lymphatique créant un mauvais drainage [Krouskop *et al.* 1978, Miller *et al.* 1981]. Ceci affecte l'apport des nutriments et l'élimination des déchets métaboliques, à l'origine de la nécrose tissulaire. Lorsque la pression est relâchée, apparaissent en quelques heures un œdème, en 24h-48h une extravasation et une infiltration de leucocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques [Goh *et al.* 2018]) puis en quelques jours un ulcère apparent avec dégradation de la MEC et du muscle [Kosiak 1959, Kosiak 1961].

Outre l'ischémie, une pression exercée à la surface de la peau engendre également une

déformation des tissus. Or il a été montré *in vitro* que la déformation cellulaire provoque une distorsion du cytosquelette [Bouten *et al.* 2001], une perméabilité membranaire [Slomka *et al.* 2012] et une augmentation du calcium intracellulaire [Landsman *et al.* 1995], engendrant dommages voire mort cellulaire en quelques minutes [Oomens *et al.* 2015].

Récemment, il a été montré que la pression exercée à la surface de la peau chez le rat entraîne un stress du réticulum endoplasmique au niveau du muscle, favorisant l'entrée en apoptose des cellules, à l'origine d'une lésion de pression classée profonde [Cui *et al.* 2016].

Cycles d'ischémie/reperfusion

Pour une durée totale de compression équivalente, une pression exercée sur la peau en plusieurs fois consécutives engendre une surface de lésion et une extravasation de leucocytes supérieures à une pression réalisée en une seule fois (ex : 2 fois 2h versus 1 fois 4h) [Herrman *et al.* 1999, Peirce *et al.* 2000, Lachenbruch *et al.* 2015]. À la levée de la pression, le débit sanguin augmente rapidement (hyperhémie) puis retourne à la normale en 30 min en moyenne. L'hypothèse émise est que cette reperfusion sanguine importante et rapide apporterait localement des espèces réactives de l'oxygène (phénomène post-ischémie déjà observé dans d'autres tissus [Bulkley 1987]). La répétition de ce phénomène serait à l'origine de l'aggravation de la lésion lorsque des cycles pression/reperfusion sont réalisés [Peirce *et al.* 2000].

Contrainte de cisaillement et friction

Tout comme la pression, la contrainte de cisaillement, appliquée en surface de la peau et qui déplace les couches de tissu les unes par rapport aux autres, peut engendrer une déformation cellulaire. De plus, à la reperfusion ce type de force augmente l'hyperémie réactive déjà présente avec la pression seule [de Wert *et al.* 2015].

Parmi les études sur l'effet de la pression seule, la plupart reporte une atteinte du muscle avant celle de la peau (développement « bottom-up ») [Bouten 1996], et l'épiderme est rarement ou n'est qu'en partie atteint. Dans un modèle associant pression et friction rotative (résultant d'une érosion de surface mais également d'une contrainte de cisaillement [Brienza *et al.* 2015]) chez le porc, il a été montré que la friction augmentait la fréquence des lésions, sans modifier l'ischémie, mais en détériorant l'épiderme au niveau supra-basal, ce qui conduit à une destruction de la barrière cutanée [Dinsdale 1973, Dinsdale 1974].

Humidité et température

Il y a actuellement peu d'études qui démontrent comment le « microclimat » cutané peut affecter la peau et favoriser la survenue de lésions de pression. Cependant, la couche cornée est la première couche de peau qui peut être affectée par le changement de microclimat [Kottner *et al.* 2018].

Ainsi, une humidité ambiante augmentée entraîne une diminution de la rigidité et de l'élasticité de la couche cornée [Paparizos *et al.* 1975, Takahashi *et al.* 1984], et une baisse de sa résistance au cisaillement [Geerligts *et al.* 2011]. Une humidité importante dégrade la structure des lamelles lipidiques extracellulaires de la couche cornée conduisant à une détérioration de la barrière cutanée [Warner *et al.* 2003].

En cas d'humidité ambiante faible, la couche cornée est plus sèche et la rigidité de l'épiderme augmente, diminuant sa capacité de déformation, résultant de fissures et de crevasses [Engelbrechtsen *et al.* 2016] et augmentant les contraintes mécaniques perçues par les couches tissulaires sous-jacentes et le risque de lésions [Atlas *et al.* 2009].

La température extérieure influe sur la température de la peau [Igaki *et al.* 2014], et l'augmentation de la température cutanée semble diminuer l'adhérence dermo-épidermique et la résistance au cisaillement de l'épiderme [Hatje *et al.* 2015]. Cette chaleur cutanée favorise le développement d'ulcère de pression chez l'animal [Kokate *et al.* 1995].

b. Atteinte vasculaire

Le risque de développer une lésion de pression existe chez tout individu, mais le patient diabétique présente des complications, notamment une atteinte vasculaire, qui augmentent ce risque.

L'hyperglycémie cause une atteinte cutanée microvasculaire dès le stade de pré-diabète (glycémie à jeun entre 1,10 et 1,26g/L), avec une capacité à la vasodilatation diminuée [Caballero *et al.* 1999]. Le diabète, avec ou sans atteinte macrovasculaire, induit une diminution de la circulation sanguine dans les capillaires de la peau [Jörneskog *et al.* 1995b, Jörneskog *et al.* 1995a], affectant l'apport en oxygène de la peau [Greenman *et al.* 2005]

Le diabète engendre également une atteinte macrovasculaire de type athérosclérose, à l'origine de la pathologie artérielle périphérique dont la prévalence et la sévérité augmentent avec la durée du diabète [Jude *et al.* 2001]. Les symptômes de cette pathologie sont accentués chez le patient diabétique, avec une insuffisance artérielle, en particulier au niveau des artères infra-poplitées (niveau jambes et pieds), prédisposant au retard de cicatrisation des membres inférieurs et à l'amputation [Beckman *et al.* 2016].

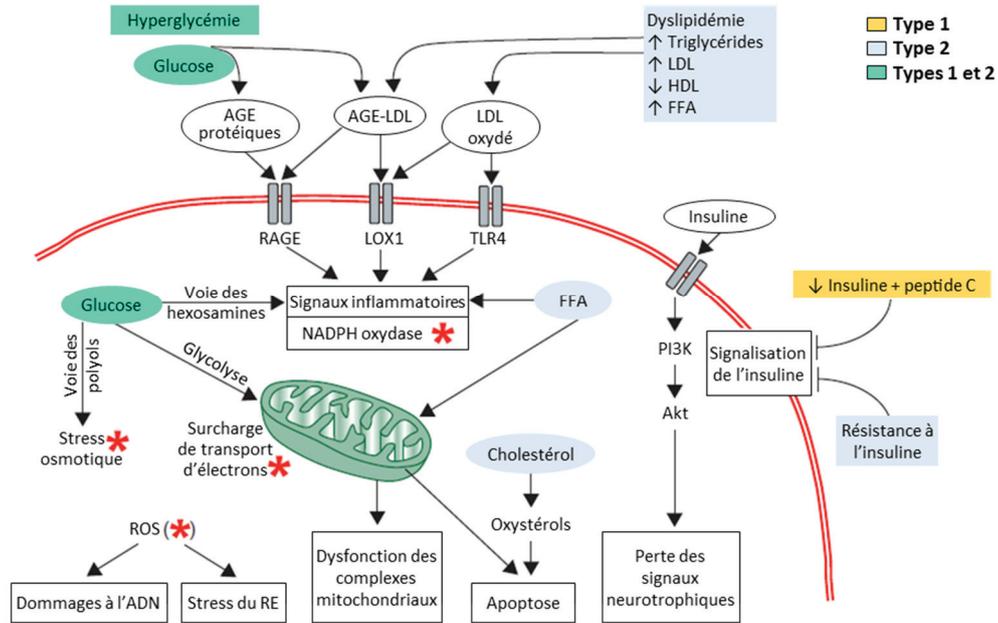
L'atteinte micro- et macrovasculaire chez le sujet diabétique induit ainsi une ischémie des membres inférieurs et de la peau, favorisant la survenue de l'ulcère de pression chronique au niveau du pied, et amoindrissant ses capacités de cicatrisation.

c. Neuropathie périphérique

La neuropathie diabétique est la complication chronique la plus répandue avec le diabète, touchant 50% des patients [Dyck *et al.* 1993]. Différentes parties du système nerveux peuvent être affectées (central/périphérique, autonome/sensitif), mais la neuropathie la plus fréquente est la polyneuropathie distale symétrique, qui affecte progressivement la fonction des fibres nerveuses au niveau des extrémités (mains, jambes, pieds) [Pop-Busui *et al.* 2017].

La genèse de cette neuropathie périphérique est multifactorielle : le diabète engendre un stress oxydatif et inflammatoire accompagné d'un dysfonctionnement métabolique (Figure 18). Ceci conduit à une atteinte microvasculaire (diminuant le flux sanguin dans les capillaires des nerfs) concomitante à celle des cellules nerveuses et gliales, dégradant les fibres nerveuses et altérant leur fonctionnement [Callaghan *et al.* 2012].

A Mécanismes à l'origine des dommages cellulaires



B Dommages cellulaires → Dysfonction nerveuse

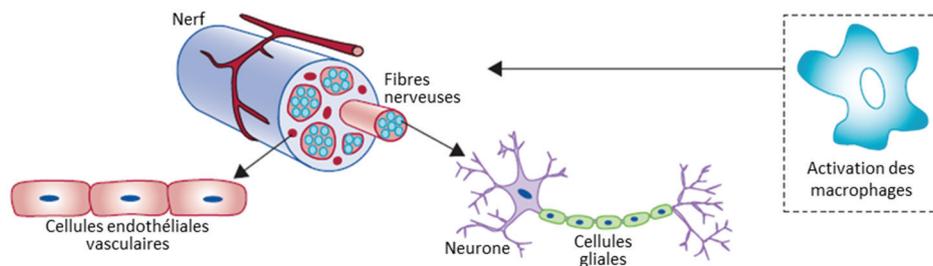


Figure 18. Mécanismes de la neuropathie diabétique

A/ Les facteurs liés au diabète de type 1 (orange), de type 2 (bleu) et aux deux types (vert) causent des dommages à l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique (RE), une dysfonction mitochondriale, l'apoptose et une perte des signaux neurotrophiques. B/ Ces dommages cellulaires peuvent se produire dans les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales vasculaires et déclencher l'activation des macrophages, tout ceci aboutissant à la dysfonction des nerfs et à la neuropathie. AGE, produits de glycation avancée ; LDL, *low-density lipoprotein* ; HDL, *high-density lipoprotein* ; FFA, acides gras libres ; ROS, espèces réactives de l'oxygène (étoile rouge) ; RE, réticulum endoplasmique ; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase ; LOX1, *lectin-like oxidized LDL receptor 1* ; RAGE, récepteur des AGE ; TLR4, *toll-like receptor 4*. Adapté de [Callaghan *et al.* 2012].

La présence d'une neuropathie associée au diabète peut être évaluée par l'analyse histologique de la peau montrant une diminution de la densité des fibres nerveuses, par la diminution ou l'augmentation de la sensibilité cutanée à la chaleur et/ou au toucher, et par la baisse de la vitesse de conduction nerveuse qui est un marqueur de démyélinisation des grosses fibres nerveuses et donc d'une neuropathie sévère [Biessels *et al.* 2014].

Perte de sensibilité cutanée

La neuropathie atteint en premier les fibres nerveuses non-myélinisées puis celles de plus gros calibre myélinisées, c'est pourquoi la peau, riche en fibres C, est rapidement touchée par la neuropathie [Herrmann *et al.* 2004]. On constate ainsi, avec le diabète de type 1 et de type 2, une diminution de la densité nerveuse intra-épidermique et intradermique [Peltier *et al.* 2013], à l'origine d'une perte de sensibilité [Wood *et al.* 2005], retardant la prise de conscience d'un inconfort du pied, voire d'une lésion débutante, et de la prise en charge médicale [Macfarlane *et al.* 1997].

Certains patients diabétiques neuropathiques (20 à 30% [Juster-Switlyk *et al.* 2016]) présentent cependant une douleur chronique dont la cause n'est pas complètement connue [Lee-Kubli *et al.* 2014], bien que la suractivation et/ou surexpression de TRPV1 semble être impliquée dans l'allodynie chez le rongeur [Danigo *et al.* 2013, Cui *et al.* 2014].

Pression plantaire augmentée

La neuropathie diabétique cause également une déformation du pied, dont l'étiologie est discutée [Allan *et al.* 2016], qui augmente la pression des points d'appui elle-même corrélée au risque d'ulcération [Caselli *et al.* 2002, Lott *et al.* 2008].

Sécheresse cutanée

La baisse de la fonction du système sympathique due à la neuropathie périphérique affecte la sécrétion de sueur [Sheshah *et al.* 2016], participant à la sécheresse cutanée et favorisant le frottement au niveau du pied [Macfarlane *et al.* 1997, Nikoleishvili *et al.* 2006].

Défaut de vasodilatation à la pression

Les faibles pressions exercées sur la peau peuvent créer une ischémie partielle des tissus, mais il existe une vasodilatation réflexe appelé « PIV » (*pressure-induced vasodilation*). Ce phénomène neuro-vasculaire disparaît avec la neuropathie diabétique, favorisant la survenue de lésions de pression [Fouchard *et al.* 2019, Zwanenburg *et al.* 2019].

La neuropathie périphérique est ainsi le facteur de risque principal de l'ulcère du pied chez le diabétique [Boulton 2013], car elle modifie la perfusion sanguine et les forces mécaniques à la surface du pied et elle réduit la perception de ces forces et de la douleur, ce qui favorise la survenue d'une lésion de pression. Le manque de sensation retarde le soin de la lésion et favorise l'infection. La neuropathie altère également certains marqueurs biologiques impliqués dans la cicatrisation, détaillés par la suite.

d. Risque infectieux

Bien que toutes les plaies chroniques soient colonisées par des bactéries [Edwards *et al.* 2004] qui forment un biofilm, l'infection n'est pas la cause de la chronicité mais elle entrave davantage la résolution de la cicatrisation [Rahim *et al.* 2017] et prédispose à l'amputation chez le diabétique [Edmonds 2013]. En effet les bactéries produisent des protéases qui détruisent les tissus et favorisent leur colonisation [Lindsay *et al.* 2017].

3. Marqueurs biologiques cutanés et défaut de cicatrisation

En plus des facteurs cités précédemment, les études chez l'humain ou l'animal ont permis d'identifier de nombreuses fonctions cellulaires et moléculaires altérées par le diabète pouvant perturber la bonne évolution de la cicatrisation. Les biopsies de peau de patients diabétiques neuropathiques sont très peu disponibles (varie selon les pays) en raison de leur difficulté à cicatrifier, seuls peuvent être obtenus des prélèvements de lésions chroniques pendant le débridement ou avant l'amputation. Afin d'étudier les défauts de cicatrisation en présence de diabète et de neuropathie, la souris est l'un des modèles animaux les plus utilisés.

a. Modèles murins pour l'étude du développement et de la cicatrisation de l'ulcère du pied diabétique

Modèles de neuropathie diabétique

Il existe des modèles murins de diabète de type 1 et de type 2. Le type 1 peut être reproduit chimiquement par des analogues du glucose (streptozotocine (STZ), alloxane) induisant la destruction rapide des cellules β du pancréas ; ou bien génétiquement favorisant l'auto-immunité contre le pancréas ou le mauvais repliement de la pro-insuline.

Les modèles de souris de diabète de type 2 peuvent être induits génétiquement en modifiant la satiété (déficiency du gène de la leptine (souris db/db) ou mutation de son récepteur (souris ob/ob)) ou en retirant le récepteur à l'insuline. Le diabète de type 2 peut également être induit à moyen terme chez la souris par un régime hypercalorique.

Bien que la majorité des patients soient atteints de diabète de type 2, la plupart des études animales sont réalisées sur la souris diabétique neuropathique de type 1 STZ, principalement pour des raisons de coût et de rapidité d'induction. En effet, les modèles murins de diabète de type 1 et de type 2 développent des manifestations similaires de la neuropathie diabétique, telles qu'un ralentissement de la conduction de grosses fibres nerveuses, une perte progressive de la sensation thermique et une déplétion des fibres nerveuses épidermiques ; les principales différences observées étant le temps d'induction et la sévérité d'atteinte nerveuse [Jolivald *et al.* 2016].

Modèles de lésion cutanée

Il existe plusieurs modèles de plaie cutanée, reproduisant plus ou moins la plaie du pied diabétique, dont les principaux sont représentés en Figure 19. Chez la souris les lésions sont réalisées quasi-exclusivement au niveau du dos.

La plaie d'excision (Figure 19 A) correspond au retrait d'un disque de peau totale par coupure nette. C'est le modèle de lésion le plus répandu pour étudier la cicatrisation en général [Grada *et al.* 2018], mais reste éloigné de la réalité de la plaie du pied diabétique, car il ne reproduit ni l'ischémie ni la pression. Néanmoins il est possible avec cette technique d'ajouter un anneau rigide limitant la contraction due au muscle *Panniculus carnosus*.

La plaie d'ischémie (Figure 19 B) par découpe d'un lambeau de peau sur 3 côtés est utile pour étudier la contribution vasculaire dans la cicatrisation. La nécrose se développe du côté opposé aux vaisseaux nourriciers.

La plaie de pression (Figure 19 C) réalisée à l'aide d'aimants apposés de part et d'autre d'un pli de peau est une technique non invasive développée par Stadler et coll. [Stadler *et al.* 2004]. C'est un modèle adaptable car il est possible de modifier la taille des aimants, leur force, le temps de compression, le nombre de cycles de pression/reperfusion. La lésion apparaît progressivement et plus ou moins vite et profondément en fonction de ces paramètres. C'est actuellement le modèle le plus simple à mettre en œuvre pour être le plus proche de l'ulcère du pied diabétique. Cependant encore trop peu d'études sont réalisées à l'aide de ce modèle de lésion.

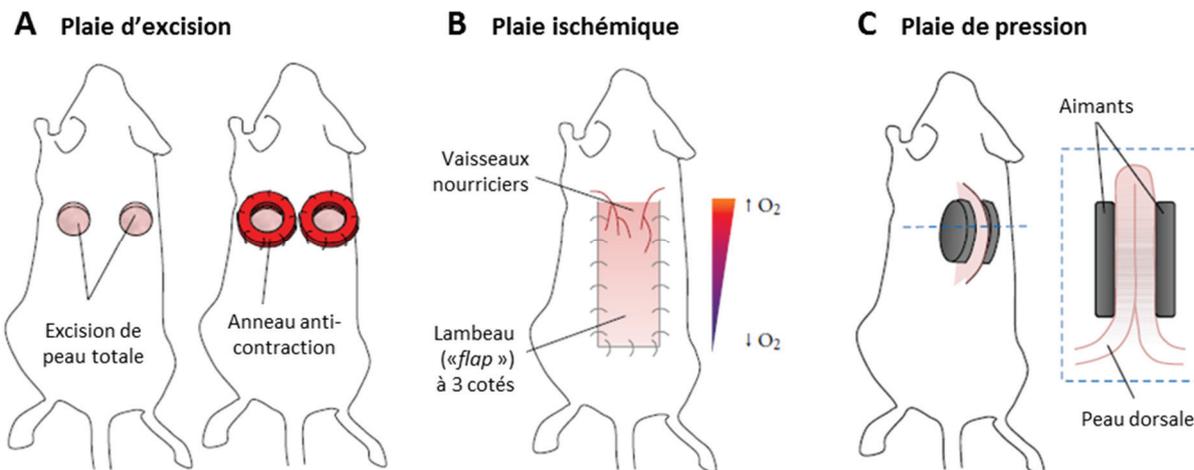


Figure 19. Modèles de lésions utilisés chez la souris pour l'étude de la cicatrisation des plaies diabétiques. A/ Plaie d'excision de peau totale, avec ou sans anneau autour de la zone excisée afin de limiter la contraction due au muscle *Panniculus carnosus*. B/ Plaie d'ischémie par découpe d'un lambeau de peau sur 3 côtés. C/ Plaie de pression réalisée à l'aide d'aimants apposés de chaque côté d'un pli de peau. Adapté de [Wong *et al.* 2011].

b. Marqueurs biologiques altérés avec le diabète et la neuropathie

Avec le diabète, les plaies cutanées cicatrisent plus lentement, voire ne cicatrisent pas, avec un processus de réparation qui peut stagner à différentes phases de la cicatrisation (Figure 20). Plusieurs marqueurs biologiques ont été identifiés comme altérés par le diabète et/ou la neuropathie associée, dont les principaux sont décrits dans cette partie.

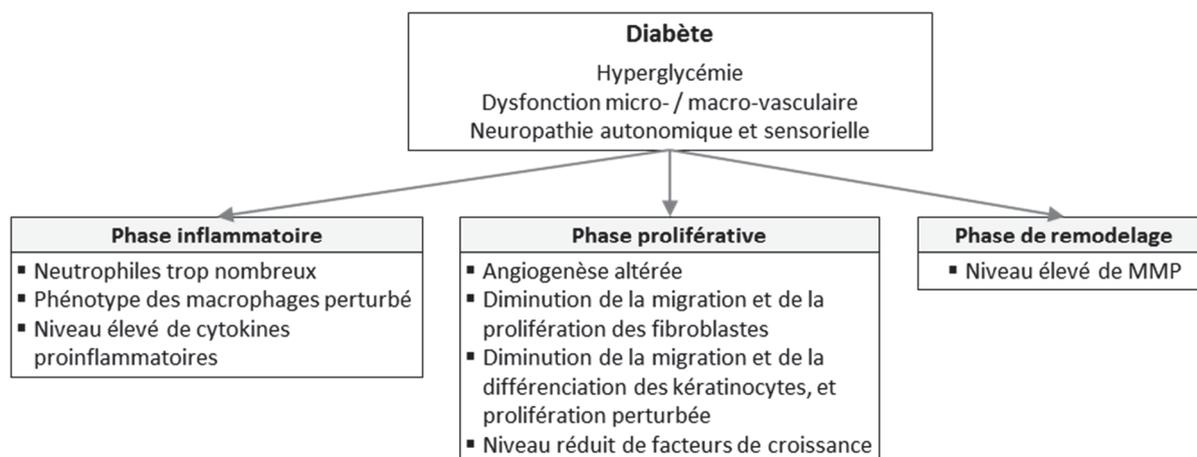


Figure 20. Phases et processus de cicatrisation altérés par le diabète pouvant conduire à la chronicité des lésions.

Adapté de [Baltzis *et al.* 2014].

Inflammation prolongée

Le diabète se caractérise premièrement par un état inflammatoire chronique de bas grade, avec une présence accrue de cellules immunitaires dans le derme et autour des vaisseaux [Tellechea *et al.* 2013]. Suite à une blessure cutanée, la phase inflammatoire est exacerbée, et est d'autant plus stimulée par une éventuelle infection bactérienne. Les neutrophiles sont très présents et actifs, caractérisés par une augmentation du phénomène de NETose, qui favorise la dégradation des tissus [Wong *et al.* 2015, Fadini *et al.* 2016]. L'expression précoce du chémoattractant MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, aussi appelé CCL2, *chemokine ligand 2*) est diminuée, retardant l'infiltration des macrophages dans la plaie [Wood *et al.* 2014]. De plus, l'efférocytose est réduite par le diabète [Khanna *et al.* 2010], limitant le changement

de phénotype des macrophages de pro- vers anti-inflammatoire [Bannon *et al.* 2013], ce qui conduit à la non-résolution de la phase inflammatoire et à la chronicité de la lésion [Zhao *et al.* 2016].

Cette phase inflammatoire prolongée se caractérise par un niveau élevé de cytokines proinflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- α [Dinh *et al.* 2012]. L'hyperglycémie chronique entraîne la formation de produits finis de glycation avancée (AGE), qui semblent favoriser cette hyperproduction de TNF- α par les macrophages [Dong *et al.* 2016], qui à son tour perturbe la réépithélialisation en induisant une résistance à l'insuline des kératinocytes [Goren *et al.* 2006]. De plus, les kératinocytes, sous l'effet du stress oxydatif augmenté par l'hyperglycémie, sécrètent d'avantage d'IL-8, qui favorise l'attraction des neutrophiles [Lan *et al.* 2013].

Réépithélialisation diminuée

Le diabète, par la résistance ou l'insuffisance en insuline, provoque une diminution globale de la signalisation de l'insuline (via les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1) [Emanuelli *et al.* 2016], qui peut induire une baisse de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire [Wertheimer *et al.* 2001, Mainzer *et al.* 2018]. De plus, l'hyperglycémie perturbe directement la migration [Lan *et al.* 2008] et la prolifération des kératinocytes, et participe à la diminution de l'activation d'IGF-1R [Spravchikov *et al.* 2001].

Ainsi, la réépithélialisation est diminuée voire abolie par le diabète. L'épiderme des lésions chroniques chez le diabétique présente une différenciation altérée [Brem *et al.* 2007a] ; et une capacité de migration diminuée [Galkowska *et al.* 2003], notamment par l'augmentation de la voie β -caténine/c-myc [Stojadinovic *et al.* 2005] et de la voie Dll4/Notch-1 [Zheng *et al.* 2019]. Chez le patient diabétique ou non diabétique, les berges épidermiques des lésions chroniques semblent cependant caractérisées par un phénotype hyperprolifératif [Usui *et al.* 2008].

Facteurs de croissance diminués

Le diabète entraîne également une augmentation limitée des facteurs de croissance pendant la cicatrisation, notamment le PDGF, le VEGF, l'EGF et l'IGF-1 à la fois au niveau de l'épiderme et des cellules endothéliales dermiques dans les berges des lésions chroniques du pied diabétique [Galkowska *et al.* 2006], ce qui participe à l'altération de la phase proliférative.

Formation du tissu de granulation altérée

La formation du tissu de granulation est également affectée par le diabète. Les fibroblastes présentent une prolifération diminuée, une apoptose accrue et une capacité de migration réduite [Brem *et al.* 2007b, Desta *et al.* 2010].

La dysfonction endothéliale et l'insuffisance de VEGF contribuent à la diminution de l'angiogenèse avec le diabète [Okonkwo *et al.* 2017], en particulier par une diminution du recrutement des progéniteurs de cellules endothéliales [Galiano *et al.* 2004, Drela *et al.* 2012]. La prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales sont également diminuées avec le diabète [Bitar 2019].

L'ulcère chronique du diabétique démontre aussi une perturbation de l'équilibre entre MMP et TIMP, avec des taux élevés de MMP-1, 2, 8 et 9 tandis que le taux de TIMP-2 est diminué dans l'exsudat de plaie [Lobmann *et al.* 2002]. Ce déséquilibre favorise la dégradation des composants matriciels, des facteurs de croissance et des cytokines, perturbant le processus de réparation cutanée [Ayuk *et al.* 2016].

Neuromédiateurs diminués

Certaines études *in vivo* (animal ou homme) ne recherchent pas nécessairement la présence d'une neuropathie périphérique associée, il peut être ainsi difficile de connaître la part respective de l'effet de l'hyperglycémie (de sa durée et de ses conséquences) et d'une éventuelle neuropathie dans les observations présentées ci-dessus.

Cependant, il a été montré que la dénervation totale de la peau entraînait un défaut de cicatrisation [Buckley *et al.* 2012], démontrant l'importance des neuromédiateurs produits par les fibres nerveuses. Par contre, il semble que la présence de seulement 30% de fibres C dans la peau suffit pour cicatriser normalement (sans pathologie additionnelle) [Wallengren *et al.* 1999].

Le NGF est diminué dans le sérum des patients diabétiques neuropathiques et son taux est corrélé à la diminution de la vitesse de conduction nerveuse et donc à la sévérité de la neuropathie [Faradji *et al.* 1990]. Les kératinocytes des patients diabétiques sécrètent moins de NGF, ce qui pourrait participer à la dégradation des petites fibres nerveuses cutanées [Anand *et al.* 1996]. À l'inverse l'expression de TrkA est augmentée dans les kératinocytes des patients diabétiques neuropathiques [Terenghi *et al.* 1997]. Également, la concentration plasmatique du récepteur p75NTR (mais pas de TrkA) est augmentée et pourrait servir de marqueur précoce de la neuropathie [Chilton *et al.* 2004].

La présence d'une neuropathie périphérique est également associée à une diminution importante du taux de substance P dans le sérum [Kunt *et al.* 2000] et des fibres nerveuses SP-positives et CGRP-positives dans la peau [Lindberger *et al.* 1989], comparativement aux patients diabétiques non neuropathiques. Ceci peut être en partie expliqué par l'augmentation de l'activité enzymatique de la NEP dans la peau avec le diabète et qui semble être corrélée au risque de lésion chronique [Antezana *et al.* 2002, Spenny *et al.* 2002].

Il a été démontré que l'administration exogène de SP [Gibran *et al.* 2002] ou de NGF [Matsuda *et al.* 1998] corrigeait le retard de cicatrisation chez la souris diabétique. Mais aucune étude de ce type, à notre connaissance, n'a démontré l'effet positif de l'administration de CGRP pour la cicatrisation avec la neuropathie diabétique.

OBJECTIFS du TRAVAIL de THÈSE

Le « pied diabétique » est une lésion induite par la pression qui cicatrise très mal et pour laquelle il n'existe pas de traitement actuellement efficace, notamment par le manque de connaissance de l'étiologie et des processus de cicatrisation de ce type de lésion. Par ailleurs, il est établi que chez le patient diabétique, la neuropathie est le facteur de risque principal dans le développement de cette lésion. Cependant, la neuropathie est généralement diagnostiquée à un stade sévère, ainsi la relation entre le degré de neuropathie et le risque d'ulcération et de cicatrisation altérée n'est pas connue.

Afin de mieux comprendre ce type de lésion, dans le but futur d'un développement préventif et/ou thérapeutique, nous avons étudié l'impact de la neuropathie sur la peau et la cicatrisation de l'ulcère de pression chez les souris diabétiques, en comparaison de souris non diabétiques aux mêmes âges. Ce travail s'est ainsi articulé autour de deux questions majeures pour lesquelles des méthodologies ont été mises en place :

- **Le degré d'atteinte neuropathique a-t-il une influence sur la fragilité cutanée et la gravité de l'ulcère de pression ?**

Pour répondre à cette interrogation, un diabète de type 1 a été induit chez la souris et nous avons établi les durées de diabète nécessaires à l'obtention de deux degrés de sévérité de la neuropathie. Ensuite, la structure et les caractéristiques physiques de la peau non lésée des animaux diabétiques neuropathiques ont été analysées. Enfin, nous avons mis au point un protocole original d'induction de lésion combinant pression et friction qui a permis d'évaluer la fragilité cutanée à ces contraintes selon le degré de neuropathie diabétique.

- **Comment le diabète et l'aggravation de la neuropathie altèrent la cicatrisation de l'ulcère de pression et quels sont les marqueurs biologiques modifiés pouvant y contribuer ?**

Afin de comparer la durée de fermeture de la lésion selon le degré de neuropathie diabétique, un nouvel outil a été développé permettant l'évaluation macroscopique de la lésion. Par la suite, l'analyse histologique a permis d'étudier les processus de cicatrisation perturbés par la neuropathie diabétique et sa sévérité. Enfin, l'expression du CGRP, de la substance P, du NGF, de leurs récepteurs, et de la périostine a été analysée à différents temps de la cicatrisation afin de déterminer leur éventuelle implication dans le retard de fermeture de la lésion de pression avec la neuropathie diabétique.

En parallèle de l'étude *in vivo*, un modèle *ex vivo*, qui pourrait permettre le criblage futur d'actifs pour la cicatrisation en limitant le nombre d'animaux, a été initié.

MATÉRIELS et MÉTHODES

La partie « matériels et méthodes » présentée ici est rédigée sous forme de protocoles détaillés afin de faciliter la compréhension des expérimentations et la reproduction des méthodes par les futurs étudiants et membres de l'équipe d'accueil ou des Laboratoires Urgo.

I. Techniques in vivo sur animal

1. Animaux

Les expérimentations ont été réalisées sur souris C57BL6/JRj mâles (Janvier Labs). Dès leur arrivée, les souris sont réparties de façon aléatoire dans des cages à raison de 6 animaux/cage avec un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture dans une animalerie respectant un cycle jour/nuit de 12h/12h. Une période de stabulation d'une semaine est observée avant toute expérimentation. Les animaux étaient âgés de 8 semaines au début des expérimentations.

Un soin particulier a été apporté aux souris diabétiques de type 1 (nids de coton, température de couveuse, croquettes mouillées) afin d'améliorer leur prise alimentaire (réduisant la perte de poids) et limiter leur hypothermie [Fang *et al.* 2005].

Les expérimentations sur souris ont été réalisées conformément à la réglementation en vigueur sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques. Préalablement, un dossier de demande d'autorisation à l'expérimentation animale décrivant les procédures a été soumis et approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale de Lyon (numéro d'enregistrement CECCAPP_IBCP_2015_001) puis par le Ministère de la Recherche – Service Autorisation de projet (accusé réception le 19 juin 2015).

2. Induction du diabète de type 1

a. Mesure de la glycémie

La mesure de la glycémie a été utilisée pour déterminer le statut diabétique ou non de l'animal, à l'aide du lecteur et des bandelettes à usage unique BGStar® (Sanofi). Cet appareil, conçu pour l'humain, ne permet pas de déterminer la glycémie supérieure à 600 mg/dL. Les concentrations indiquées dans ce mémoire correspondent à une glycémie non-à jeun.

Protocole :

- Sur animal vigile, réaliser une petite entaille sur l'extrémité de la queue à 0,5cm de l'extrémité à l'aide d'un scalpel stérile
- Éliminer la première goutte de sang
- La deuxième goutte (~2µl) peut être utilisée pour la mesure de glycémie
- Isoler l'animal dans une cage temporaire jusqu'à ce que le saignement s'arrête (limite l'agressivité des congénères)
- Remettre l'animal dans sa cage initiale

b. Injection de streptozotocine

L'induction de diabète a été réalisée par l'injection intrapéritonéale de streptozotocine (STZ). La STZ est un analogue du glucose qui pénètre préférentiellement les cellules β du pancréas via sa liaison au récepteur GLUT2. Sa cytotoxicité induit une mort cellulaire responsable de la diminution de la sécrétion d'insuline et de l'hyperglycémie résultante [Lewin *et al.* 2014]. Afin de limiter la toxicité de la STZ pour les autres cellules de l'organisme, il est

nécessaire que l'animal soit à jeun avant l'injection.

Protocole :

- Mesurer de la glycémie le matin et pesée de l'animal (pour le calcul du volume de STZ à injecter)
- Mettre à jeun (retrait des croquettes, l'eau reste à disposition)
- Après 6h de jeun, réaliser une injection intrapéritonéale de STZ à 180mg/kg (injection d'un volume équivalent de tampon citrate pour les groupes contrôles)
- Préparation extemporanée de la solution de STZ pour 1ml à 30mg STZ/ml :
 - Peser 39 mg de poudre Zanosar® (Keocyt) dans un tube protégé de la lumière
 - Ajouter 303µl d'eau pour préparations injectables
 - Vortexer jusqu'à dissolution complète (la solution doit être jaune clair)
 - Ajouter 697µl de tampon citrate 0,09 M pH 4,8 (Sigma C2488)
 - Injecter en intrapéritonéal dans l'heure.
- Remettre la souris en cage avec croquettes
- Contrôler de la glycémie 48h après l'injection. Les souris ayant reçu la STZ et ayant une glycémie ≥ 400 mg/dl sont incluses dans le groupe diabétique.
- Contrôler la glycémie (de tous les groupes) après 7 jours, puis 4 et 8 semaines post-injection (4wk et 8wk).

Dans la suite du mémoire, la caractérisation des souris contrôles et diabétiques sans lésion et l'induction d'ulcères de pression ont été réalisées à 4 et 8 semaines post-injection. Les groupes de souris ont donc été nommés C4wk, D4wk, C8wk et D8wk.

Remarque :

Pour les premières expérimentations, le diabète a été induit chez la souris avec la STZ de chez Sigma (ref S0130). Cependant la qualité des lots commercialisés s'est peu à peu dégradée (teneur en anomère alpha (anomère actif) diminuée) et a engendré une faible proportion d'animaux hyperglycémiques (jusqu'à 0 sur 30 souris ayant reçu l'injection) et une forte mortalité (environ 50% après 3 semaines). C'est pourquoi le médicament à usage humain Zanosar® a été utilisé par la suite (meilleure induction (102 souris hyperglycémiques à 48h sur 115 injectées) et plus faible perte de poids/mortalité). Les résultats de ce mémoire ont tous été obtenus à partir d'animaux induit au Zanosar®.

3. Evaluation de la neuropathie périphérique

Afin de déterminer si les souris diabétiques ont une neuropathie périphérique, il est nécessaire d'utiliser trois méthodes différentes [Biessels *et al.* 2014] : une mesure comportementale (ici le test « Tail Flick »), une mesure électrophysiologique (ici sur la MNCV sur nerf sciatique) et une mesure histologique des fibres nerveuses (ici la densité IENF). L'animal diabétique est considéré neuropathique lorsque les résultats à 2 méthodes sur 3 sont statistiquement différents entre groupes contrôle et diabétique.

a. Test « Tail Flick »

Le test « tail flick » (signifie « coup de queue »), réalisé sur animal vigile contentionné, permet de mesurer la sensibilité thermique nociceptive à la surface de la queue de l'animal,

traduite par la latence et/ou le seuil de température auquel l'animal retire la queue du dispositif. L'appareil utilisé (IITC Life Science, modèle 33) comprend une lampe halogène et un détecteur (Figure 21). La puissance et donc la température de la lampe augmente progressivement, ce qui active les nocicepteurs thermiques des petites fibres nerveuses cutanées (fibres A δ et C) et engendre un retrait réflexe de la queue par l'animal. La lampe s'éteint seule au terme d'un « cut off » défini afin d'éviter la brûlure.

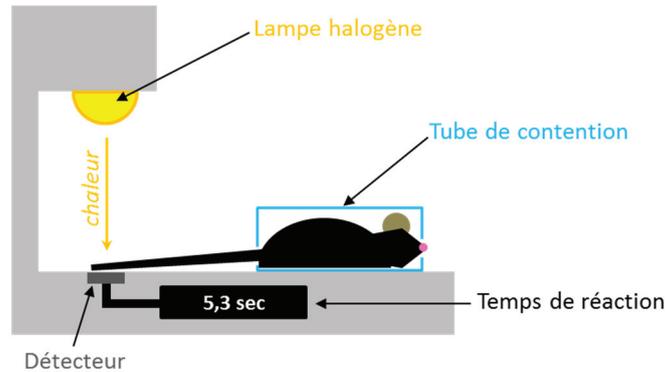


Figure 21. Schéma de l'installation utilisée pour déterminer la sensibilité thermique nociceptive cutanée

Dans un premier temps la mesure a été réalisée toutes les semaines pour déterminer à partir de quelle durée de diabète la réponse est modifiée, indiquant une atteinte des petites fibres nerveuses. Par la suite, les mesures ont été réalisées uniquement à 4 et 8 semaines de protocole, sur 10 souris par groupes.

Protocole :

- Allumer l'appareil et régler la puissance de base de la lampe à 1%, correspondant à 32°C. La lampe commence ainsi à chauffer.
- Régler la puissance de test de la lampe à 15% et le cut off à 10 sec, correspondant à une température de fin à 60°C environ.
- Placer la souris dans un tube de contention, queue à l'extérieur. Attendre 15 min d'acclimatation
- Placer la queue de l'animal sous la lampe (à 1 cm de l'extrémité) et attendre 30sec (permet d'avoir la même température cutanée initiale pour tous les animaux)
- Réaliser 5 mesures successives espacées de 5min, et ce pour chaque souris
- Replacer l'animal en cage

b. Mesure de la MNCV

La vitesse de conduction d'un nerf moteur (MNCV, *motor nerve conduction velocity*), réalisée sur animal sous anesthésie générale, permet d'évaluer le taux de myéline sur le tronçon nerveux considéré. La méthode consiste à stimuler électriquement un nerf et d'analyser la durée nécessaire à la contraction musculaire en aval du nerf. Les mesures répétées à deux niveaux différents du nerf permettent le calcul de la vitesse selon la formule suivante :

$$\text{Vitesse} = \frac{\Delta d}{\Delta t} = \frac{\text{distance entre les deux points de stimulation}}{(\text{Latence 1} - \text{Latence 2})}$$

Dans cette étude, nous avons mesuré la MNCV au niveau du nerf sciatique entre le fessier et le talon des souris (Figure 22).

La vitesse nerveuse dépend également de la température, il est donc nécessaire d'avoir une

température constante lors de la mesure. La peau du dos doit être incisée et les muscles écartés pour permettre la stimulation du nerf sciatique au niveau fessier, l'animal est donc mis à mort après la procédure.

Les matériels (électrodes, générateur de voltage, câblages, boîtier d'acquisition) et logiciel (déclenchement de la stimulation et acquisition des données) utilisés proviennent de chez Biopac Systems.

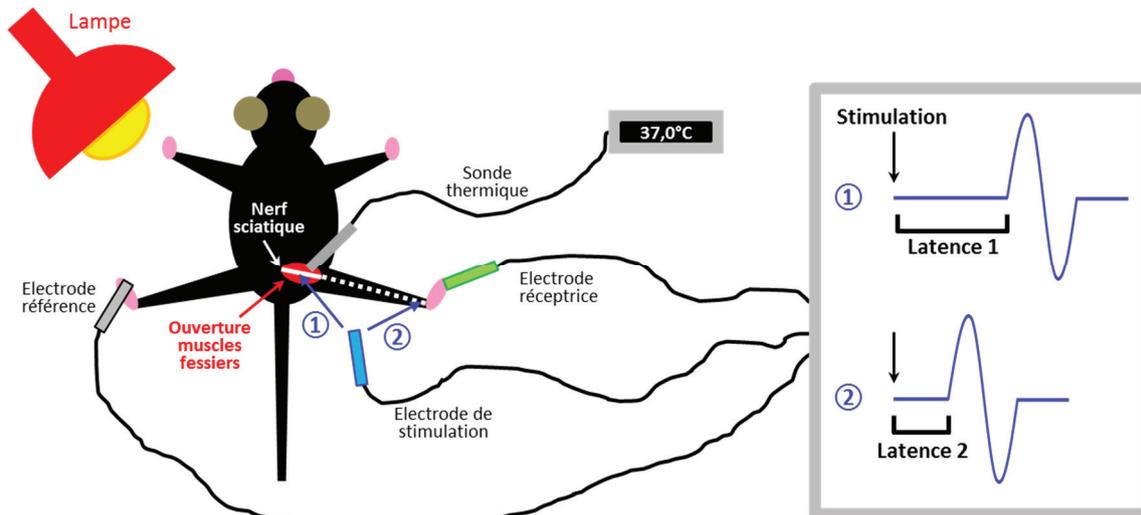


Figure 22. Schéma de l'installation pour la mesure de la vitesse de conduction nerveuse du nerf sciatique

Dans un premier temps la mesure a été réalisée à partir de la 4^e semaine de protocole puis toutes les semaines pour déterminer à partir de quelle durée de diabète la réponse est modifiée, indiquant une atteinte des grosses fibres nerveuses. Par la suite, les mesures ont été réalisées uniquement à 4 et 8 semaines de protocole, sur 8 à 10 souris par groupes.

Protocole :

- Anesthésier l'animal : injection intrapéritonéale de Thiopental® (Panpharma) à 65mg/kg
- Allumer générateur, boîtier d'acquisition (réglé sur 4V), sonde thermique et logiciel
- Lorsque l'animal est complètement endormi (~10min), procéder à la mise à jour du nerf sciatique :
 - Inciser d'1cm de la peau sur le dos dans le prolongement de la cuisse
 - Écarter les faisceaux musculaires, le nerf (blanc) est bien visible (comme suspendu)
- Placer la sonde thermique dans la cavité du nerf. Tout au long de l'expérimentation ajuster la position de la lampe afin d'avoir une température constante proche de 37°C dans la cavité, et humidifier régulièrement la cavité avec du sérum physiologique pour éviter le dessèchement des tissus
- Placer les électrodes :
 - Piquer l'électrode Réceptrice entre les orteils
 - Coller l'électrode Référence sur une partie du corps à l'écart des autres électrodes
- Placer l'électrode de Stimulation au niveau du nerf dégagé et déclencher la stimulation à l'aide du logiciel. La contraction musculaire produit une première onde (« M-wave »)
- Piquer l'électrode de Stimulation au niveau du talon et déclencher la stimulation à l'aide du logiciel. La contraction musculaire produit une deuxième onde
- Mesurer la distance entre les 2 points de stimulation et la différence de durée de réponse du muscle afin de calculer la MNCV

- Répéter les 3 dernières étapes 3 fois successives par animal
- Faire la moyenne des 3 mesures de MNCV pour chaque animal
- Après la dernière acquisition, l'animal doit être mis à mort

c. Densité IENF

L'épiderme est richement innervé par des fibres sensorielles non myélinisées de type C (appelées fibres nerveuses intraépidermiques, IENF) et il a été démontré que leur diminution de leur densité était corrélée à la sévérité de la neuropathie [Duo *et al.* 2018]. C'est pourquoi c'est une méthode très utilisée, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, pour déterminer la présence d'une neuropathie des petites fibres.

Cette méthode nécessite le prélèvement d'une biopsie de peau, et le comptage des fibres nerveuses immunomarquées par l'anticorps anti-PGP9.5 sur coupe transversale de peau.

Une « guideline » existe pour ce comptage, décrit par Lauria *et coll.* en 2005 [Lauria *et al.* 2005] :

$$\text{Densité IENF (IENF/mm)} = \frac{\text{Nombre de fibres traversant la jonction dermo-épidermique}}{\text{Longueur de la jonction dermo-épidermique}}$$

Contrairement à la plupart des études sur animaux qui quantifient la densité IENF au niveau du dessous de la patte, nous avons choisi de l'évaluer à l'emplacement où sont réalisées toutes les mesures suivantes : peau du bas du dos.

Les mesure a été réalisée à 4 et 8 semaines de protocole, sur 3 souris par groupes.

Protocole utilisé dans ce travail de thèse :

- Prélever un échantillon de peau non lésée de largeur ~2cm sur le bas du dos (de préférence dépilé (cf section I.4)), le fixer et l'inclure en paraffine (cf section VI.1)
- Réaliser des coupes de 30 µm d'épaisseur avec avancement de 500µm entre les coupes
- Procéder à l'immunomarquage des fibres avec l'anticorps primaire anti-PGP9.5 et anticorps secondaire couplé Alexa Fluor 647 et au marquage des noyaux cellulaires au DAPI (cf section VI.3)
- Sur 2 coupes par souris : prendre une photo mosaïque au microscope confocal (Nikon Eclipse Ti-E) sur toute la longueur et l'épaisseur de l'échantillon, objectif x40, stacks 2µm
- Réaliser à l'aide du logiciel ImageJ pour chaque coupe :
 - Une projection des stacks afin d'avoir une seule image par coupe
 - Compter les fibres traversant la JDE (localisable par l'alignement des noyaux des kératinocytes basaux)
 - Mesurer de la longueur de la JDE
- La densité IENF d'une souris correspond à la moyenne des 2 coupes

4. Dépilation des souris

Nous avons réalisé la totalité des expérimentations sur souris C57BL6/JRj. Ces animaux ont une fourrure épaisse et noire, il est donc nécessaire de les dépiler afin de pouvoir étudier la peau. La dépilation pouvant créer une légère irritation mais les poils repoussant rapidement, la dépilation doit se faire au mieux 24h avant toute expérimentation.

Cependant, pour étudier les propriétés physiques de la peau non lésée, les souris ont toutes été dépillées exactement 4 jours avant l'analyse, permettant la restauration du *Stratum corneum*.

La dépilation stimule et synchronise la pousse des poils, faisant apparaître des tâches noires sur la peau rose pouvant perturber les mesures. C'est pourquoi il est préférable de ne faire qu'une seule dépilation au cours du protocole sur animal vivant.

Protocole :

- Placer les souris dans des cages individuelles au mieux 24h avant dépilation, sinon juste après dépilation afin d'éviter l'agressivité (odeur de crème) entraînant des morsures.
- Préparer :
 - Un grand récipient d'eau tiède (~30°C)
 - Un 2e récipient avec de l'eau tiède additionné de savon hypoallergénique liquide
 - Compresse
 - Crème dépilatoire Veet® (permet la dégradation de la fibre pileuse externe)
 - Cotons-tiges
 - Rasoir électrique
- Anesthésier la souris sous isoflurane (OSALIA) (induction 4%, puis 2% au masque), sur plaque chauffée à 35°C
- Raser de près les poils du dos à l'aide du rasoir électrique
- Passer une 1^e compresse sèche sur la zone rasée afin d'enlever les poils coupés
- Étaler l'équivalent d'une cacahuète de crème Veet au coton-tige sur la zone rasée et masser afin de bien répartir la crème entre les poils. Laisser en contact avec la peau 30sec au total
- Retirer le maximum de crème avec une 2^e compresse sèche
- Imbibler une 3^e compresse d'eau savonneuse tiède et passer sur la zone épilée afin de retirer les résidus de crème
- Rincer soigneusement la peau avec une 4^e compresse humide et vérifier qu'il ne reste aucun résidu de crème
- Sécher la peau en tamponnant avec du papier
- Mettre la souris dans sa cage individuelle et, afin d'éviter l'hypothermie, placer la cage dans la couveuse chauffée jusqu'à ce que autres poils et la peau sèchent
- Rentrer la cage en animalerie

5. Caractérisation structurelle et physique de la peau non lésée

a. Mesure des épaisseurs des couches cutanées

Afin d'évaluer l'impact du diabète et de la sévérité de la neuropathie sur la peau, les épaisseurs de différentes couches cutanées ont été mesurées :

- Épaisseur de peau totale : du *Panniculus carnosus* à la dernière couche épidermique vivante inclus.
 - Épaisseur de l'épiderme : inclue les couches vivantes (sans le *Stratum corneum*)
 - Épaisseur du derme : commence sous l'épiderme et s'arrête au-dessus du tissu adipeux
- La mesure a été réalisée à 4 et 8 semaines de protocole, sur 3 à 5 souris par groupes.

Protocole :

- Prélever un échantillon de peau non lésée de largeur ~2cm sur le bas du dos (de préférence dépilé (cf section I.4)), le fixer et l'inclure en paraffine (cf section VI.1)
- Réaliser des coupes de 5 µm d'épaisseur avec avancement de 500µm entre les coupes
- Procéder à la coloration HES (cf section VI.2)

- Sur 2 coupes par souris : prendre une photo mosaïque au microscope x20
- Réaliser, à l'aide du logiciel ImageJ, 30 mesures d'épaisseur des couches pour chaque coupe et les moyenner
- Les épaisseurs cutanées d'une souris correspondent à la moyenne des 2 coupes

b. Mesure de l'hydratation cutanée

L'état d'hydratation des couches supérieures de l'épiderme a été mesuré à l'aide d'un cornéomètre (Monaderm, modèle C825), sonde de mesure non invasive. Il existe une relation directe entre le contenu en eau de la peau et sa capacité électrique (ou capacitance). Le cornéomètre mesure cette capacitance des couches les plus superficielles de l'épiderme, à l'aide d'une sonde tenue perpendiculairement à la peau avec une pression constante. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires et désignent un indice d'hydratation pouvant aller de 0 à 130, de la peau très sèche à hydratée.

Les mesures ont été réalisées à 4 et 8 semaines de protocole, sur 6 à 8 souris par groupes.

Protocole :

- Dépiler la souris 4 jours avant la mesure (cf section I.4)
- Le jour de la mesure d'hydratation cutanée, anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
- Appliquer la sonde de cornéométrie sur le bas du dos avec une légère pression, la mesure s'affiche sur le logiciel connecté. Réaliser la mesure sur 3 zones différentes du bas du dos pour chaque souris et moyenner
- Remettre l'animal dans sa cage

c. Mesure des propriétés mécaniques cutanées

La lâcheté et l'élasticité de la peau ont été mesurées à l'aide d'un cutomètre avec ouverture de 2mm (Monaderm, modèle MPA580), sonde de mesure non invasive. Une pression négative est créée dans l'appareil et la peau est aspirée dans la cupule de mesure de la sonde. Après un temps défini, la peau est relâchée.

Les résultats présentés dans ce mémoire montrent les paramètres suivants :

- L'élasticité, reflétant la capacité de la peau à retourner dans sa position d'origine (élasticité proportionnelle à la valeur donnée)
- La lâcheté (la non-fermeté), reflétant le défaut de résistance de la peau face à la pression négative.

Les mesures ont été réalisées à 4 et 8 semaines de protocole, sur 6 à 8 souris par groupes.

Protocole :

- Dépiler la souris 4 jours avant la mesure (cf section I.4)
- Le jour de la mesure des propriétés mécaniques cutanées, anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
- Régler l'appareil pour une aspiration de 450mbar pendant 2sec suivie de 2sec de relâchement, avec 3 cycles successifs
- Appliquer la sonde de cutométrie sur le bas du dos sans pression, et démarrer la mesure tout en maintenant la sonde sans bouger
- Les valeurs de lâcheté (R0) et d'élasticité nette (R5) (entre autres paramètres) sont

directement calculées par l'appareil.

- Remettre l'animal dans sa cage

6. Induction d'une lésion d'excision pour la validation de la grille CRoMT

Des lésions d'excision ont été réalisées pour étudier la corrélation entre évaluation macroscopique du jour de « fermeture » et évaluation histologique (Etude B pour la grille CRoMT, cf section II.2).

Pour cela, une excision de peau a été réalisée sur 20 souris contrôles âgées de 8 semaines dépilée la veille et n'ayant reçu aucune injection.

Protocole

- Dépiler la souris 24h avant (J-1) la réalisation de l'excision (cf section I.4) sur la moitié basse du dos. Les animaux doivent impérativement être dans des cages individuelles.
- J0 : réaliser une excision :
 - Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
 - Passer une compresse imbibée d'éthanol 70° sur la peau du dos afin de bien la dégraisser/désinfecter, et laisser sécher quelques secondes.
 - Découper un cercle de peau totale à l'aide d'un « Biopsy Punch » stérile de 8mm de diamètre
 - Poser un carré de Film Optiskin (URGO, film adhésif transparent semi-perméable sans compresse) pour protéger la zone lésée
 - Remettre l'animal dans sa cage
- Surveiller l'animal tous les jours. Ne pas remplacer le Film Optiskin si la souris l'a enlevé.
- À J8, J9, J12, J14, J16 et J19 sur 2 à 4 souris prises au hasard :
 - Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
 - Prendre en photo la lésion sans flash, avec sources lumineuses (emplacement et intensité) et distance constantes.
 - Mettre à mort l'animal et prélever la zone lésée/cicatrisée pour l'analyse histologique (cf section I.8)

7. Induction d'un ulcère de pression et suivi de sa cicatrisation

Les lésions de pression ont été induites sur souris contrôles et diabétiques à 4 ou 8 semaines après injection (de tampon citrate ou STZ) pour évaluer l'influence de la neuropathie diabétique et de sa sévérité sur la cicatrisation.

a. Induction d'un ulcère de pression

Un protocole original a été développé pendant ce travail de thèse et a fait l'objet d'un dépôt de brevet (cf. Annexe 3 page 214). Celui-ci est inspiré de la méthode de Stadler et coll. [Stadler *et al.* 2004] à laquelle a été ajoutée une friction afin de mieux reproduire les facteurs déclenchants de l'ulcère du pied diabétique.

Les aimants utilisés (Magsy, ref 20109) sont en Néodyme, de diamètre 8mm, d'épaisseur 1mm et avec une force de pression exercée de 417,8mmHg (Figure 23A).

Afin de faciliter la pose et le retrait des aimants sans abîmer la peau alentour, des morceaux

de chevilles en plastique (Figure 23B) sont collés aux aimants à l'aide de colle Néoprène liquide (prévoir minimum 48h de séchage) (Figure 23C). Les aimants peuvent être réutilisés.

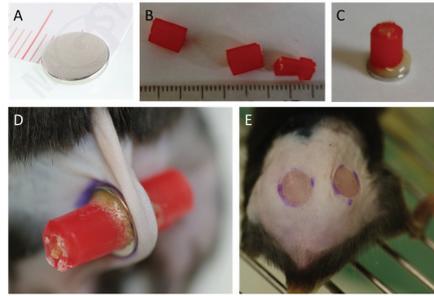


Figure 23. Photo des aimants utilisés pour induire un ulcère de pression

A/ Aimant. B/ Morceaux de cheville. C/Aimant collé sur cheville. D/ Deux aimants placés sur le bas du dos d'une souris. E/ Photo du dos de la souris juste après le retrait des aimants.

Protocole d'induction d'ulcère (confidentiel jusqu'à la publication du brevet) :

- Dépiler la souris 24h avant le début de l'induction d'ulcère de pression (cf section I.4) sur la moitié basse du dos (carré de 4 cm de côté). Les animaux doivent impérativement être dans des cages individuelles.
- Le jour de début de l'induction (J0) :
 - 1- Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
 - 2- Passer une compresse imbibée d'éthanol 70° sur la peau du dos afin de bien la dégraisser, et laisser sécher quelques secondes. Nettoyer les aimants à l'éthanol 70° et les sécher.
 - 3- Faire un pli de peau sur le bas du dos entre les cuisses et placer les aimants de part et d'autre afin qu'ils soient placés de manière symétrique à la colonne vertébrale avec ~5mm d'espacement (Figure 23D)
 - 4- Encercler les aimants à l'aide d'un marqueur chirurgical
 - 5- Replacer l'animal avec ses aimants dans sa cage pendant 3h
 - 6- Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
 - 7- Retirer les aimants et remettre la peau à plat (Figure 23E) en tirant doucement sur la peau des cuisses si nécessaire
 - 8- Réaliser une friction appuyée (~30g) sur les zones compressées à l'aide d'un coton-tige : 5 allers-retours dans le sens cuisse-cuisse et 5 allers-retours dans le sens tête-queue
 - 9- Apposer un carré de Film Optiskin (3,5cm de large et 2,5cm de hauteur) centré sur les zones compressées
 - 10- Replacer l'animal dans sa cage
- 21h après le retrait des aimants (J1) :
 - Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
 - Si le Film Optiskin est décollé/tombé, le remplacer (tout ou partie)
 - Répéter les étapes 3 (compresser les mêmes zones),5,6,7,8,10
- 21h après le retrait des aimants (J2) :
 - Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)
 - Si le Film Optiskin est décollé/tombé, le remplacer (tout ou partie)
 - Répéter les étapes 3 (compresser les mêmes zones),5,6,7,8,10
- 21h après le retrait des aimants (J3) :
 - Anesthésier la souris sous isoflurane (induction 4%, puis 2% au masque)

- Retirer le Film Optiskin
- Replacer l'animal dans sa cage
- À J4-J5 l'ulcère de pression est visible macroscopiquement

b. Suivi de la cicatrisation de l'ulcère de pression par évaluation macroscopique

Afin d'évaluer l'évolution de la lésion de pression sans mise à mort de l'animal, des photos des zones lésées ont été réalisées tous les 2-3 jours dos bien plat, sans flash, avec sources lumineuses (emplacement et intensité) et distance constantes, et avec une règle millimétrée souple posée sur l'animal à côté des lésions.

i. Mesure de la surface macroscopique de lésion

Les mesures de surface de lésion (couleur/aspect/humidité différents des zones non compressées adjacentes) ont été réalisées grâce au logiciel ImageJ à partir des photos macroscopiques.

Les mesures de surface macroscopique de l'ulcère de pression ont été réalisées sur tous les groupes de souris, avec 6 à 35 souris par point de cinétique.

Protocole :

- Ouvrir la photo sous ImageJ
- Placer un trait sur toute la longueur de la règle millimétrée
- Aller dans *Analyse > Set Scale*, et indiquer la mesure réelle de votre trait et l'unité en millimètre
- A l'aide de l'outil *Freehand section*, entourer toutes les zones lésées en maintenant appuyée la touche Shift
- Mesurer la surface totale des zones lésées : touches Ctrl et M simultanées, la valeur apparaît dans une nouvelle fenêtre
- Reporter la valeur *Area* pour chaque souris dans un tableau Excel

ii. Evaluation macroscopique du jour de fermeture

Le jour de fermeture d'une lésion/cicatrice a été évalué visuellement, non pas en mesurant sa surface mais en considérant sa couleur / sa rugosité / sa moiteur à l'aide de la grille CRoMT (cf section II).

Pour cela, un score CRoMT a été donné pour chaque photo de lésion/cicatrice prise. Le jour de fermeture (Jf) a été défini pour chaque groupe le premier jour où la combinaison des médianes de chaque paramètre CRoMT d'un point de cinétique réunissait les critères visuels définis (cf section I.3 de la partie Travail de thèse) : Couleur et Rugosité et Total chacun inférieur ou égal à 1 et Moiteur égale à 0.

Exemple :
 Jour 17 : $C_{\text{médian}} = 1$, $R_{\text{médian}} = 1$, $M_{\text{médian}} = 0$, $T_{\text{médian}} = 2$
 Jour 19 : $C_{\text{médian}} = 1$, $R_{\text{médian}} = 0$, $M_{\text{médian}} = 0$, $T_{\text{médian}} = 1 \rightarrow \text{Jf}$
 Jour 21 : $C_{\text{médian}} = 0$, $R_{\text{médian}} = 0$, $M_{\text{médian}} = 0$, $T_{\text{médian}} = 0$

Les évaluations ont été réalisées sur tous les groupes de souris, avec 10 à 37 souris par point de cinétique.

8. Mise à mort et prélèvement d'échantillons de peau

a. Mise à mort de la souris

La mise à mort a précédé tout prélèvement. Elle a été réalisée par overdose de thiopental en injection intracardiaque.

b. Prélèvement d'échantillon de peau

Le prélèvement de peau a été réalisé 5min maximum après la mise à mort de l'animal. Afin de pouvoir prélever de la peau (non lésée, lésée, fermée), les étapes suivantes ont été respectées :

Protocole :

- Dépiler la peau pour un prélèvement de peau non lésée et à Jf (lésion fermée) (cf section I.4). Pour des prélèvements en cours de cicatrisation (J5, J10) la peau doit être uniquement rasée de près (pas de crème Veet)
- Badigeonner la peau d'éthanol 70° puis sécher en tamponnant avec un papier. Attendre la totale évaporation de l'éthanol.
- Prélever l'échantillon selon l'utilisation ultérieure :
 - Peau non lésée pour analyse à J0 ou pour culture *ex vivo*
 - Peau lésée à prélever selon le schéma suivant :

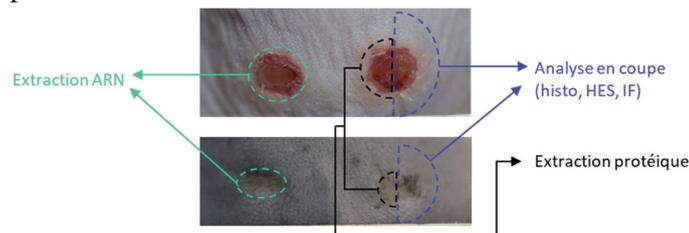


Figure 24. Schéma des découpes de peau réalisées sur les lésions de pression ou cicatrices pour l'analyse protéique, d'expression génique et en coupe.

- Traiter l'échantillon selon l'utilisation ultérieure :
 - Pour culture *ex vivo* : le mettre en milieu de culture chaud jusqu'à la mise en culture (1h max)
 - Pour extraction protéique : le placer à sec dans un Eppendorf et conserver à -80°C jusqu'à l'extraction
 - Pour l'extraction d'ARN : le plonger dans un Eppendorf contenant du RNAlater froid (Sigma ref R0901), puis incubé le tube à +4°C 24-72h, puis stocker le tube à -80°C jusqu'à l'extraction
 - Pour l'analyse histologique / immunohistochimique / par immunofluorescence : le placer à plat dans une cassette entre 2 mousses (Dutscher ref 040666). Fixer le tissu en solution d'alcool-formol-acide acétique (CARLO ERBA Reagents, *Fixative AFA liquid*) 24h/TA ou 48/+4°C.

II. Méthode de validation de la grille CRoMT pour l'évaluation visuelle de la fermeture d'une lésion chez la souris

Un outil a été développé au cours de la thèse pour évaluer macroscopiquement et objectivement le jour de « fermeture » d'une lésion chez la souris, et a ensuite été utilisé pour l'étude de la cicatrisation cutanée avec la neuropathie diabétique.

Cet outil a été nommé « grille CRoMT » (Figure 25) car cette grille comprend les paramètres suivant :

- C pour Couleur de la lésion (*color*) graduée de 0 à 3
- Ro pour Rugosité (*roughness*) graduée de 0 à 2
- M pour Moiteur/humidité (*moistness*) graduée de 0 à 2
- T pour Total, qui correspond à la somme des grades des autres paramètres (C + R + Mo), est graduée de 0 à 7.
- L'ensemble donne le score CRoMT de la lésion (ex : 3125 pour C=3, Ro=1, M=2 et T=5).

Pour la validation ce cet outil, deux « études » ont été menées successivement et faisant appels à des volontaires : l'Étude A, permettant de définir les critères visuels d'une lésion dite « fermée », et l'Étude B, permettant d'évaluer la corrélation histologique de ces critères.

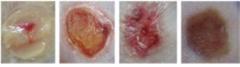
Scores Parameters	0	1	2	3
COLOR	White, grey, pale pink 	Light pink, beige 	Dark pink, pale brown 	Yellow, orange, red, brown 
ROUGHNESS	Flat and smooth 	Flat but rough or squamous surface 	Concave or convex surface 	TOTAL SCORE (0 to 7) = Color score + Roughness score + Moistness score
MOISTNESS	Dried 	Gluey, sticky 	Wet 	
Example: Color 3, Roughness 1, Moistness 2 = Total score 5 → CRoMT score: 3 1 2 5				

Figure 25. Grille CRoMT pour l'évaluation visuelle des lésions chez la souris.

1. Étude A

a. Photos présentées et description du panel de volontaires

Parmi une banque de photos de souris d'une partie du travail de thèse non présentée dans ce mémoire, une sélection 30 photos a été faite. Cette sélection (Figure 26) comprend des photos de peau lésée ou non lésée de souris contrôles ou diabétiques, à différents temps de cicatrisation de lésion l'excision ou de pression.

Les photos ont toutes été prises dans les mêmes conditions d'exposition lumineuses ou de résolution, et ont été présentée sans barre d'échelle afin de ne pas influencer l'évaluation par les volontaires.



Figure 26. Les 30 photos de peau/lésion de souris présentées au Panel A pour l'Étude A.

La liste des volontaires (Panel A) pour évaluer visuellement les photos était composée de 30 personnes :

- 12 volontaires considérés comme « experts » en évaluation des lésions cutanées. Ce sous-groupe comportait 3 chercheurs, 2 techniciens, 3 doctorants et 2 stagiaires en expérimentation animale, et 2 médecins du service des grands brûlés.
- 18 volontaires considérés comme « non-experts » car n'ayant aucune expérience professionnelle en évaluation de la cicatrisation cutanée.

b. Recrutement et déroulement de l'étude

Les volontaires ont été recrutés suite à l'invitation envoyée par email à tout l'institut à participer à l'étude, en précisant le caractère des photos. Ils ont ensuite été conviés un à la fois pour évaluer les photos.

La grille CRoMT leur a été présentée et chaque volontaire a eu quelques minutes pour la regarder et la comprendre. Ensuite, un ordinateur leur a été mis à disposition, avec une présentation PowerPoint des photos à évaluer (1 photo par diapositive). Il leur a été demandé d'évaluer seul chaque photo avant de passer à la suivante, sans retour en arrière. Il n'y avait pas de temps imparti. Un tableau sur feuille papier leur a été donné pour inscrire leur évaluation : score pour chaque paramètre de la grille et pour chaque photo. Il a été demandé en sus au sous-groupe d'expert de répondre à la question « La lésion est-elle fermée selon vous ? Oui / Non » pour chaque photo.

c. Analyse des résultats

L'objectivité du score donné a été évaluée en comparant l'effet de l'expertise sur les scores donnés de chaque paramètre pour l'ensemble des photos.

Le score CRoMT de chaque photo a été déterminé en considérant la médiane des résultats de l'ensemble des sous-groupes experts et non-experts pour chaque paramètre et pour chaque photo. Puis, afin de déterminer les critères (score de chaque paramètre) correspondant à une lésion visuellement fermée, les photos ont été classées selon le pourcentage d'experts ayant répondu « Oui » à la question posée.

2. Étude B

L'Étude B a été menée après l'Étude A dans le but de déterminer s'il existe une corrélation entre les critères visuels d'une lésion « fermée » et la réépidermisation.

a. Photos présentées et description du panel de volontaires

20 souris ont été excisées sur le dos, et des photos macroscopiques des lésions et prélèvements histologiques ont été réalisés entre J8 et J19 après l'excision (cf. section I.6). Comme pour l'Étude A, les photos ont toutes été prises dans les mêmes conditions d'exposition lumineuses ou de résolution, et ont été présentée sans barre d'échelle afin de ne pas influencer l'évaluation par les volontaires.

La liste des volontaires (Panel B) pour évaluer visuellement les photos était composée de 12 personnes (experts et non-experts confondus) n'ayant pas participé à l'Étude A.

b. Recrutement et déroulement de l'étude

Les volontaires de l'Étude B ont été recrutés et conviés comme pour l'Étude A. La grille CRoMT et les 20 photos de l'Étude B ont été présentée comme pour l'Étude A, avec les mêmes consignes d'évaluation. Il leur a été demandé de donner individuellement le score pour chaque paramètre de la grille et pour chaque photo.

En parallèle, la réépidermisation des coupes de peau correspondantes aux photos présentées dans l'Étude B a été évaluée histologiquement après coloration HES par un laboratoire indépendant (Novotec) selon ses critères semi-quantitatifs :

Grade	Epiderme
0	Absence
1	Ré-épithélialisation partielle, incomplète
2	Ré-épithélialisation totale, épiderme épais et non organisé
3	Ré-épithélialisation totale, épiderme épais et organisé
4	Epiderme normal

Après obtention des résultats du grade de réépidermisation de chaque lésion, des marquages immunofluorescents pour des marqueurs de différenciation épidermique (kératine 10, kératine 14, filaggrine, involucrine) ont été réalisés sur demande par le laboratoire Novotec sur 3 coupes ayant obtenus les grades de réépidermisation 2, et 6 coupes pour le grade 3.

c. Analyse des résultats

Le score CRoMT de chaque photo a été déterminé en considérant la médiane des résultats du Panel B pour chaque paramètre et pour chaque photo.

Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre les critères CRoMT définis pour une lésion visuellement fermée (définis dans l'Étude A) et la réépidermisation, la sensibilité et la spécificité des critères à identifier les lésions ayant un néoépiderme fermé et organisé ont été calculées comme suit :

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Nombre total de lésions ayant un épiderme de Grade 0, 1 ou 2}}{\text{Nombre de lésions ayant un épiderme de Grade 0, 1 ou 2 et un score CRoMT ne correspondant pas aux critères « lésion fermée »}}$$

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Nombre de lésions ayant un épiderme de Grade 3 ou 4 et un score CRoMT correspondant aux critères « lésion fermée »}}{\text{Nombre total de lésions ayant un épiderme de Grade 3 ou 4}}$$

Les immunomarquages ont été analysés qualitativement.

III. Technique de culture ex vivo de peau de souris

Un modèle *ex vivo* d'étude de la cicatrisation post-compression a été initié afin d'étudier l'influence de la neuropathie diabétique en utilisant moins d'animaux, avec un suivi plus rapide. L'autre intérêt de ce type de modèles est d'éliminer/limiter l'effet des systèmes immunitaire circulant, vasculaire, et nerveux.

1. Culture de peau ex vivo et induction d'une lésion de pression

La peau utilisée dans ce modèle provient du dos entier de souris contrôles ou diabétiques à 4 ou 8 semaines. Il est possible de faire en moyenne 12 explants par dos de souris, permettant de tester plusieurs conditions.

Excepté le prélèvement de la peau de souris qui se fait en pièce d'expérimentation animale, toutes les expérimentations se font sous Poste de Sécurité Microbiologique en conditions stériles.

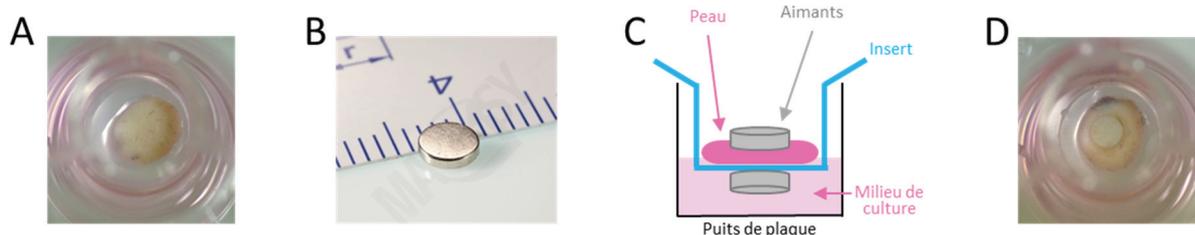


Figure 27. Photo et schéma pour la réalisation d'une lésion de pression sur peau *ex vivo*
 A/ Photo d'un explant de peau placé en insert de culture. B/ Photo d'un aimant utilisé pour la compression *ex vivo*. C/ Schéma de la mise en place des aimants pour la compression. D/ Photo d'explant compressé après le retrait des aimants.

Protocole

- Préparer le milieu de culture à 2g glucose /L puis le filtrer :

DMEM, low glucose, with pyruvate (Gibco ref 31885)	220 mL
Ham's F-12 Nutrient Mix (Gibco ref 11765)	220 mL
D-glucose (Sigma ref G7021)	300 mg
Sérum de Veau Fœtal (Gibco)	50 mL
Solution de Pénicilline-Streptomycine 10 000U/ml (Gibco)	5 mL
Solution d'amphotéricine B à 250µg/ml (Gibco)	5 mL

- Mise à mort de souris diabétique et contrôle du même âge, dépilation et prélèvement de la peau du dos entier (cf section I.8) qui est placée dans un tube contenant 20ml de milieu de culture chaud
- Placer la peau et son milieu dans une boîte de Pétri
- Découper des explants de 8mm de diamètre à l'aide d'un « Biopsy Punch », en ne prenant que les zones de peau parfaitement blanches (sans tâche)
- Mettre les explants sur inserts (Greiner ref 665638 : diamètre 12mm, membrane PET de porosité 8µm, pour plaque 12 puits)
- Répartir aléatoirement entre les conditions à tester (temps de culture, avec/sans compression, techniques d'analyse) dans les puits d'une plaque 12 puits (Figure 27 A)
- Placer un aimant (Magsy ref 20023, diamètre 4mm, force de pression 517mmHg) au centre de l'explant de peau et placer un deuxième aimant sous l'insert (Figure 27 B et 27 C) (= J0)
- Mettre du milieu de culture dans la plaque à effleurement de l'insert (800µL à 1ml selon les marques de plaque)
- Incuber à 16h / 37°C / 5% CO₂ / 100% humidité

- Retirer délicatement les aimants et remettre l'explant en culture (sans changer le milieu). La zone compressée reste bien visible macroscopiquement (Figure 27 D)
- Changer le milieu de culture 8h après le retrait des aimants (= J1) puis tous les jours

2. Etude de la cicatrisation *ex vivo*

Afin d'évaluer la cicatrisation post-compression, la culture de certains explants est arrêtée à différents temps afin d'évaluer la structure histologique ou la viabilité cellulaire. Les milieux de culture ont également été récupérés pour analyser la sécrétion de certaines cytokines.

a. Évaluation histologique

La culture de certains explants de peau de souris contrôle et diabétiques 4wk a été arrêtée à J1 (8h après le retrait des aimants), J3 et J6.

Pour l'étude histologique, les explants provenaient d'une seule souris diabétique et une seule souris contrôle.

Les explants ont été fixés comme indiqué dans la section I.8.b.

L'inclusion, la coloration HES (cf. section VI), les photos et l'analyse histologiques ont été réalisées par le laboratoire Novotec (www.novotec-labs.com).

b. Test de viabilité cellulaire au MTT

Le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) consiste à mettre les cellules en présence de cette substance (soluble jaune) dans le milieu de culture et d'observer les cellules devenant bleues, indiquant la présence du métabolite du MTT (le formazan, précipité bleu) et donc l'activité métabolique des cellules qui étaient vivantes.

L'évolution de la réépidermisation a pu être évaluée à l'aide des photos réalisées.

L'expérimentation a été réalisée 2 fois sur des explants provenant de souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk (5 souris au total/groupe). Le pourcentage de zone non réépidermée représente la moyenne de ses 5 explants / condition.

Protocole :

- Préparer extemporanément une solution de MTT à 1mg/ml dans du milieu de culture, chauffer à 37°C et vortexer jusqu'à dissolution complète, puis filtrer à 0.2µm la solution
- Remplacer le milieu de culture des explants par la solution de MTT
- Incuber 3h / 37°C / 5% CO₂
- Découper la membrane de l'insert et la placer (avec l'explant) sur un papier absorbant
- Prendre en photo les explants
- Evaluer la réépidermisation à l'aide du logiciel ImageJ :
 - Entourer la zone compressée (zone plus plate même après 1 semaine) et mesurer sa surface (Ctrl M)
 - Entourer la zone de peau blanche et mesurer sa surface (Ctrl M)
 - Faire le calcul du % de la zone non réépidermée : (Zone blanche / zone compressée) x 100

c. Analyse du sécrétome

Afin d'évaluer si le modèle *ex vivo* reproduit en partie la cicatrisation *in vivo*, et d'identifier

d'éventuels nouveaux marqueurs, un sécrétome a été réalisé sur le milieu de culture.

Pour cela 4 explants provenant de la peau d'une souris Contrôle et 4 explants provenant d'une souris Diabétique ont été mis en culture et compressés, et le milieu de culture a été récupéré à J1 et J2 puis mélangés.

Le sécrétome a été analysé à partir de ces pools de milieux de culture à l'aide du kit Mouse XL cytokine Array kit (R&D system, ref ARY028), selon la méthode d'immunoessai sandwich. Cette méthode permet la semi-quantification de 111 cytokines, dont IL-1beta, RAGE soluble, IL-10, IL-1RA, VEGF, EGF, PDGF et périostine.

IV. Technique d'analyse de l'expression génique

1. Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits de peau de souris grâce au RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) et à une optimisation de la phase de broyage.

Protocole (pour 30-50mg de peau de souris ≈ 5-8mm de diamètre) :

- Prélever et conserver l'échantillon comme indiqué en Partie I.8.b page 79
- Décongeler à +4°C les tubes contenant RNAlater et peau
- Transférer le morceau de peau dans un microtube bleu (Dutscher ref 045001)
- Préparer le tampon de lyse (sous hotte) : RLT Buffer + 1% β-mercapto-éthanol (prévoir 300µL/tube)
- Ajouter 50µl de tampon de lyse sur la peau
- Sur bloc de froid, couper en petits morceaux (\leq 1mm de côté) la peau à l'aide des micro-ciseaux
- Ajouter 250µL de tampon de lyse
- Sur bloc de froid, finir la lyse (1min max) avec le pilon bleu (Dutscher ref 045001)
- Ajouter 590µL d'eau RNase free dans le tube bleu, puis 10µL de Protéinase K
- Inverser 2-3 fois le tube pour homogénéiser
- Incuber 10min à 55°C
- Centrifuger 4 min / 10 000g / TA
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf
 - ➔ Attention à ne pas prendre le culot contenant les débris, cela boucherait ensuite la colonne et empêcherait la bonne extraction de l'ARN !
 - ➔ En cas de difficulté à récupérer le surnageant : re-centrifuger 4min / 16 000g / TA
- Ajouter 450µL d'éthanol 96-100% et en transférer 700µL sur la colonne
- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Transférer le reste de l'échantillon sur la colonne
- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Ajouter 350µL RW1 sur la colonne, centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Mixer 10µL DNase (aliquots à -20°C) + 70µL RDD (à +4°C), et ajouter sur la colonne
- Incuber à TA 15min
- Ajouter 350µL RW1 sur la colonne, centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Ajouter 500µL RPE sur la colonne, centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Ajouter 500µL RPE sur la colonne et centrifuger 2min30sec / 10 000g / TA
- Jeter la poubelle et placer la colonne sur une nouvelle poubelle
- Centrifuger 2min / 16 000g / TA et jeter la poubelle
- Placer la colonne sur un Eppendorf 1,5ml avec le nom de l'échantillon
- Ajouter 30µL d'eau RNase Free à TA sur la colonne pour éluer l'ARN et attendre 2min
- Centrifuger 1min30sec / 10 000g / TA
- Récupérer l'éluat et le remettre sur la colonne, et attendre à nouveau 2min
- Centrifuger 1min30sec / 10 000g / TA
- Conserver l'Eppendorf contenant l'ARN sur bloc de froid, et jeter la colonne
- Evaluer la qualité et la concentration de l'ARN extrait :
 - La pureté des ARN et leur concentration est déterminées par spectrophotométrie à l'aide

d'un NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). La pureté des ARN est évaluée par i/ le calcul de ratio d'absorbance 260nm/280nm indiquant l'absence de protéines contaminantes, ii/ le ratio 260nm/230nm indiquant l'absence de contamination par des molécules organiques. Les ARN utilisés dans ce travail ont un ratio $A_{260}/A_{280} \geq 1,9$ et un ratio $A_{260}/A_{230} \geq 1,4$.

- L'extraction d'ARN de peau de souris avec ce protocole a permis d'obtenir des concentrations entre 100 et 500 ng/ μ L.
- L'absence d'ADN génomique ou de dégradation des ARN, nécessaire pour l'analyse d'expression génique, a été évaluée visuellement (Figure 28) par migration sur gel et révélation au bromure d'éthidium et ultra-violets.

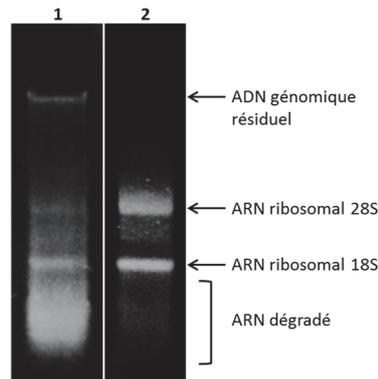


Figure 28. Photo de deux extraits d'ARN séparés sur gel après révélation

L'extrait n°1 contient de l'ADN génomique et des RAN dégradé, il ne peut pas être utilisé pour l'analyse d'expression génique. L'extrait n°2 est de bonne qualité pour l'analyse d'expression génique.

- Aliquoter les ARN et conserver à -20°C .

2. RTqPCR des ARN messagers

a. Transcriptase inverse

Les ARN sont rétrotranscrits à l'aide du kit PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara ref RR037A).

Protocole :

- Préparer le mix réactionnel pour chaque échantillon d'ARN :

Réactifs	Volume
5X PrimeScript buffer	2 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix	0,5 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	0,5 μ L
Random 6mers (100 μ lM)	0,5 μ L
ARN totaux	500 ng
Eau RNase free	QSP 10 μ l

- Programmer le thermocycleur (Biorad) pour la rétrotranscription :

Température	Durée
37 $^{\circ}\text{C}$	15 min
85 $^{\circ}\text{C}$	5 sec
4 $^{\circ}\text{C}$	illimitée

- Utiliser immédiatement les ADNc ainsi produits pour la réaction de PCR ou conserver les aliquotés à -20°C . Le rendement de la réaction étant considéré comme absolu, la concentration en ADNc de la solution obtenue est de 50ng / μ L.

b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

La réaction de qPCR a été réalisée avec le kit SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara ref RR820W). Les résultats d'expression génique exposés dans ce mémoire ont été obtenus grâce aux amorces QuantiTect Primer Assays (Qiagen) pour les gènes d'intérêt MMP-9 (ref QT00108815), MMP-10 (ref QT00115521), MMP-13 (ref QT00111104), CALCA (variant proCGRP α , ref QT01058043) et CALCB (ref QT00162078) normalisés par les gènes de ménage RPL13A (ref QT00267197) et B2M (ref QT01149547).

Protocole :

- Reconstituer chaque tube d'amorces avec 1,1ml de tampon Tris-EDTA pH 8,0 (BioUltra Ref 93283). La concentration obtenue est de 3 μ M Sens/Anti-sens. Aliquoter et conserver à -20°C.
- Diluer au 1/10e le volume d'ADNc nécessaire pour chaque échantillon
- Préparer le mix réactionnel afin de réaliser des duplicats :

Réactifs	Volume
Mix Takara	5 μ L
Amorces Qiagen reconstituées	1,3 μ L
Eau RNase free	1,7 μ L
ADNc dilués à 5ng/ μ L	2 μ L

- Déposer les échantillons en duplicats sur plaque 96 puits à fond transparent (Eurogentec), ajouter un « contrôle négatif » (eau RNase free à la place de l'ADNc). Filmer la plaque.
- Programmer l'appareil Aria Mix (Agilent) pour réaliser la qPCR en temps réel :

Étapes	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation	95 °C	30 sec	1
	95 °C	5 sec	
Amplification	60 °C	30 sec	40
	72 °C	30 sec	
	95 °C	1 min	
Courbe de fusion	60 °C	30 sec	1
	95 °C	30 sec	

c. Interprétation des résultats

La pureté de l'amplicon est systématiquement vérifiée en contrôlant l'unicité du pic de dissociation des produits doubles brins obtenus par la courbe de fusion, et par l'absence d'amplification observée dans les puits « contrôle négatif ».

Dans ce travail, les résultats sont exprimés en quantité relative. La méthode utilisée est celle du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [Livak *et al.* 2001], avec double normalisation par l'expression des gènes de ménage et l'expression de chaque gènes d'intérêt du groupe C4wk à J0 (peau non lésée).

V. Techniques de biochimie

1. Extraction des protéines

Les protéines ont été extraites de peau de souris pour l'étude de leur expression par western-blot ou immunoprécipitation.

Protocole d'obtention d'un lysat protéique de peau de souris :

- Prélever et conserver l'échantillon comme indiqué en section I.8.b.
- Ajouter au tube contenant la peau une solution (200 μ L/~40mg de peau) de tampon RIPA (Sigma ref R0278) froid supplémenté extemporanément avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Diagnostics) et d'inhibiteurs de phosphatases (solution à 25X : 125mM NaF, 250mM β -glycérophosphate, 25mM Na₃VO₄).
- Découper finement la peau aux micro-ciseaux, puis vortexer quelques secondes
- Incuber 30min / +4°C
- Vortexer quelques secondes
- Incuber 30min / +4°C
- Vortexer quelques secondes
- Centrifuger 10min / 10 000g / +4°C
- Récupérer le surnageant protéique

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du kit BCA Protein Assay Kit (Pierce Technologies).

Protocole :

- Réaliser des dilutions en série de facteur 2 dans du tampon RIPA à partir de l'albumine bovine (BSA) fournie dans le kit. Gamme finale : 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL
- Diluer les lysats protéiques au 1/4 dans du tampon RIPA
- Distribuer 25 μ L de la gamme et des échantillons dans une plaque 96 puits à fonds et bords transparents. Déposer également 25 μ l de tampon RIPA seul pour faire le « blanc »
- Préparer extemporanément le mix réactionnel (solution B diluée au 1/50^e dans la solution A) et en distribuer 200 μ L/puits
- Coller un film protecteur sur la plaque et incuber 30min / 37°C
- Retirer le film et supprimer les bulles à l'aide d'une aiguille
- Lire la plaque au spectrophotomètre à 560 nm
- Soustraire le « blanc » à toutes les valeurs obtenues
- Réaliser la courbe étalon et calculer la concentration protéique des échantillon en appliquant le facteur de dilution utilisé
- Concentration protéique moyenne obtenue de 3-6 μ g/ μ L

3. Séparation, détection et identification des protéines

Les protéines sont séparées par électrophorèse en fonction de leur masse moléculaire sur gel d'acrylamide, avant d'être transférées sur une membrane et détectées à l'aide d'anticorps spécifiques (Western Blot). Dans ce travail de thèse, la quantité de chaque protéine d'intérêt a

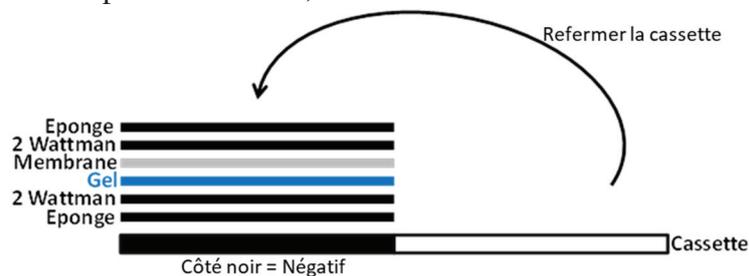
été normalisée par la quantité totale de protéines estimée par Rouge Ponceau, car l'actine n'était pas exprimée de manière linéaire entre peau non lésée et lésée (cf. Annexe 2 page 213).

Protocole de Western Blot :

- Préparer les échantillons protéiques (pour des puits de 25 μ L) :

Lysat protéique + Eau MiliQ	30 μ g protéine + Eau miliQ QSP 16 μ L
Tampon Laemmli 5X (SDS 10%, glycérol 30%, bleu de bromophénol 0,05%, Tris-HCl 250 mM pH = 6.8, DTT 75mM)	4 μ L

- Dénaturer les protéines 5min / 95°C
- Séparation des protéines par électrophorèse :
 - Préparer le tampon de migration : TG-SDS (Euromedex) (Tris-HCl 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1%)
 - Déposer les protéines dénaturées sur le gel précoulé à gradient d'acrylamide 4%-15% (BioRad) préalablement placé dans un système Mini Protean III (BioRad) contenant du tampon de migration. Prévoir un puits pour le marqueur de taille (Biorad, Precision Plus Protein Standards)
 - Faire migrer à 25mA/gel (s'il y a 4 gels, faire migrer à 100mA)
- Transfert des protéines :
 - Préparer le tampon de transfert : 25mM Tris-HCl, 192mM Glycine, 20% Ethanol
 - Activer une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) 30sec / bain d'éthanol
 - Récupérer le gel d'acrylamide et faire le montage suivant dans une bassine sous immersion de tampon de transfert, et chasser les bulles avant de refermer :



- Plonger le montage dans la cuve (système Mini Trans-Blot, Biorad) contenant le tampon de transfert et un bloc congelé (côté noir contre côté noir)
- Faire transférer les protéines du gel vers la membrane 1h / 4°C / 220mA
- Evaluation de la quantité de protéines transférées par Rouge Ponceau (adapté de [Goldman *et al.* 2016])
 - Lavages eau 2 x 5min
 - Incuber avec une solution de Rouge Ponceau 2min / TA / agitation
 - Laver 2 fois rapidement à l'eau distillée
 - Prendre en photo la membrane grâce à la caméra Fusion Fx system (Vilber Lourmat)
 - Rincer la membrane 3 fois TBS-T (TBS-0,1% Tween 20) / 10min / agitation
- Identification des protéines
 - Préparer une solution de blocage : 5% lait écrémé / TBS-T
 - Plonger la membrane dans la solution de blocage 1h / TA / agitation pour éviter les interactions non spécifiques des anticorps de révélation
 - Préparer la solution d'anticorps primaire (cf Tableau 4) dans 2% lait écrémé/TBS-T
 - Incuber la membrane avec l'anticorps primaire *overnight* / 4°C / agitation

- Rincer 3 fois TBS-T / 10min / agitation
- Préparer la solution d'anticorps secondaire (cf Tableau 4) dilué dans du TBS-T
- Incuber la membrane avec l'anticorps secondaire 1h / TA / agitation / obscurité
- Rincer 3 fois TBS-T / 10min / agitation
- Incuber la membrane 5 minutes avec le réactif d'électrochimiluminescence (Thermo Scientific ref 34580)
- Détecter le signal grâce à la caméra Fusion Fx system

Les résultats présentés dans ce mémoire ont tous été obtenus avec le même temps d'exposition pour une protéine donnée, et sans saturation de signal

- Exprimer la quantité relative d'une protéine grâce au logiciel GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>) :
 - Quantification de la quantité de protéine totale : mesurer le Signal Rouge Ponceau total d'une bande de migration (de haut en bas de la membrane pour chaque échantillon)
 - Quantification du Signal net pour une protéine donnée : mesure du signal au poids moléculaire attendu (signal brut) auquel est soustrait le bruit de fond.
 - Quantité relative d'une protéine : Ratio Signal net / Signal Rouge Ponceau total.

Il est possible de réutiliser une membrane pour la détection d'une autre protéine en retirant les anticorps présents :

Protocole de Stripping :

- Rincer 1 fois TBS-T / 10min / agitation
- Incuber 15min / agitation dans du tampon de « Stripping » (Thermo Scientific ref 46430)
- Recommencer à l'étape « Evaluation de la quantité de protéines transférées par Rouge Ponceau » du protocole de Western Blot.

Tableau 4. Liste des anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines par Western Blot

	Protéine détectée	Fournisseur	Référence	Dilution
Anticorps primaires	CGRP	Cell signaling	14959	1/500
	CLR	Abcam	ab173562	1/100
	NEP	Abcam	ab79423	1/2500
	NGF	Abcam	ab52918 [EP1329Y]	1/500
	NK1R	Abcam	ab183713 [EPR6836(2)]	1/2000
	Périostine	Abcam	ab14041	1/1000
	p75NTR	Abcam	ab52987 [EP1039Y]	1/1000
	RAMP1	Abcam	ab156575 [EPR10867]	1/1000
	RCP	Abcam	ab139264	1/1000
	Substance P	Invitrogen	PA5-44998	1/500
TrkA	Abcam	ab76291 [EPR1058Y]	1/1000	
Anticorps secondaire	Rabbit IgG	Biorad	1706515	1/10 000

4. Immunoprécipitation

Afin d'identifier les protéines complexées à RCP, cette dernière a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps spécifique et de billes magnétiques. La détection des partenaires est ensuite réalisée selon le protocole de Western Blot.

Protocole :

- Préparer du tampon RIPA supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (appelé simplement « tampon RIPA » dans la suite du protocole), et le conserver à +4°C

▪ Préparer les échantillons protéiques et contrôles :

Échantillon	Lysat protéique + tampon RIPA	30 µg protéine + tampon RIPA QSP 17µL
	Anticorps IgG Rabbit Anti-RCP (Abcam ref ab139264)	0,765 µg
« Input »	Pool de lysats protéiques + tampon RIPA	30 µg protéine + tampon RIPA QSP 17µL
Contrôle positif	Pool de lysats protéiques + tampon RIPA	30 µg protéine + tampon RIPA QSP 17µL
	Anticorps IgG Rabbit Anti-RCP (Abcam ref ab139264)	0,765 µg
Contrôle négatif	Pool de lysats protéiques + tampon RIPA	30 µg protéine + tampon RIPA QSP 17µL
	Anticorps anti-IgG Rabbit (Abcam ref ab172730)	0,765 µg

▪ Incuber *overnight* / 4°C / agitation pour former le complexe anticorps-antigène (Ac-Ag)

▪ Préparer les billes magnétiques

- Bien homogénéiser la suspension de billes magnétiques liées aux protéines A/G (ThermoScientific ref 26162)
- En transférer 20µL dans autant d'Eppendorf 2ml que d'échantillons/contrôles à tester
- Laver les billes 3 fois comme suit :
 - Ajouter 0,5ml de tampon RIPA/tube
 - Incuber 3min / 4°C / agitation
 - Mettre le tube sur le portoir magnétique et attendre que le surnageant soit clair
 - Eliminer le surnageant (il reste un culot de billes)

▪ Former le complexe bille-Ac-Ag

- Ajouter la solution Ac-Ag de chaque échantillon sur un culot de billes
- Incuber 1h / 4°C / agitation
- Mettre le tube sur le portoir magnétique et attendre que le surnageant soit clair
- Eliminer le surnageant (il reste un culot de billes)
- Laver le complexe bille-Ac-Ag 3 fois comme suit :
 - Ajouter 0,5ml de tampon RIPA/tube
 - Incuber 3min / 4°C / agitation
 - Mettre le tube sur le portoir magnétique et attendre que le surnageant soit clair
 - Eliminer le surnageant (il reste un culot de billes)

▪ Séparer le complexe bille-Ac-Ag

- Préparer un tampon Laemmli 2X à 100mM de DTT
- En ajouter 10µl sur chaque culot de billes
- Vortexer
- Dénaturer les protéines 5min / 95°C
- Vortexer
- Culoter les billes sur le portoir magnétique
- Transférer le surnageant (bleu) dans un nouveau tube

▪ Séparation des protéines par électrophorèse (cf Protocole de Western Blot)

▪ Transfert des protéines (cf Protocole de Western Blot)

▪ Identification des protéines : identique au Protocole de Western Blot mais avec l'anticorps secondaire Abcam ref ab131366 au 1/500^e qui limite la détection des IgG immunoprécipitées

▪ Interprétation des résultats :

- Validation de l'anticorps anti-RCP utilisé pour immunoprécipitation : une bande RCP positive doit apparaître pour l'input et le contrôle positif, et aucune bande pour le contrôle négatif
- Une bande RCP positive doit apparaître pour tous les échantillons.
- La présence d'une bande positive pour un autre anticorps indique les protéines complexées à RCP dans le lysat protéique initial.

VI. Techniques d'histologie et d'imagerie

1. Inclusion en paraffine des échantillons

Les résultats d'histologie et immunofluorescence ont tous été obtenus à partir de tissu fixé puis inclus en paraffine.

Après prélèvement et fixation de la peau (cf section I.8.b), les échantillons ont été inclus en paraffine et découpés par le laboratoire Novotec.

Des coupes transversales de 5µm ou de 30µm sont réalisées au microtome sur lames histologiques non traitées pour les colorations histologiques et traitées pour les immunomarquages.

2. Coloration histologique à l'hématoxyline-éosine-safran (HES)

La coloration HES permet de distinguer, grâce aux différents colorants, les différentes structures (épiderme, derme ...) et types cellulaires (noyau mono/pluricellulaire, coloration du cytoplasme) de la peau. Les éléments matriciels apparaissent en jaune-rosé, le cytoplasme en rose et les noyaux en violets.

Dans ce mémoire, excepté les photos d'HES de la figure 31, toutes les colorations et photos présentées ont été réalisées par le laboratoire Novotec. Le protocole de coloration HES utilisé pour la figure 31 est le suivant.

Protocole :

- Procéder au déparaffinage et à la coloration des coupes dans ces bains successifs :

<u>Bain</u>	<u>Durée</u>
Méthylcyclohexane	2 bains de 3 min
Ethanol 100%	3 min
Ethanol 70%	3 min
Eau du robinet	3 lavages de 3 min
Hématoxyline de Mayer (Dako)	3 min
Eau du robinet	2 lavages de 3 min
Eosine Aqueuse de Shandon (Thermo Scientific)	5 min
Eau du robinet	2 lavages de 3 min
Ethanol 70%	3 min
Ethanol 100%	3 min
Safranin-O (Sigma-Aldrich)	5 min
Ethanol 100%	2 bains d'1 min
Méthylcyclohexane	3 min

- Mettre une goutte de milieu de montage Mountex (Microm) et placer une lamelle
- Faire sécher les lames à 37°C / 24h avant toute observation
- Conserver les lames à TA / obscurité

3. Marquage immunofluorescent

La technique d'immunofluorescence (IF) permet de mettre en évidence la localisation et l'intensité d'expression de certaines protéines dans un tissu.

Protocole :

- Procéder au déparaffinage et à la réhydratation des coupes dans ces bains successifs :

Bain	Durée
Méthylcyclohexane	3 bains de 5 min
Méthylcyclohexane/Ethanol 1:1	5 min
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 70%	5 min
PBS	2 bains de 5 min

- Étape optionnelle (selon l'anticorps primaire) de démasquage d'antigène :
 - Immerger les lames dans du PBS à 0.1% Triton
 - Rincer les lames 2 fois 5min au PBS
 - Immerger la lame dans un tube contenant du tampon citrate pH6 à température ambiante
 - Incuber le tube 20 min / 95°C
 - Incuber le tube 20 min/ eau froide
 - Rincer les lames 3 fois 5min au PBS
- Saturer les coupes :
 - Préparer le tampon de blocage : PBS contenant 5% BSA et 10% sérum de chèvre
 - Encercler les échantillons au Feutre hydrophobe (Dakopen)
 - Mettre le tampon (~150µL/cercle)
 - Incuber 1h / RT / chambre humide
- Incuber avec l'anticorps primaire :
 - Préparer la solution d'anticorps primaire (cf Tableau 5) dans du PBS
 - Déposer la solution dans les cercles
 - Incuber overnight / 4°C / chambre humide / obscurité
 - Rincer les lames 2 fois 5min au PBS
- Incuber avec l'anticorps secondaire (sauf si l'anticorps primaire utilisé était déjà couplé) :
 - Préparer la solution d'anticorps secondaire (cf Tableau 5) dans du PBS
 - Déposer la solution dans les cercles
 - Incuber 1h / RT / chambre humide / obscurité
 - Rincer les lames 3 fois 5min au PBS
- Marquage des noyaux cellulaires au DAPI (Thermo Scientific, ref 10184322)
 - Déposer une solution à 2µg de DAPI/ml PBS dans les cercles
 - Incuber 5min / RT / chambre humide / obscurité
 - Rincer les lames 3 fois 5min au PBS
- Mettre une goutte de milieu de montage (Thermo Scientific, ref 11559306) et placer une lamelle
- Faire sécher 4h / TA / obscurité
- Conserver les lames à plat à 4°C / obscurité

Tableau 5. Liste des anticorps utilisés pour la détection des protéines par immunofluorescence

	Protéine détectée	Fournisseur	Référence	Dilution	Démasquage ?
Anticorps primaires	CGRP	Cell signaling	14959	1/200	
	CLR	Abcam	ab140761	1/100	Oui
	Filaggrine	Abcam	ab24584	1/500	
	Involucrine	Abcam	ab53112	1/500	
	Kératine 10	Abcam	Ab76318 [EP1607IHCY]	1/250	
	Kératine 14	Abcam	ab181595 [EPR17350]	1/500	
	Périostine	Abcam	ab14041	1/50	
	PGP 9.5	Abcam	ab108986	1/300	
	RAMP1 (couplé Alexa Fluor 594)	Abcam	ab241335 (correspond à la référence ab203282 couplée)	1/100	Oui
Anticorps secondaire	Rabbit IgG (couplé Alexa Fluor 647)	Abcam	ab150079	1/500	
Couplage d'anticorps primaire	Cy5 Fast conjugation Kit	Abcam	ab188288		

Les anticorps disponibles pour l'immunofluorescence sur tissu de souris sont peu nombreux et viennent très souvent de lapin. Il a donc été nécessaire de coupler nous-même un anticorps pour permettre le co-marquage. Ainsi l'anticorps anti-CLR a été couplé à la Cyanin5 (émettant dans le rouge lointain) grâce au kit Abcam (cf. Tableau 5) selon les instructions du fournisseur.

4. Observations microscopiques

Les photos de coloration HES ont été obtenues à l'aide du microscope optique Leica DM2000 piloté par le logiciel d'acquisition d'image LAS.

Les photos d'immunofluorescence ont été obtenues à l'aide du microscope confocal inversé Nikon Eclipse Ti-E piloté par le logiciel d'acquisition d'image NIS-Element.

VII. Analyses statistiques

Les résultats de ce travail de thèse sont exprimés en moyenne \pm écart-type ou en médiane (précisé en légende de chaque graphique).

La représentation graphique et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 6.01).

Le MultiTest T paramétrique a été utilisé pour comparer les 4 groupes à chaque point de cinétique.

Le test d'analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs avec comparaisons multiples a été utilisé pour comparer simultanément des résultats de plusieurs variables (contrôle/diabète, et 4wk/8wk ou plusieurs points de cinétiques)

Les différences à la moyenne sont considérées comme significatives quand $p < 0,05$, et seront notées sur les graphiques avec ns si non significatif, * si $p < 0,05$, ** si $p < 0,01$, et *** si $p < 0,001$.

TRAVAIL de THÈSE

I. Mise en place des modèles de souris diabétique neuropathique, d'ulcère de pression, et d'un outil d'évaluation de la cicatrisation

1. Validation du modèle de souris diabétique avec deux degrés d'atteinte neuropathique

Afin d'étudier l'impact de la neuropathie diabétique et de sa sévérité sur la fragilité de la peau avant lésion et la cicatrisation après induction d'un ulcère de pression, nous avons induit un diabète de Type 1 chez des souris et évalué les durées de diabète nécessaires à l'obtention d'une atteinte neuropathique des petites fibres nerveuses sans et avec atteinte des grosses fibres nerveuses.

Matériels et méthodes

Des souris C57Bl6 ont reçu une injection soit de tampon citrate (groupes contrôles), soit de streptozotocine (STZ) (groupes diabétiques). La glycémie, le poids, la durée de réaction au test Tail Flick (sensibilité à la chaleur douloureuse), l'IENF (densité de fibres nerveuses intra-épidermiques) sur la peau du bas du dos, et la MNCV (vitesse de conduction nerveuse du nerf sciatique) ont été évalués. Seules les souris ayant une glycémie > 400mg/dl 48h post-injection de STZ ont été incluses dans les groupes diabétiques.

Détails des matériels et méthodes consultables page 69.

Dans la suite de ce mémoire, les groupes contrôles (C) et diabétiques (D) à 4 (4wk) et 8 (8wk) semaines après injection sont appelés : C4wk, C8wk, D4wk et D8wk.

Résultats

Dans les groupes diabétiques, on observe un maintien de l'hyperglycémie après 4 et 8 semaines et une perte de poids progressive, alors que les souris contrôles gardent une glycémie constante et prennent du poids au cours des semaines (Figure 29).

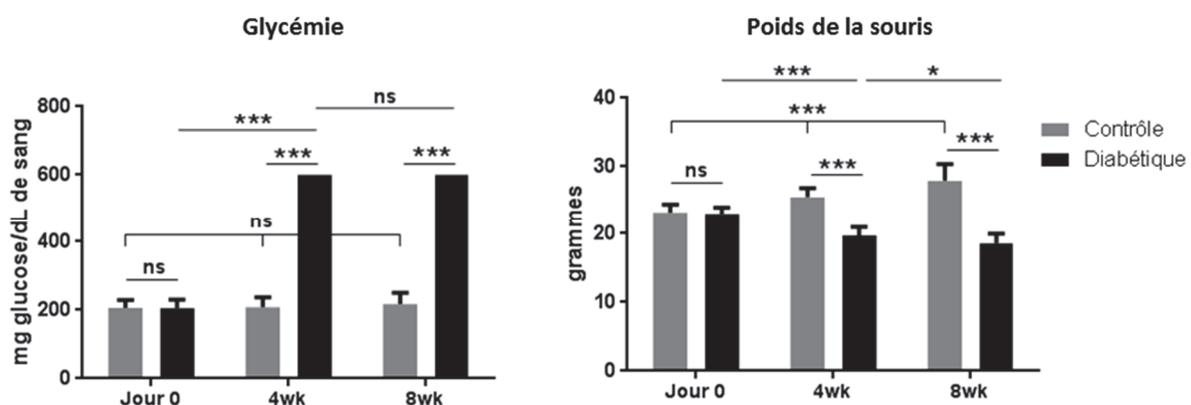


Figure 29. Évolution de la glycémie et du poids des souris contrôles et diabétiques.

Le jour 0 correspond au matin avant injection. Moyenne ± écart-type de n = 20 souris par groupe et point de cinétique. ANOVA à 2 facteurs.

Les D4wk présentent une diminution de l'IENF (Figure 30 A et B) et une diminution du temps de réaction au Tail Flick (hyperalgésie) (Figure 30 C), mais sans modification de la

MNCV (Figure 30 D), comparativement aux souris contrôles, démontrant une atteinte des petites fibres nerveuses uniquement.

Les D8wk présentent une diminution de l'IENF (Figure 30 A et B), du temps de réponse au Tail Flick (Figure 30 C) et de la MNCV (Figure 30 D), comparativement aux souris contrôles. Ces résultats illustrent une atteinte des petites et grosses fibres nerveuses.

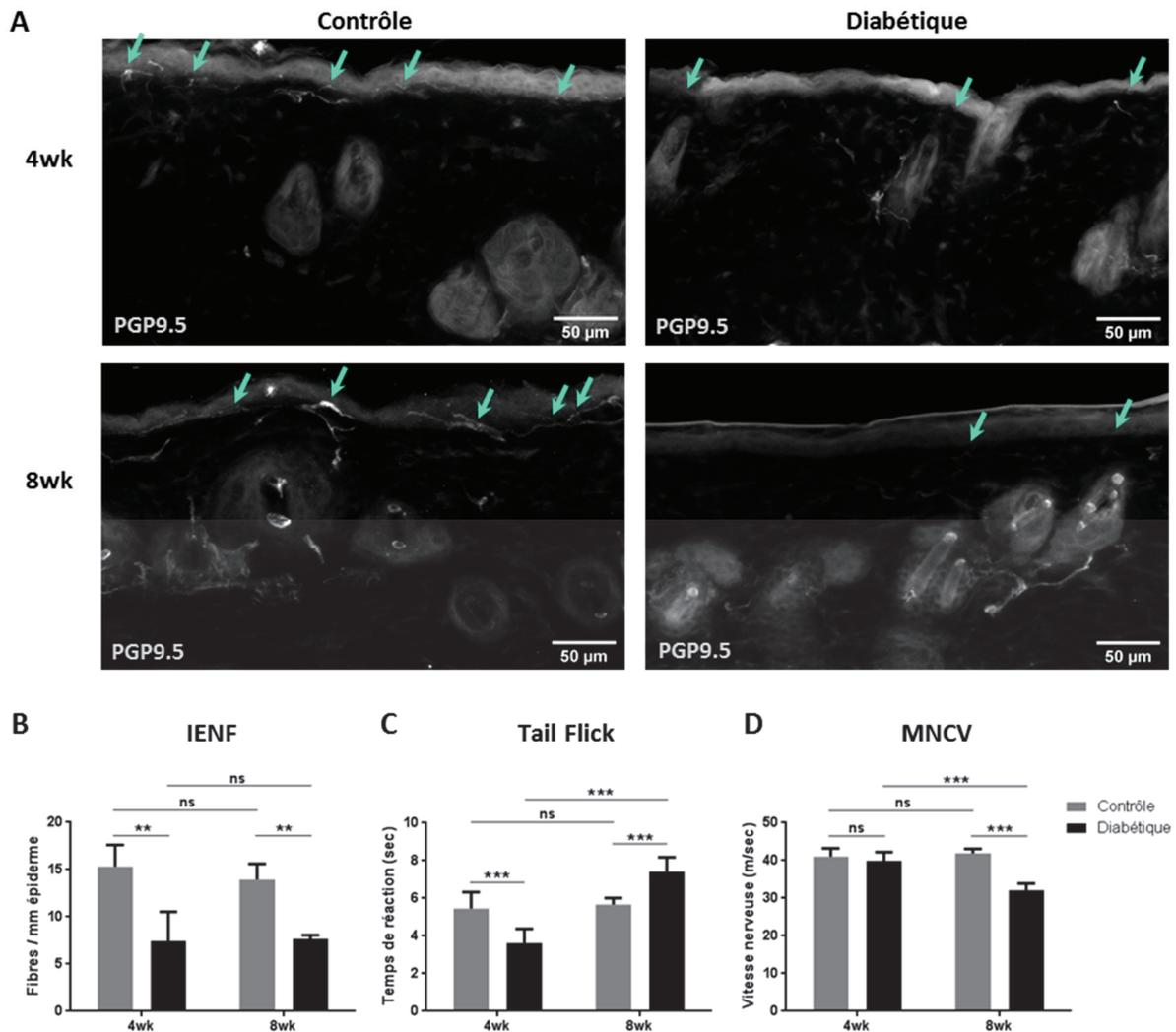


Figure 30. Évaluation de l'atteinte nerveuse chez les souris diabétiques à 4 et 8 semaines, comparativement aux souris contrôles du même âge.

A/ Immunomarquage représentatif des fibres nerveuses cutanées par un anticorps anti-PGP9.5 réalisé sur la peau dorsale. Les flèches indiquent celles traversant l'épiderme et comptabilisées pour l'IENF. B/ Densité en fibres nerveuses intraépidermiques (IENF). n = 3 souris par condition. C/ Latence de réaction au test « Tail Flick » utilisant la chaleur douloureuse appliquée à la surface de la queue de la souris. n = 10 souris par condition. D/ Vitesse de conduction nerveuse mesurée sur le nerf sciatique (MNCV). n = 8 à 10 souris par condition. Pour B, C et D/ Moyenne ± écart-type. ANOVA à 2 facteurs.

Conclusion

D'après « The study group of Neurodiab » [Biessels *et al.* 2014], l'évaluation d'atteinte nerveuse chez le rongeur nécessite une mesure comportementale de la fonction nerveuse (ici le Tail Flick), une mesure histologique des fibres nerveuses (ici l'IENF), et une mesure électrophysiologique (ici sur la MNCV sur nerf sciatique). La neuropathie est définie lorsque au moins 2 des 3 paramètres sont statistiquement différents entre groupes contrôle et diabétique. Ainsi les D4wk présentent une neuropathie modérée (petites fibres uniquement), et les D8wk une neuropathie sévère (petites et grosses fibre nerveuses), comparativement aux groupes

contrôles.

On observe une disparition partielle des petites fibres nerveuses épidermiques à 4 semaines, qui n'évolue pas à 8 semaines malgré une atteinte additionnelle des grosses fibres nerveuses.

Les souris diabétiques à 4 semaines présentent une hyperalgésie à la chaleur, démontrant une hypersensibilité des nocicepteurs thermiques, alors qu'à 8 semaines on observe une augmentation de la durée de réaction. Cette latence à 8 semaines peut être liée à une baisse de sensibilité des nocicepteurs thermiques cutanés ou à la lenteur de conduction nerveuse.

2. Développement d'un modèle d'induction d'ulcère de pression chez la souris

Afin d'étudier l'impact de la neuropathie diabétique et de sa sévérité sur la cicatrisation des ulcères de pression, ces lésions ont dû être induites, avec une atteinte de l'épiderme, du derme, du tissu adipeux et du muscle cutané.

Matériels et méthodes

Nous nous sommes inspirés d'une méthode non invasive, peu onéreuse et facile à mettre en place au laboratoire publiée par Stadler et collaborateurs sur souris non pathologique [Stadler *et al.* 2004], utilisant des aimants pour compresser un pli de peau du dos. Différentes variables ont été testées sur souris contrôles et diabétiques ($n \geq 3$ par condition), notamment :

- La durée de compression (2, 3, 4 ou 6 h),
- Le temps de reperfusion en cas de cycle de compression (15min, 30min, 1h ou 24h),
- La souche de souris (C57Bl/6JRj ou Swiss),
- L'anesthésie (gaz isoflurane) ou non (en vigile) de la souris lors de la pose d'aimants,
- L'ajout d'une friction à l'aide d'un coton-tige, avec/sans ajout d'un film adhésif (retiré quelques jours après la dernière compression).

Résultats

En l'absence de friction, la lésion cutanée maximale obtenue (Figure 31) chez souris (C57Bl/6JRj ou Swiss) contrôles et diabétiques (avec les mêmes conditions de pression) est caractérisée par une atteinte en profondeur avec dégradation du muscle et infiltration de cellules immunitaires, et un épaissement du derme et de l'épiderme. Cependant, seules les souris contrôles présentent en plus une détérioration de la matrice extracellulaire et de l'épiderme, visibles macroscopiquement.

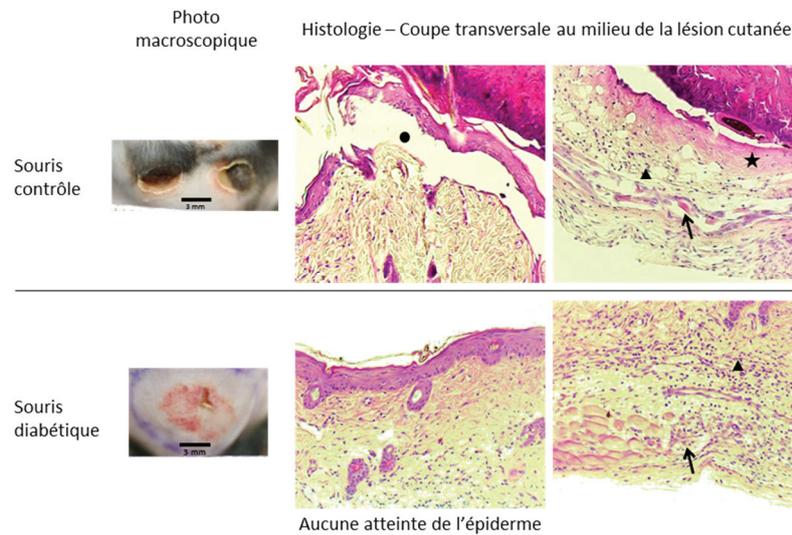


Figure 31. Photos macroscopiques des lésions maximales obtenues à J5 chez souris contrôles et diabétiques après induction par compression seule, et photos des coupes histologiques colorées à l'HES. Les paramètres d'induction étaient ici les mêmes pour les deux groupes de souris (souche C57Bl/6JRj, 1 cycle de 6h de compression avec pose des aimants sous isoflurane). Le rond noir indique l'atteinte de l'épiderme ; l'étoile, la dégradation de la matrice extracellulaire ; le triangle, l'infiltration leucocytaire en profondeur ; la flèche, le muscle cutané endommagé.

L'effet de l'ajout d'une friction après la période de compression a également été évalué. Cependant, afin d'éviter l'interférence du léchage de la peau par les souris (qui crée une légère friction), un film adhésif transparent (Film Optiskin des Laboratoires Urgo) a été posé ou non sur la zone compressée. La friction a été réalisée sur la zone compressée de droite.

On observe que chez la souris contrôle, la zone protégée par le film, malgré la compression, ne développe pas de lésion visible en surface (Figure 32 zone b). Sans le film ou bien avec film + friction (Figure 32 zones a et c), une lésion visible en surface se développe. Chez la souris diabétique, la compression seule (avec ou sans film), ne permet le développement que d'une rougeur sans nécrose de l'épiderme (Figure 32 zone d et f). Lorsque la zone compressée est frictionnée, qu'il y ait film ou non (Figure 32 zones e et g), une lésion avec nécrose apparaît en surface.

Chez souris contrôles et diabétiques, la zone compressée et frictionnée avec film était très humide au retrait du film, démontrant une altération de la barrière épidermique.

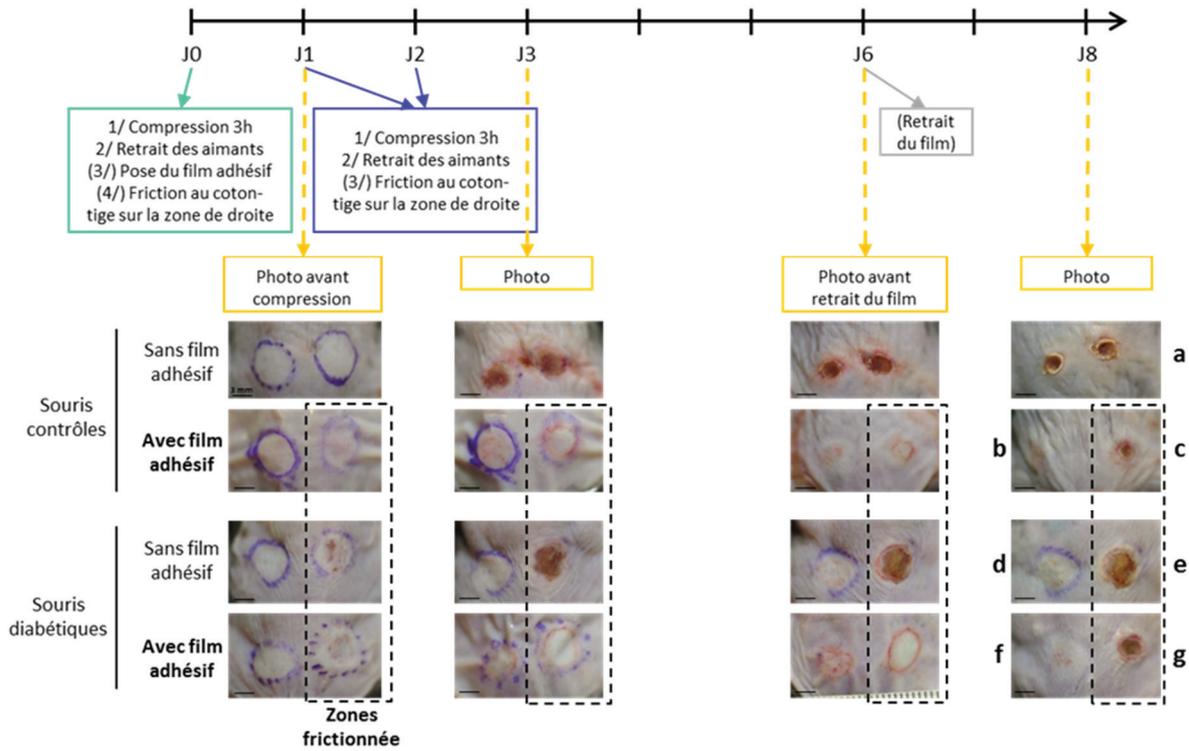


Figure 32. Photos macroscopiques de l'évolution des lésions de pression avec/sans film, avec/sans friction chez souris contrôles et diabétiques.

Les zones de lésion notées de a à g sont référencées dans le texte.

Suite à ces observations, le protocole a été optimisé en retirant le film à J3, soit 24h après la dernière compression. La force de la friction a également été mesurée, et estimée entre 30 et 50g. Le protocole a été réalisé, par 5 autres expérimentateurs, sur un total de plus de 50 souris par groupe diabétique ou contrôle, et a montré robustesse et reproductibilité, avec atteinte de l'épiderme jusqu'au muscle cutané chez les deux groupes de souris (Figure 33).

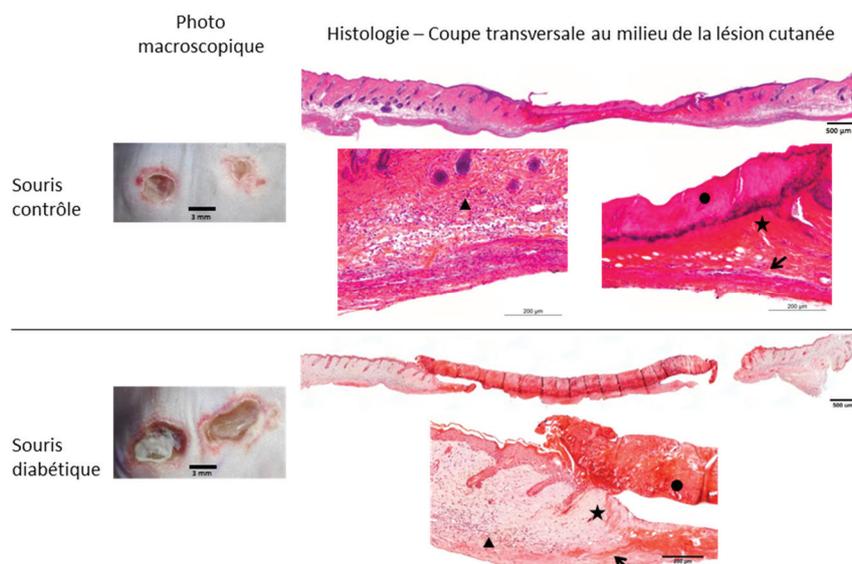


Figure 33. Photos macroscopiques des lésions obtenues à J5 chez souris contrôles et diabétiques avec le modèle d'induction d'ulcère de pression breveté, photo des coupes histologiques colorées à l'HES. Les lésions cutanées ont été induites par pression + friction + film adhésif, selon le protocole breveté. Le rond noir indique l'atteinte de l'épiderme ; l'étoile, la dégradation de la matrice extracellulaire ; le triangle, l'infiltration leucocytaire en profondeur ; la flèche, le muscle cutané endommagé.

Conclusion

Le protocole combinant la pression, la friction et le film adhésif a permis l'induction d'un ulcère de pression grade 3-4 (perte d'épiderme/derme/tissu adipeux et dégradation du muscle cutané [Edsberg *et al.* 2016]) chez souris contrôles et diabétiques.

Comparativement aux modèles existants d'induction d'ulcère de pression chez la souris, ce modèle reproduit davantage les facteurs physiques à l'origine de la lésion de pression du pied diabétique. C'est pourquoi, il fait l'objet d'un **brevet intitulé « Modèle pour l'évaluation de traitements pour la cicatrisation des ulcères de pression », déposé le 12 juin 2018 à l'INPI, suivi d'une demande d'extension internationale déposée le 11 juin 2019**. La copie de cette dernière demande est consultable en Annexe 3 page 214.

Les résultats de l'étude de la cicatrisation de l'ulcère de pression présentés dans ce mémoire ont été réalisés avec le modèle breveté.

3. Développement d'un outil d'aide à l'évaluation visuelle de la fermeture d'une lésion chez la souris

Afin d'étudier l'impact de la neuropathie diabétique et de sa sévérité sur le processus de cicatrisation, il est important de pouvoir déterminer le jour de « fermeture » de la lésion. Cependant, il n'existe pas de consensus sur la méthode permettant d'évaluer la fermeture d'une lésion pour les études expérimentales chez l'animal. Selon les publications, la cicatrisation peut être évaluée macroscopiquement (surface de lésion) ou histologiquement (espacement entre les bords du néoépiderme), cette fermeture ne correspondant en aucun cas à la fin réelle de la cicatrisation, car le remodelage peut durer plusieurs mois.

Pendant ma thèse, afin de limiter le nombre d'animaux sacrifiés, dans un premier temps, le choix a été fait d'évaluer macroscopiquement la lésion. Cependant, après le décollement de la nécrose, il est très difficile d'évaluer exactement le jour de fermeture (Jf) (lorsque la lésion semble « guérie »), notamment car il reste très souvent une petite surface cicatricielle qui diminue peu/pas mais dont la couleur et l'aspérité de surface peuvent être différentes entre les animaux.

De plus, l'évaluation peut être sujette à variation et subjectivité selon le type de lésion et l'aspect de la peau avec le diabète, mais surtout avec le degré d'expertise en évaluation de la cicatrisation cutanée de l'expérimentateur. Cela peut aboutir, lors d'analyses ultérieures des prélèvements à Jf, à des variabilités biologiques davantage liées à des stades cicatriciels différents qu'à la pathologie elle-même. J'ai donc proposé une grille d'évaluation visuelle des lésions avec paramètres gradués afin d'être plus objectifs et unanimes sur la définition du jour de fermeture d'une plaie. Les critères pour estimer une plaie visuellement fermée ont été définis à l'aide de volontaires, puis la validité biologique de ces critères a été analysée.

Matériels et méthodes

La grille proposée, appelée « CRoMT » (cf. Matériels et Méthodes Figure 25 page 80) comprend les paramètres suivant :

- C pour Couleur de la lésion (*color*) graduée de 0 à 3
- Ro pour Rugosité (*roughness*) graduée de 0 à 2
- M pour Moiteur (*moistness*) graduée de 0 à 2
- T pour Total, qui correspond à la somme des grades des autres paramètres (C + R + Mo), est graduée de 0 à 7.

- L'ensemble donne le score CROMT de la lésion (ex : 3125 pour C=3, Ro=1, M=2 et T=5).

L'objectivité de l'évaluation visuelle d'une lésion à l'aide de la grille ainsi que les critères visuels d'une lésion « fermée » ont été définis à l'aide des réponses du Panel A, comprenant des experts et non-experts en évaluation de la cicatrisation, obtenues sur une série de 30 photos de lésions de souris (Étude A). Le sous-groupe d'experts a également dû répondre à la question « la lésion est-elle fermée selon vous ? Oui / Non » pour chaque photo.

La validité biologique de ces critères a été estimée à l'aide de 20 nouvelles lésions de souris (Étude B), graduées visuellement par le panel B (experts et non-experts différents du Panel A), et évaluées histologiquement (réépidermisation et marqueurs de différenciation épidermique) par un laboratoire indépendant (Novotec).

Détails des matériels et méthodes consultables page 80.

Résultats

Objectivité de l'évaluation de la lésion avec la grille (Panel et Étude A)

L'analyse statistique ANOVA à 2 facteurs n'a pas montré de différence de réponse entre les sous-groupes experts et non-experts pour les différents paramètres de la grille (Couleur $p=0.6027$, Rugosité $p = 0.4145$, Moiteur $p = 0.2342$, et Total $p = 0.8976$). Ceci démontre que le degré d'expertise en évaluation de la cicatrisation cutanée n'influence pas le score donné à une lésion à l'aide de la grille.

Définition des critères visuels d'une lésion fermée (Panel et Étude A)

Les scores médians du Panel A (experts et non experts confondus) pour les 30 photos de l'Étude A et le pourcentage d'experts estimant la lésion fermée sont présentés dans le Tableau 6. Lorsqu'au moins 80% des experts ont répondu « Oui » à la question (zone grisée foncée dans le tableau), les scores pour les paramètres étaient de 0 à 1 pour la Couleur, la Rugosité et le Total, et de 0 pour la Moiteur.

Pour les photos ayant reçu les scores ci-dessus pour les paramètres C, R et Mo mais avec un Total de 2 (zone grisée claire dans le tableau), le nombre d'experts estimant la lésion fermée chute (entre 11 et 61%). Nous avons donc défini que les critères d'évaluation visuelle d'une lésion fermée chez la souris devait respecter la combinaison suivante :

$$\mathbf{C = 0,1 ; Ro = 0,1 ; M = 0 ; T = 0,1.}$$

Tableau 6. Scores médians donnés par le Panel A aux photos de lésion de l'Étude A, et pourcentage d'experts estimant la lésion fermée.

Les scores aux paramètres C, R, M et T sont les médianes des réponses confondues des experts et non experts du Panel A. Le pourcentage correspond au nombre d'expert estimant la lésion présentée sur la photo correspondante comme fermée.

Picture n°	Color score	Roughness score	Moistness score	Total score	% of "Yes"
3	3	2	2	7	0%
8	3	2	2	7	0%
12	2	2	2	6	0%
17	3	2	2	7	0%
1	3	2	1	6	0%
14	3	2	1	6	0%
5	3	2	0	5	0%
6	2	2	1	5	0%
7	3	2	1	6	0%
16	3	2	0	5	0%
19	3	2	0	5	0%
28	3	2	1	6	0%
23	3	2	0	5	0%
10	3	2	0	5	6%
25	3	1	0	4	11%
24	1	1	0	2	11%
15	1	1	0	2	39%
21	1	1	0	2	56%
20	1	0	1	2	61%
2	0	0	0	0	83%
30	0	1	0	1	89%
18	0	0	0	0	89%
22	0	0	0	0	94%
13	1	0	0	1	100%
27	1	0	0	1	100%
4	0	0	0	0	100%
9	0	0	0	0	100%
11	0	0	0	0	100%
26	0	0	0	0	100%
29	0	0	0	0	100%

Sensibilité et spécificité des critères visuels définis pour l'identification des lésions réépithélialisées (Panel et Étude B)

Après avoir défini les critères permettant d'estimer visuellement et objectivement, en accord avec les experts, l'état fermé ou non d'une lésion, nous en avons en déterminé la signification biologique.

Les photos des lésions de l'Étude B, les scores CRoMT médians correspondants donnés par le Panel B, et l'évaluation histologique de la réépithélialisation sont présentés en Figure 34.

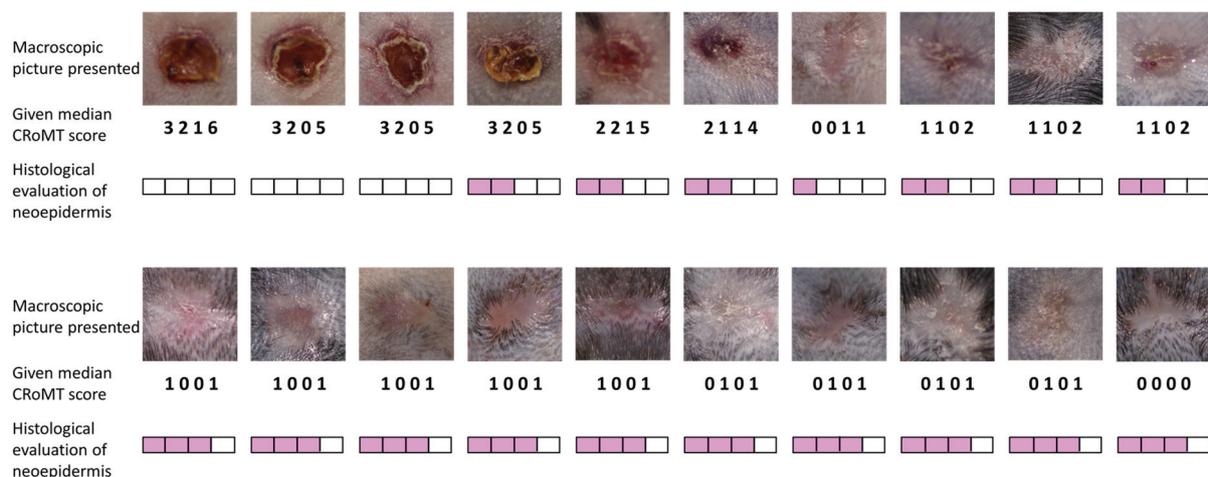


Figure 34. Photos des 20 lésions de l'Étude B, scores CRoMT médians donnés par le Panel B et évaluation histologique de la réépithélialisation par un laboratoire indépendant.

L'évaluation de la réépithélialisation va de 0 (tout blanc) correspondant à une absence de néoépiderme, 1 pour une réépithélialisation partielle, 2 pour une réépithélialisation totale avec néoépiderme épais mais non organisé, 3 pour une réépithélialisation totale avec néoépiderme épais et organisé, et 4 (tout rose) pour un épiderme normal.

Ces résultats ont permis d'estimer la sensibilité et la spécificité des critères visuels d'une lésion fermée à déterminer l'état de réépithélialisation (Tableau 7). Les paramètres C, Ro, M et T pris indépendamment permettent une détection de 100 % des lésions dont le néoépiderme recouvre la lésion et est organisé, mais avec une spécificité qui n'est pas totale. Seule la combinaison des paramètres et de leurs critères respectifs (C = 0,1 ; Ro = 0,1 ; M = 0 ; T = 0,1) permet une spécificité de 100% pour l'évaluation des lésions avec néoépiderme fermé et organisé.

Tableau 7. Spécificité et sensibilité de détection d'un néoépiderme fermé et organisé par les critères CRoMT défini d'une lésion visuellement fermée.

Les nombres dans les cellules du tableau correspondant à la somme des photos de l'Étude B respectant les critères indiqués.

Parameters	Criteria	Partial or total reepidermization but with unorganized epidermis	Total reepidermization with organized epidermis	Specificity	Sensibility
Color	Corresponding to defined criteria (C = 0 ; 1)	4	10	= 6/10	= 10/10
	Not corresponding to defined criteria (C = 2 ; 3)	6	0	= 60%	= 100%
Roughness	Corresponding to defined criteria (Ro = 0 ; 1)	5	10	= 5/10	= 10/10
	Not corresponding to defined criteria (Ro = 2 ; 3)	5	0	= 50%	= 100%
Moistness	Corresponding to defined criteria (M = 0)	6	10	= 4/10	= 10/10
	Not corresponding to defined criteria (M = 1 ; 2)	4	0	= 40%	= 100%
Total score	Corresponding to defined criteria (T = 0 ; 1)	1	10	= 9/10	= 10/10
	Not corresponding to defined criteria (T = 2 to 7)	9	0	= 90%	= 100%
CRoMT score	Corresponding to defined criteria: C=0;1 and Ro=0;1 and M=0 and T=0;1	0	10	= 10/10	= 10/10
	Not corresponding to defined criteria	10	0	= 100%	= 100%

Corrélation entre les critères visuels définis et l'état de différenciation du néoépiderme

Pour aller plus loin dans l'évaluation de l'état de réépithélialisation, des immunomarquages de protéines de différenciation épidermique ont été réalisés sur plusieurs lésions de l'Étude B (Figure 35).

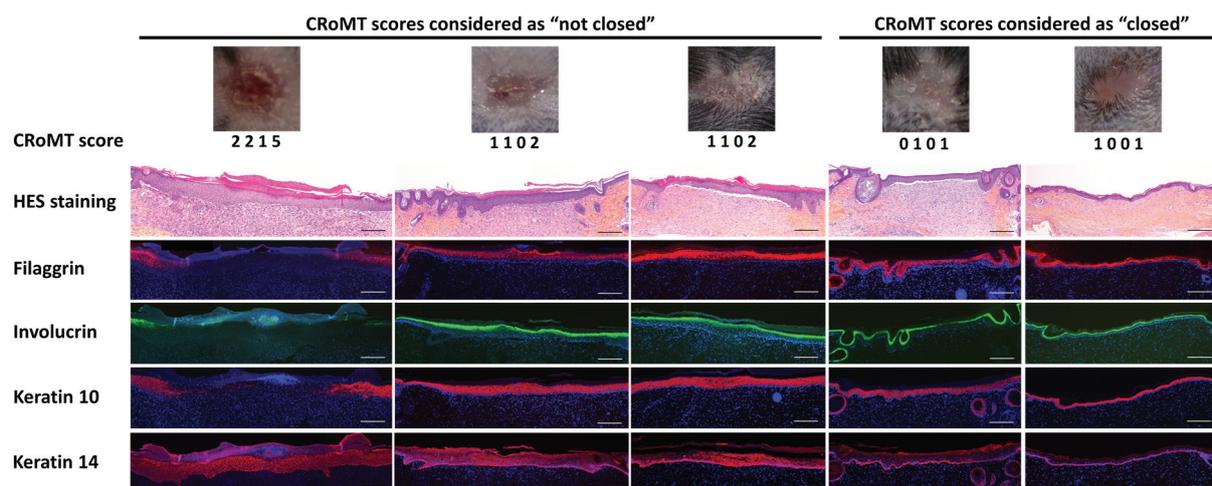


Figure 35. Scores CRoMT de lésions sur souris de l'Étude B, coupes histologiques correspondantes colorées à l'HES et immunomarquages de protéines de différenciation épidermique.

Les scores CRoMT indiqués sont les scores médians donnés par le Panel B. La filaggrine, la kératine 10 et la kératine 14 sont représentées en Rouge, l'involucrine est en vert. Les noyaux cellulaires ont été colorés en bleu. La barre d'échelle fait 500 µm.

Nous constatons que pour la lésion de gauche (score CRoMT 2215) (Figure 35), le néoépiderme, bien qu'il soit fermé, n'exprime pas la filaggrine, l'involucrine et la kératine 10

au milieu de la lésion ; et la kératine 14 est présente dans toutes les couches épidermiques.

Dans les deux lésions avec le score 1102, la kératine 10 et l'involucrine sont bien présentes dans les couches supérieures du néoépiderme ; la filaggrine est présente mais avec un marquage diffus au centre de la lésion ; et la kératine 14 est restreinte à la couche basale sur les bords externes du néoépiderme mais présente dans toutes les couches au centre de la lésion.

Dans les deux lésions de droite considérées comme fermées (0101 et 1001) d'après les critères CRoMT définis, l'involucrine et la kératine 10 présentent les mêmes localisations que pour la lésion avec le score 1102, mais la filaggrine n'est pas diffuse et est restreinte aux couches supérieures, et la kératine 14 est restreinte à la couche basale tout le long du néoépiderme.

Ainsi les critères CRoMT définis pour déterminer une lésion visuellement fermée seraient corrélés à un néoépiderme organisé et différencié dont la phase d'hyperprolifération kératinocytaire est terminée.

Conclusion

La grille paramétrée développée pendant ce travail de thèse permet une caractérisation visuelle objective d'une lésion chez la souris. La valeur des paramètres correspondant à une lésion visuellement fermée selon les experts en cicatrisation cutanée a été définie et ceci permet une identification avec 100% de spécificité et de sensibilité des lésions avec néoépiderme fermé, organisé et différencié, et semble être corrélée à la fin de la phase d'hyperprolifération des kératinocytes pendant la cicatrisation.

Ces résultats feront l'objet d'un article méthodologique qui pourrait être soumis dans le journal *Wound Repair and Regeneration*.

La première partie de ce travail de thèse a permis de définir les durées de diabète nécessaires à l'obtention de deux degrés de sévérité de neuropathie et de mettre au point le protocole pour l'obtention d'ulcères de pression, ce qui nous a permis par la suite d'analyser l'effet de la neuropathie sur la peau et sa fragilité à la pression, présenté dans la partie II. La validation de la grille CRoMT pour évaluer de manière robuste la durée de fermeture d'une lésion nous a quant à elle aidé à estimer l'influence de la sévérité de la neuropathie sur la durée de cicatrisation et les facteurs biologiques modifiés jusqu'au jour de fermeture, présentés dans la partie III.

II. Effet de la sévérité de la neuropathie diabétique sur la fragilité cutanée à la pression

La neuropathie périphérique associée au diabète prédispose au développement d'un ulcère du pied. Les causes évoquées sont la déformation du pied augmentant les pressions locales, la perte de sensation favorisant les situations à risque (caillou, friction), et une sécheresse cutanée. Cependant, la neuropathie est souvent diagnostiquée à un stade avancé (atteinte des petites et grosses fibres nerveuses), et il n'est pas connu si une neuropathie modérée (atteinte des petites fibres nerveuses uniquement) peut déjà favoriser une fragilité cutanée. Nous avons donc caractérisé la peau diabétique aux deux degrés de neuropathie, puis induit une lésion de pression pour observer sa gravité.

Matériels et méthodes

La structure (par histologie), l'hydratation superficielle (par cornéométrie), la lâcheté et l'élasticité (par cutométrie) de la peau non lésée du dos des souris contrôles et diabétiques ont été évaluées à 4 et 8 semaines.

Ensuite, des ulcères de pression ont été induits par la méthode brevetée sur souris contrôles et diabétiques à 4 et 8 semaines, et la surface cutanée lésée a été mesurée macroscopiquement.

Détails des matériels et méthodes consultables pages 74 et 76.

Résultats

Finesse épidermique dès 4wk de diabète et derme aminci à 8wk

On observe que l'épaisseur de la peau totale diminue chez les D4wk et s'aggrave chez les D8wk (Figure 36 A et B), alors que l'épaisseur de la peau des souris contrôles reste constante, bien que le tissu adipeux semble plus épais chez les C8wk que chez les C4wk.

Cet amincissement de l'épaisseur de la peau totale chez les D4wk ne semble pas lié à une diminution de l'épaisseur du derme, mais plutôt à la quasi-disparition du tissu adipeux (Figure 36 A et C). Après 8 semaines, l'épaisseur du derme est diminuée à la fois chez les souris contrôles et diabétiques, mais avec une plus forte baisse chez les D8wk.

L'épaisseur de l'épiderme quant à elle est diminuée avec le diabète à 4 et 8 semaines comparativement aux souris contrôles aux mêmes âges respectifs. On constate également une baisse de l'épaisseur de l'épiderme chez les contrôles entre 4 et 8 semaines.

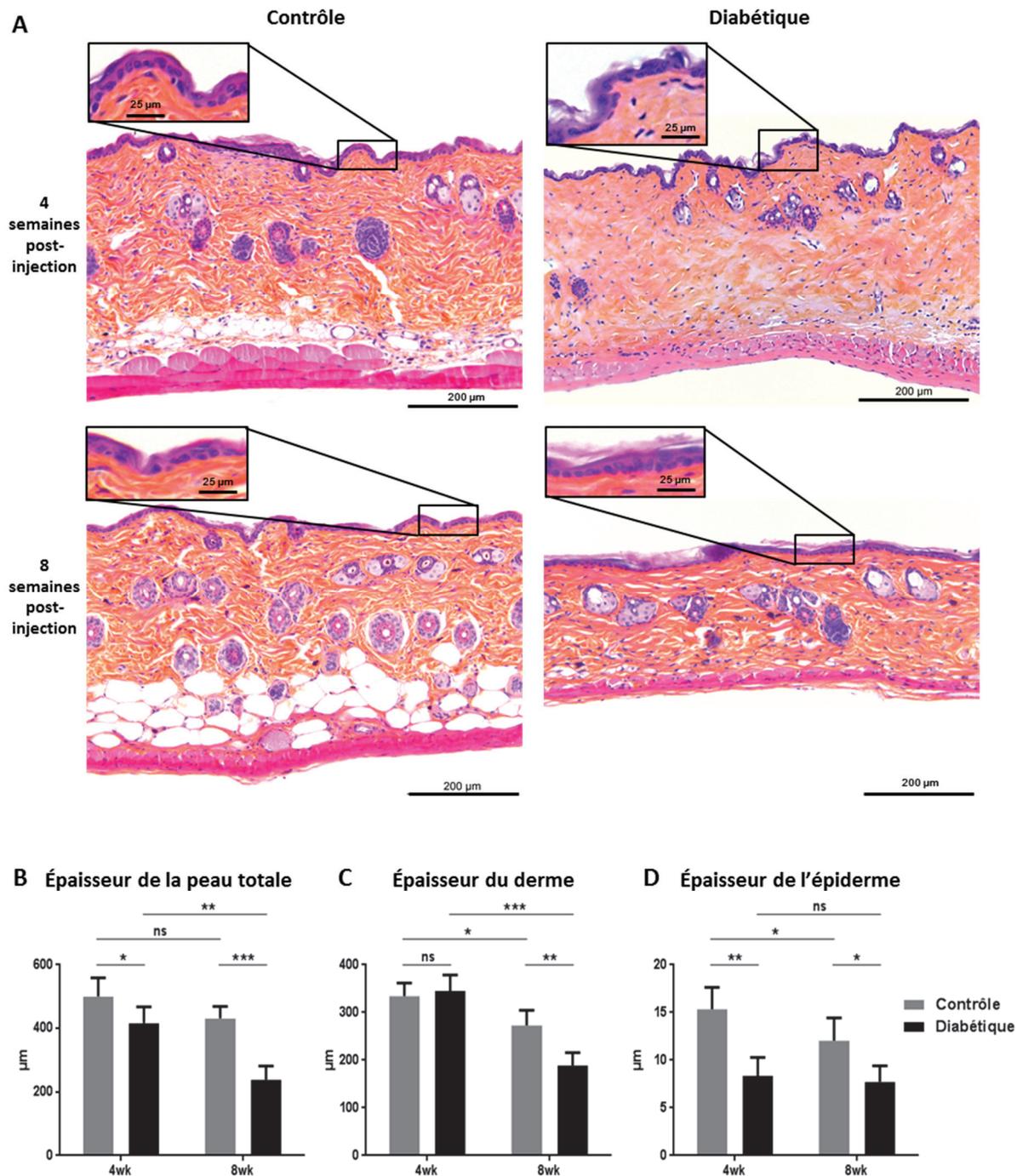


Figure 36. Caractérisation histologique de la peau des souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.

A/ Photos représentative de coupes de peau de souris colorées à l'HES. B/ Mesure de l'épaisseur de la peau totale, de l'épiderme au *Panniculus carnosus* inclus. C/ Mesure de l'épaisseur du derme. D/ Mesure de l'épaisseur de l'épiderme, excluant le *Stratum corneum*. Pour B, C et D/ n = 3 à 5 souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteur.

Sècheresse, lâcheté et baisse de l'élasticité cutanée à 4wk de diabète et aggravées à 8wk

Comme décrit dans l'état de l'art, l'hydratation de la peau et ses propriétés mécaniques à la déformation peuvent influencer la survenue d'ulcères de pression. Les D4wk présentent, comparativement aux C4wk, une diminution forte de l'hydratation superficielle cutanée (Figure 37 A), une augmentation de la lâcheté de la peau (Figure 37 B) et une moindre élasticité (Figure 37 C). Ces paramètres sont aggravés chez les D8wk.

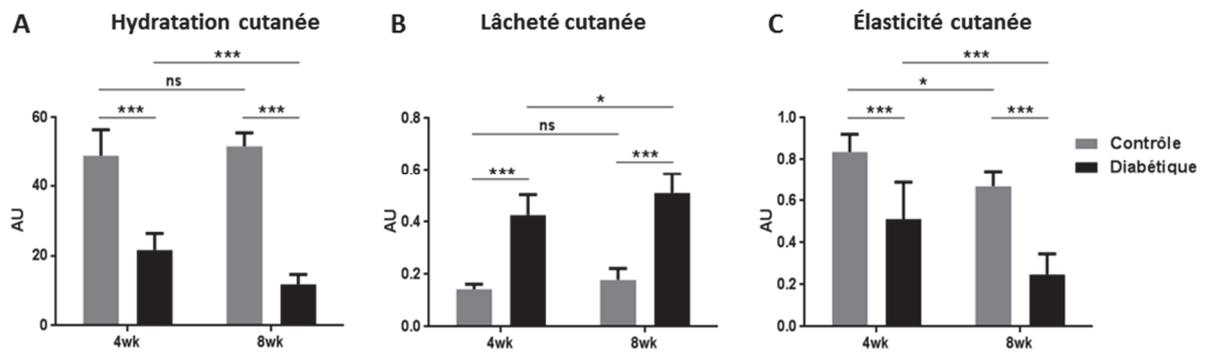


Figure 37. Caractérisation des propriétés mécaniques et d'hydratation de la peau des souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.

A/ Mesure de l'hydratation des couches supérieures de l'épiderme par cornéomètre. A et B/ Mesure de A/ la lâcheté cutanée et de B/ l'élasticité cutanées par cutométrie. Pour A, B et C/ n = 6 à 8 souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteurs.

Surface macroscopique de l'ulcère de pression plus étendue à 4wk de diabète et augmentée à 8wk

La compression de la peau du dos suivie d'une friction (réalisées conformément au protocole breveté) induit une lésion de pression dont la surface macroscopique maximale est atteinte à J5 dans tous les groupes (J0 correspond au premier jour de pose d'aimants) (Figure 38 A). On constate cependant que la surface n'est pas équivalente entre tous les groupes (Figure 38 A et B) : les deux groupes contrôles C4wk et C8wk développent des ulcères de pression de taille équivalente ($37,1 \text{ mm}^2 \pm 6,2$ et $37,4 \text{ mm}^2 \pm 9,0$ respectivement), les lésions chez les D4wk ($66,5 \text{ mm}^2 \pm 7,0$) sont 1,8 fois plus grandes que les C4wk, et celles chez D8wk ($85,0 \text{ mm}^2 \pm 7,5$) sont 2,3 fois plus grandes que chez les C8wk. La surface lésée est statistiquement plus élevée chez les D8wk que chez les D4wk à J5.

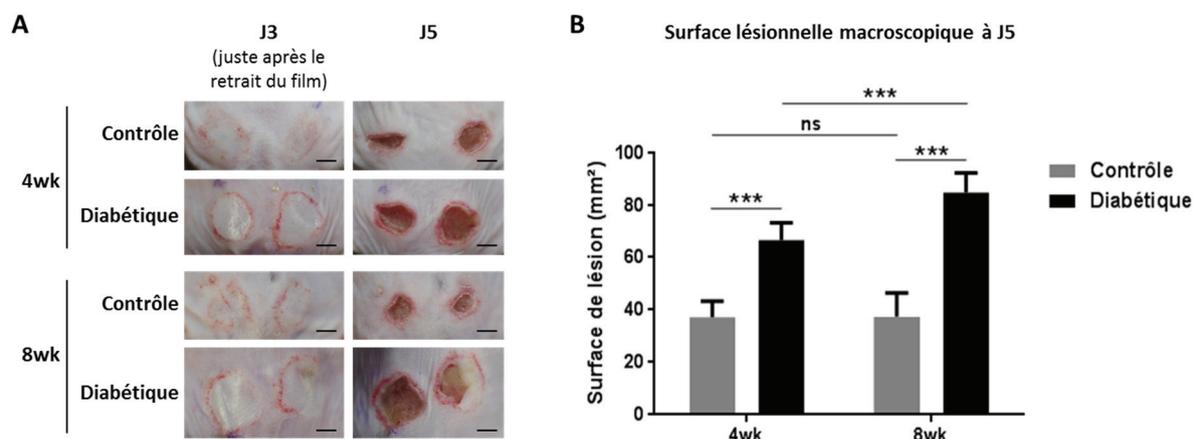


Figure 38. Photos macroscopiques des lésions de pression induites chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk et surfaces lésées maximales.

A/ Photos macroscopiques des lésions de pression à J3 et J5. J3 correspond à 72h après la première compression-friction et 24h après la dernière. La barre d'échelle représente 3 millimètres. 4wk et 8wk : lésions induites sur souris à 4 et 8 semaines. B/ Surface macroscopique de la lésion exprimée en mm^2 (somme des 2 zones lésées). n = 22 à 35 souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteurs.

Conclusion

Le diabète de type 1 induit une quasi-disparition de tissu adipeux qui contribue à la diminution de l'épaisseur de la peau totale après 4 semaines.

Le diabète et l'atteinte des petites fibres nerveuses épidermiques (D4wk) provoquent une

diminution de l'épaisseur de l'épiderme vivant, qui n'est pas aggravée par l'atteinte des grosses fibres nerveuses (D8wk). Cependant la sécheresse cutanée observée à 4 semaines de diabète s'accroît à 8 semaines.

Le diabète et l'atteinte des petites fibres nerveuses n'affectent pas l'épaisseur du derme, bien que les propriétés mécaniques soient altérées. Après 8 semaines de diabète (D8wk), l'épaisseur du derme et les propriétés mécaniques cutanées sont significativement altérées par rapport aux D4wk.

Bien que l'épaisseur de l'épiderme et du derme et l'élasticité soient légèrement diminuées avec l'âge (C4wk versus C8wk), ceci n'affecte pas la surface maximale lésée. On observe par ailleurs qu'il n'y a pas de différence d'hydratation, ni de lâcheté (déformation) cutanées entre ces groupes contrôles.

La surface maximale lésée est augmentée en présence du diabète et avec la sévérité de la neuropathie, alors que l'hydratation de la peau et sa capacité de résistance à la déformation sont diminuées.

On observe donc une fragilité cutanée à la pression/friction dès l'atteinte des petites fibres nerveuses avec le diabète, qui est aggravée par l'atteinte des grosses fibres nerveuses. La sécheresse cutanée croissante et la baisse progressive de la capacité de résistance à la déformation du tissu semblent participer à la fragilité grandissante.

Ainsi, ces résultats démontrent qu'au stade de la neuropathie diabétique modérée la peau est déjà fragilisée, ce qui pourrait participer à la survenue plus fréquente d'ulcères de pression chez les patients diabétiques neuropathiques.

III. Effet de la sévérité de la neuropathie diabétique sur la durée et le processus de cicatrisation de l'ulcère de pression

Après avoir induit la formation d'un ulcère de pression chez les souris contrôles et diabétiques, nous avons suivi la cicatrisation de cette lésion jusqu'à sa fermeture, afin de déterminer si la neuropathie diabétique et sa sévérité peuvent retarder la cicatrisation et quels sont les paramètres biologiques (histologiques et protéiques) modifiés.

1. Étude macroscopique et histologique jusqu'à fermeture d'un ulcère de pression avec la sévérité de la neuropathie diabétique

Dans cette première partie, nous avons étudié la durée de fermeture de l'ulcère de pression entre souris contrôles et diabétiques neuropathiques, ainsi que les cinétiques de cicatrisation et les caractéristiques histologiques respectives.

Matériels et méthodes

Les lésions ont été photographiées et évaluées selon les paramètres de la grille CRoMT. Le jour de fermeture (Jf) de la lésion a été déterminé lorsque la valeur médiane du groupe pour chaque paramètre correspondait aux critères définis précédemment ($C / Ro / T \leq 1$ et $M = 0$).

La surface lésionnelle jusqu'à fermeture a également été mesurée. Dans le but de pouvoir comparer les cinétiques, la surface à J5 étant différente entre les groupes, la surface lésée pour chaque animal a été exprimée en pourcentage de la surface moyenne du groupe à J5.

Des coupes ont été réalisées à partir de prélèvements des zones lésées à J5, J10 et Jf pour chaque groupe. L'analyse histologique a été faite par un laboratoire indépendant (Novotec).

Détails des matériels et méthodes page 78.

Résultats

La fermeture de l'ulcère de pression est retardée par le diabète et par la sévérité de la neuropathie

L'évolution des paramètres visuels de la grille CRoMT ont été évalués (Figure 39 A et B). Ceci a permis de déterminer que la fermeture (Jf) de la lésion intervient à J19 pour les C4wk et C8wk, et est retardée chez les groupes diabétiques à J23 pour les D4wk et à J27 pour le D8wk (Figure 39 B).

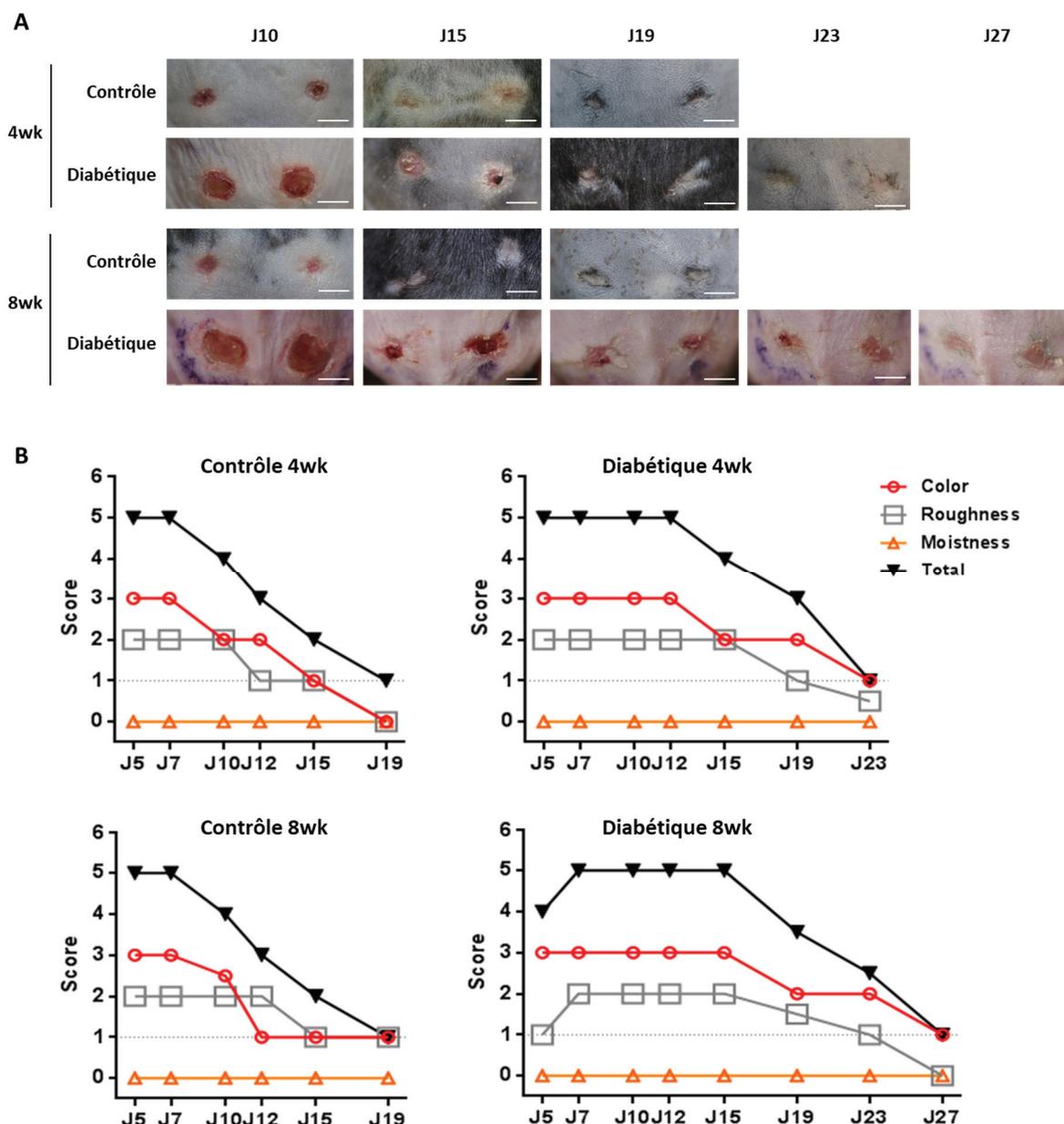


Figure 39. Evolution macroscopique des lésions de pression induites chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk et scores CRoMT correspondants.

A/ Photos macroscopiques des lésions de pression. La barre d'échelle représente 3 millimètres. 4wk et 8wk : lésions induites à 4 et 8 semaines post-injection. B/ Scores médians par groupes pour chaque paramètre de la grille CRoMT permettant de déterminer le jour de fermeture. n = 10 à 37 souris par condition.

Diminution de la surface lésée plus lente avec le diabète et la sévérité de la neuropathie

L'évolution de la surface lésionnelle a été mesurée jusqu'à fermeture visuelle (Figure 40 A). Les groupes contrôles C4wk et C8wk ne montrent aucune différence statistique jusqu'à Jf. Leur surface lésionnelle décroît rapidement entre J5 et J12, puis diminue avec une pente plus faible jusqu'à J19 (= Jf).

On observe également chez les diabétiques une phase de décroissance importante entre J5 et J15, bien que la surface relative soit plus élevée que chez les contrôles. Il n'y a pas de différence entre les deux groupes diabétiques sur cette période. À partir de J15, une phase de décroissance plus lente est visible chez les diabétiques, mais avec une surface relative significativement plus élevée chez les D8wk que chez les D4wk à J19 et J23.

La surface relative cicatricielle le jour de fermeture (respectif de chaque groupe) est statistiquement plus élevée avec le diabète et avec la sévérité de la neuropathie (Figure 40 B).

surplombe une petite zone de matrice hypercellularisée et une importante population inflammatoire entourant le muscle altéré.

Au jour de fermeture de la lésion chez les D4wk et les D8wk (J23 et J27, respectivement), la réépithélialisation est complète, avec un néoépiderme fin et organisé. La matrice cicatricielle sous-jacente s'est densifiée par rapport à J10, et est toujours relativement cellularisée. L'inflammation est réduite, excepté en profondeur où quelques cellules immunitaires sont localisées à proximités de fibres musculaires altérées.

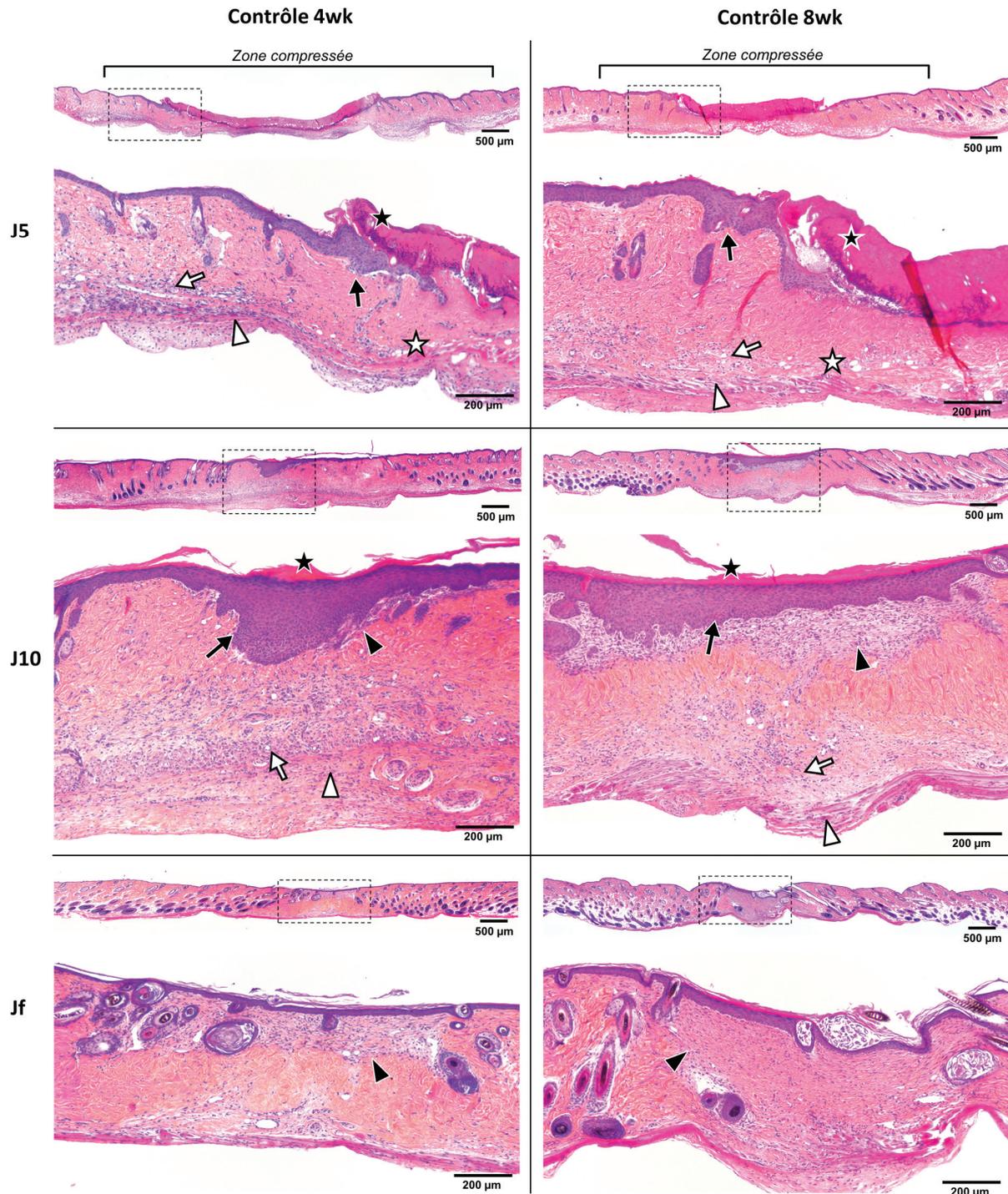


Figure 41. Évolution histologique des lésions de pression induites chez les souris contrôles 4wk et 8wk. Photos représentatives de coupes de peau au centre de la lésion de pression colorée à l'HES, avec zooms sur les zones cicatricielles. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les souris contrôles.

Étoile noire : zone nécrotique ; flèche noire : (néo)épiderme épaissi ; étoile blanche : tissu adipeux endommagé ; flèche blanche : infiltration de cellules immunitaires ; pointe blanche : muscle cutané endommagé ; pointe noire : matrice hypercellularisée.

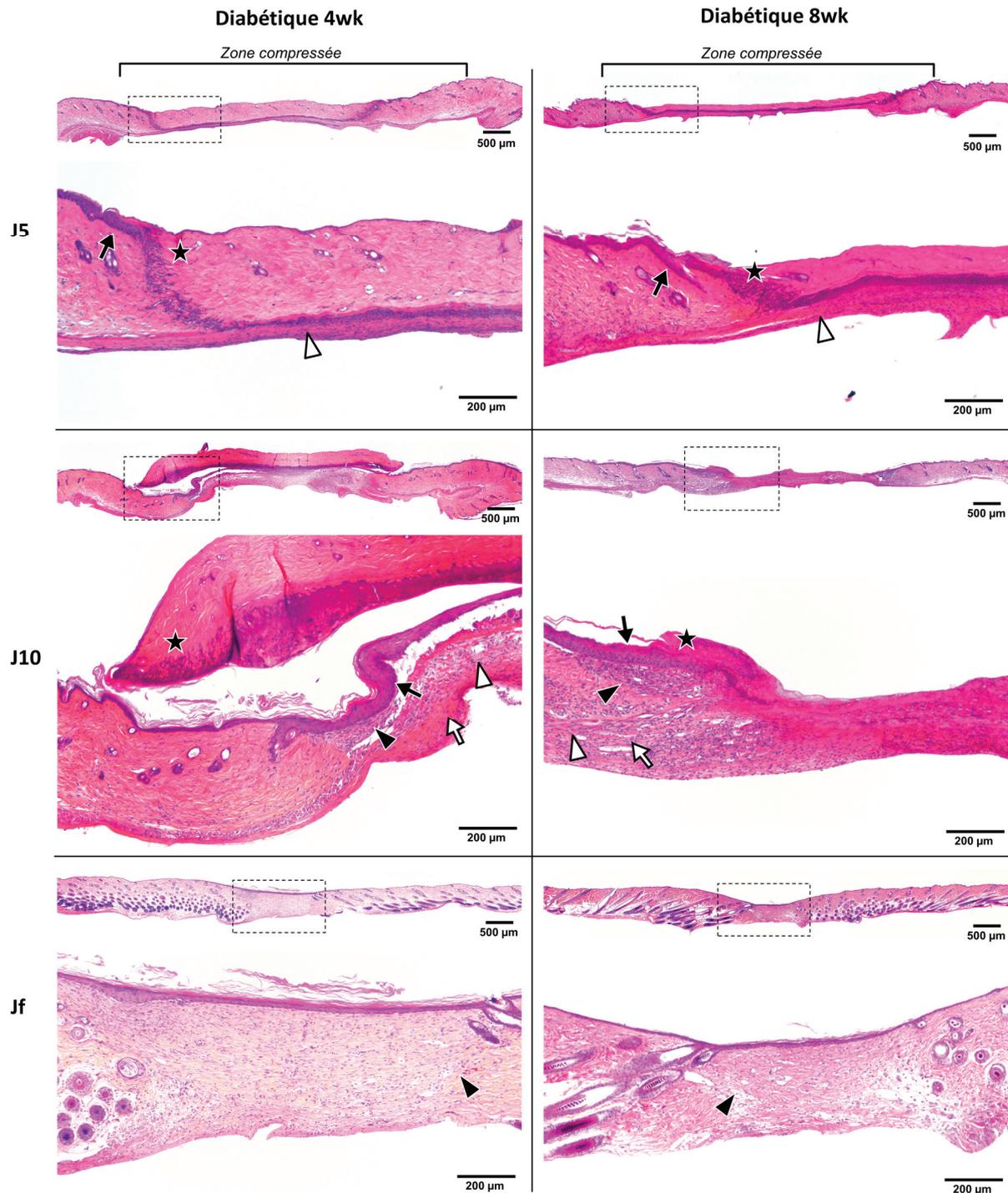


Figure 42. Évolution histologique des lésions de pression induites chez les souris diabétiques 4wk et 8wk. Photos représentatives de coupes de peau au centre de la lésion de pression colorée à l'HES, avec zooms sur les zones cicatricielles. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J23 et J27 pour les diabétiques 4wk et 8wk respectivement. Étoile noire : zone nécrotique ; flèche noire : (néo)épiderme épaissi ; flèche blanche : infiltration de cellules immunitaires ; pointe blanche : muscle cutané endommagé ; pointe noire : matrice hypercellularisée.

Néoépiderme plus fin à J5 et J10 avec le diabète, quel que soit la sévérité de la neuropathie

Sur les coupes histologiques, le néoépiderme est apparu plus fin chez les diabétiques pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression, son épaisseur maximale (l'endroit où il est le plus épais pour chaque berge) a donc été mesurée (Figure 43).

La réépithélialisation nécessite la migration et la prolifération des kératinocytes. Ici, cette zone de néoépiderme plus épais chez les souris contrôles et diabétiques peut être interprétée comme la zone de prolifération kératinocytaire [Aragona *et al.* 2017, Park *et al.* 2017].

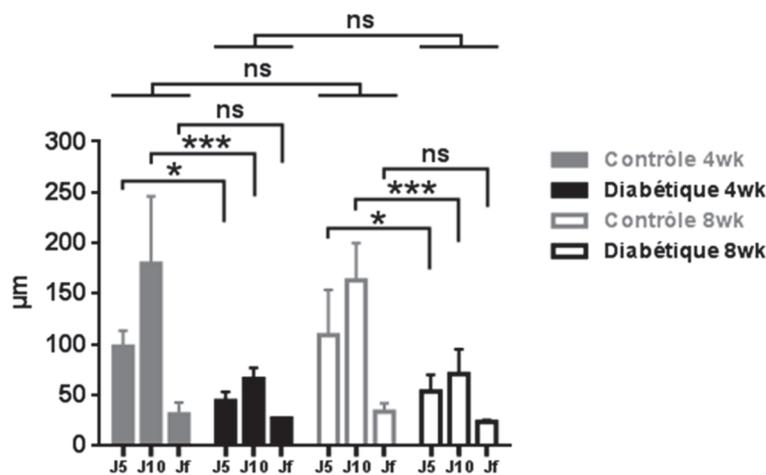


Figure 43. Mesure de l'épaisseur maximale du néoépiderme au cours de la cicatrisation des lésions de pression induites chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.

Mesures réalisées à partir des coupes histologiques à J5, J10 et Jf de chaque groupe de souris. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C4wk et C8wk, J23 pour les D4wk, et J27 pour les D8wk. n = 3 souris par condition. Moyenne ± écart-type. ANOVA à 2 facteurs.

On constate que l'épaisseur du néoépiderme augmente jusqu'à J10 dans tous les groupes, puis diminue fortement jusqu'au jour de fermeture de la lésion. Il n'y a pas de différence entre les deux groupes contrôles, ni entre les deux groupes diabétiques, mais l'épaisseur maximale est grandement diminuée entre les groupes contrôles et diabétiques à J5 et J10.

Conclusion

Nous avons étudié le délai de cicatrisation d'un ulcère de pression entre souris contrôles et diabétiques et selon la sévérité de la neuropathie. La grille CRoMT a permis de démontrer un retard de fermeture de la lésion avec le diabète (D4wk) et avec la neuropathie sévère (D8wk), alors qu'il n'y a pas de différence entre groupes contrôles aux âges correspondants.

On observe deux phases de décroissance de la surface lésée chez tous les groupes : une première phase rapide entre J5 et J12-J15, puis une deuxième phase plus lente jusqu'à fermeture. La première phase est moins accentuée avec le diabète, comparativement aux contrôles, sans différence entre D4wk et D8wk, et la deuxième phase est significativement impactée par la neuropathie diabétique sévère. De plus la surface cicatricielle à Jf est également augmentée chez les D4wk et D8wk. Ces observations démontrent un phénomène de contraction moins rapide avec le diabète et la sévérité de la neuropathie.

Histologiquement, on observe un retard d'inflammation du tissu lésé entre souris contrôles (dès J5) et diabétiques (J10). La réépithélialisation est bien initiée (néoépiderme sous la zone nécrotique) dès J5 chez les souris contrôles et à J10 chez les D4wk, alors qu'elle débute à peine chez les D8wk à J10. À J10 chez les contrôles le néoépiderme est déjà fermé. La réépithélialisation est caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme des berges et/ou du néoépiderme, en particulier à J10. Cependant cette augmentation est bien moindre chez les D4wk et D8wk (sans différence), pouvant être interprétée comme une plus faible prolifération kératinocytaire.

Afin de mieux comprendre l'origine éventuelle de ce retard de cicatrisation avec la neuropathie diabétique, nous avons ensuite analysé l'expression de différents marqueurs biologiques.

2. Étude des marqueurs biologiques altérés par la neuropathie diabétique au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié la cinétique d'expression de certaines protéines avant et pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression jusqu'à fermeture afin de déterminer leur éventuelle implication dans le retard de cicatrisation avec la neuropathie diabétique.

Le CGRP est l'un des neuropeptides majoritaires dans la peau saine [Cheret *et al.* 2013], et est directement impliqué dans plusieurs processus de la cicatrisation cutanée, notamment l'inflammation neurogène via son action vasodilatatrice [Steinhoff *et al.* 2003], l'angiogenèse [Haegerstrand *et al.* 1990, Toda *et al.* 2008], la prolifération kératinocytaire [Roggenkamp *et al.* 2013, Shi *et al.* 2013], la prolifération fibroblastique et la différenciation fibroblastes-myofibroblastes [Cheret *et al.* 2014].

L'ulcère du pied diabétique est plus fréquent chez les patients diabétiques atteints de neuropathie [Armstrong *et al.* 2017], chez qui sont retrouvés des taux abaissés de certains neuromédiateurs dans la peau non lésée, et en particulier le CGRP [Lindberger *et al.* 1989]. Cependant l'expression de ce ligand et celle de son récepteur (le complexe RAMP1-CLR-RCP) n'ont jamais été étudiées pendant la cicatrisation *in vivo*. De plus, contrairement à d'autres neuromédiateurs (SP, NGF), il n'y a à ce jour aucune publication démontrant l'effet bénéfique de l'administration exogène de CGRP pour la cicatrisation cutanée avec la neuropathie diabétique, évoquant une possible dérégulation de la voie CGRP (ligand / récepteur / signalisation).

Pour ces raisons, notre étude s'est focalisée sur ce neuropeptide. Cependant, le CGRP n'étant pas le seul neuromédiateur cutané impacté par la neuropathie diabétique, des expérimentations supplémentaires ont été menées sur l'expression pendant la cicatrisation des neuromédiateurs SP et NGF et leur(s) récepteur(s), et la NEP qui peut interférer avec le CGRP et la SP.

Ces résultats ont été complétés par l'étude de l'expression *in vivo* de la Périostine, protéine révélée différentiellement exprimée par l'analyse du sécrétome de la peau diabétique cultivée *ex vivo* (cf. résultats du modèle *ex vivo* page 129).

Matériels et méthodes

De la peau non lésée à J0 et les zones lésées à J5, J10 et Jf ont été prélevées (toutes les couches de peau). L'expression protéique de ces échantillons a ensuite été analysée par western blot et/ou immunofluorescence et/ou immunoprécipitation pour les marqueurs suivants : CGRP, RAMP1, CLR, RCP, SP, NK1R, NEP, NGF, p75NTR, TrkA, périostine. Les signaux de western-blot, après avoir soustrait le bruit de fond, ont été normalisés par Rouge Ponceau.

Détails des matériels et méthodes pages 89 et 93.

Nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'expression de ces protéines pour les groupes 4wk, dont les résultats sont présentés dans cette partie. Les résultats préliminaires des groupes 8wk sont consultables en Annexe 4 page 238.

Résultats

a. Étude de la cinétique d'expression du CGRP et de son récepteur RAMP1-CLR-RCP

Un article ayant été rédigé (cf. Annexe 5 page 241) pour une soumission dans le journal *Diabetes* dès la publication du brevet (décembre 2019), les résultats de cette partie sur le CGRP et son récepteur sont exclusivement en anglais.

Upregulation of proCGRP during pressure ulcer healing is not impaired in diabetic mice skin

To examine whether CGRP is involved in pressure ulcer healing process, we analyzed the protein expression of the full thickness skin lesion area at different time points until wound closure (Fig. 44 A). CGRP mature forms are labile proteins (expected around 5 kDa) and only the two precursor protein isoforms (proCGRP) were detectable at 16 and 14 kDa [Uniprot - CALCA, Hou *et al.* 2011]. Unwounded diabetic skin expressed significantly less total proCGRP compared to unwounded control skin (Fig. 44 B). In wound tissue at day 5 proCGRP protein expression was significantly increased compared to unwounded tissue and decreased at day 10 compared to day 5 in both groups. There was no statistical difference in proCGRP protein expression between day 10 and closure day.

Since the proCGRP protein expression pattern in response to skin compression was not different between diabetic and control mice we focused our study on the protein expression of CGRP receptor subunits, i.e. RAMP1 and CLR in skin.

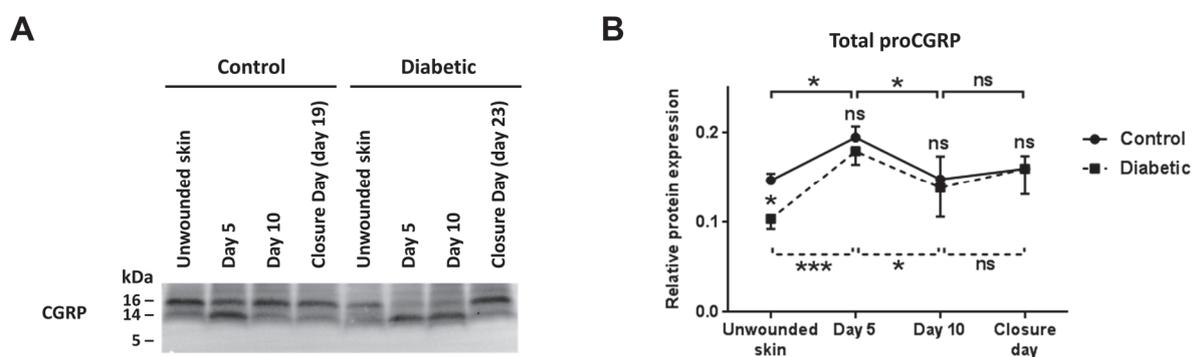


Figure 44. CGRP protein expression during pressure ulcer healing

A/ Western blot of skin protein extracts against CGRP during pressure ulcer healing of control and diabetic mice, highlighting the two precursor protein isoforms (proCGRP) at 16 and 14 kDa. **B/** Relative total proCGRP protein expression (sum of 16 and 14 kDa- band signals) during pressure ulcer healing with normalization of western blot signals by total protein on Ponceau Red staining of control (circle) and diabetic (square, dotted line) groups (Ponceau Red picture in Supplementary Figure 1). Closure day for control group is day 19, whereas it is day 23 for diabetic group. Mean \pm SD of n=3 mice per group and time point. Two-way ANOVA, diabetic versus control at the same time point is indicated closed to lines; upper brackets represent comparison between time points for control mice; lower dotted brackets represent comparison between time points for diabetic mice.

CGRP receptor subunits RAMP1 and CLR are upregulated during pressure ulcer healing in epidermis in both control and diabetic mice, but are present in granulation tissue of control mice only

Immunostaining of RAMP1 and CLR at the unwounded site of the skin was weakly present in the epidermis, and largely present in hair follicle bulbs and skin muscle *Panniculus carnosus* in both groups (Fig. 45 A).

At day 5 of wound healing, both RAMP1 and CLR staining were well detected in the epidermis of control mice (Fig. 45 B zoom 1 and 2) compared to diabetic mice (Fig. 45 B zoom 5). At day 10 in control mice, RAMP1 and CLR were detected in the neo-epidermis and in (myo)fibroblasts just underlying the epidermis in the middle of the wound (Fig. 45 A and B zoom 3). At the same time in diabetic mice skin, CLR was well expressed in the neo-epidermis whereas RAMP1 was only partially immunodetected (Fig. 45 A and B zoom 7) compared to wound edges (Fig. 45 A and B zoom 6). At the closure day in both groups, RAMP1 and CLR staining were observed in the neo-epidermis (Fig. 45 A and B zoom 4 and 8).

In both groups, RAMP1 and CLR exhibited a cytoplasmic and membrane staining at the edges of the wound (Fig. 45 B zoom 1 and 6) and at the site of total re-epithelialization (Fig. 45 B zoom 4 and 8). Conversely, RAMP1 and CLR were delocalized from the cell membrane to the cytoplasm only in the thickened epidermis during healing in control mice (Fig. 45 B zoom 2 and 3) but it was not so obvious in diabetic mice epidermis (Fig. 45 B zoom 7).

Diabetic mice exhibit delayed RAMP1 and CLR expressions and lack of CLR glycosylation during pressure ulcer healing

In both control and diabetic unwounded skin, RAMP1 protein at the expected 18 kDa molecular weight was not detectable (Fig. 46 A and C). Nevertheless, in the control group, during pressure ulcer healing at day 5 and 10, 18 kDa-RAMP1 expression was increased compared to unwounded skin and then its expression decreased at the closure day. In contrast, in diabetic mice the peak of 18 kDa-RAMP1 expression was delayed and observed at day 10 followed by a similar decrease to control skin at closure day. Furthermore, greater levels of additional RAMP1-immunopositive bands were detected solely for diabetic mice at day 5 and 10, at higher (65 kDa) and lower molecular weight (16 kDa) (Fig. 46 A).

Equally in control and diabetic unwounded skin, CLR protein was detected at 37 and 45-55kDa (Fig. 46 A). According to Nikitenko *et al.* [Nikitenko *et al.* 2006], the CLR positive band observed at 37 kDa corresponded to its unglycosylated form, the 45 kDa-CLR band to core glycosylated form, and the 55 kDa-CLR band to terminally glycosylated form. In our study, the two bands corresponding to glycosylated forms were not well distinguishable therefore we took into account total glycosylated forms (45-55kDa).

During healing in control mice, a parallel increase in total and glycosylated CLR proteins was observed with a peak at day 5, followed by a decrease until closure day (Fig. 46 D and E). At the opposite, in diabetic mice total CLR only increased at day 10 and was not accompanied by glycosylated forms rise; then total CLR returned to basal level at closure day (Fig. 46 D and E).

RCP protein level decreased at day 5 in control group and then increased gradually up to closure day (Fig. 46 A and B). In unwounded diabetic skin, RCP was slightly more expressed than in unwounded control skin. Then, RCP level decreased at day 5 similarly to control mice skin but remained significantly low at day 10 and increased at closure day to control group expression level.

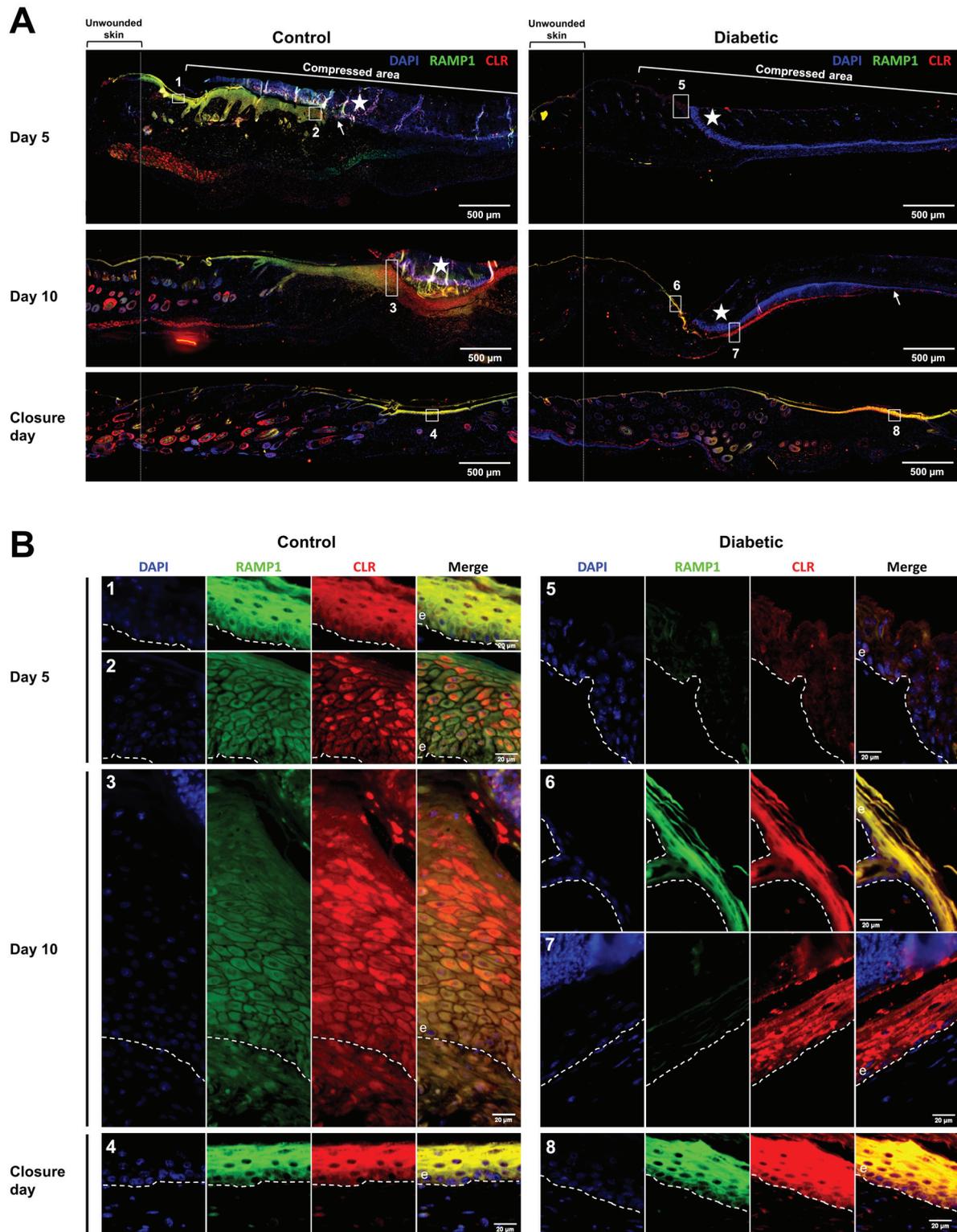


Figure 45. Spacio-temporal expression of RAMP1 and CLR during skin pressure ulcer healing
 A/ Representative merged immunostaining of RAMP1 (green), CLR (red), and nucleus counterstained with DAPI (blue), on skin section at day 5 and day 10 after de beginning of the compression protocol with magnets in control and diabetic groups, and at the closure day (day 19 for control group, day 23 for diabetic group). Arrows indicate head of keratinocyte tongue; stars indicate necrotic areas; squares with numbers indicate zoomed areas shown below. B/ Zoomed areas of the large immunostaining skin sections, with unmerge signals for RAMP1, CLR and DAPI. Dotted lines indicate separation between epidermis (e) and underlying tissue.

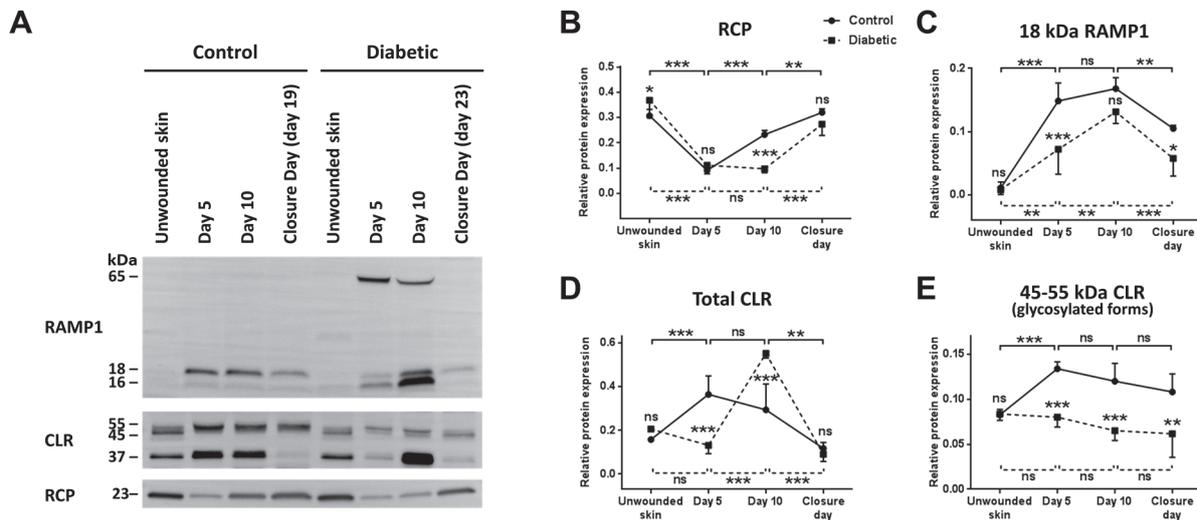


Figure 46. RAMP1, CLR and RCP protein expression during pressure ulcer healing

A/ Western blot of skin protein extracts against RAMP1, CLR and RCP during pressure ulcer healing of control and diabetic mice. Expected molecular weight are 18 kDa for RAMP1, but a lower (16 kDa) and higher (65 kDa) molecular weight RAMP1-immunoreactive bands were observed during healing in diabetic skin extracts; 37 kDa for unglycosylated CLR form, and 45-55 kDa for glycosylated CLR forms. B/ RCP, C/ 18 kDa-RAMP1, D/ total CLR and E/ 45-55 kDa glycosylated forms of CLR relative protein expression during pressure ulcer healing with normalization of western blot signals by total protein on Ponceau Red staining (Supplementary Fig. 1) of control (circle) and diabetic (square, dotted line) groups. Closure day for control group is day 19, whereas it is day 23 for diabetic group. Mean \pm SD of n=3 mice per group and time point. Two-way ANOVA, diabetic versus control at the same time point is indicated closed to lines; upper brackets represent comparison between time points for control mice; lower dotted brackets represent comparison between time points for diabetic mice.

CGRP receptor complex formation is delayed in diabetic mice during pressure ulcer healing

To assess whether functional CGRP receptor, i.e. RAMP1-CLR-RCP complex, was formed during pressure ulcer healing, we performed an immunoprecipitation against RCP to look at its partners.

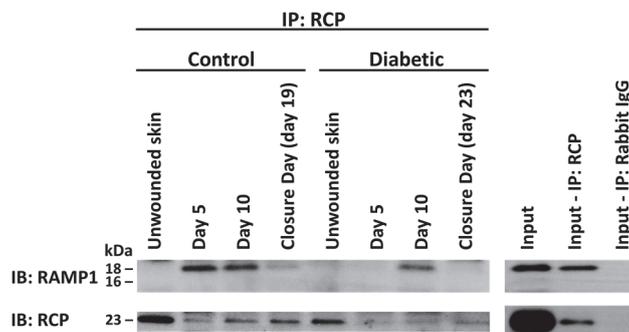


Figure 47. Immunoprecipitation of RCP partners to identify presence of mature CGRP complex receptor.

On the left, representative western blot of skin protein extracts after immunoprecipitation (IP) with anti-RCP antibody of control and diabetic mice during pressure ulcer healing. n = 3 mice per group and time point, with the same initial skin protein amount used to make the IP. On the right, negative and positive controls used to validate rabbit anti-RCP antibody for immunoprecipitation.

Immunoprecipitated RCP protein level pattern during healing (Fig. 47) followed the ones observed in western-blot for control and diabetic mice (Fig. 46 A and B).

Despite technical optimization, CLR was not distinguishable from IgG heavy chains (data not shown), however Hilairet *et al.* [Hilairet *et al.* 2001a, Hilairet *et al.* 2001b] demonstrated that RAMP1 is co-immunoprecipitated with CLR. Since we found that RAMP1 was co-immunoprecipitated with RCP and that, to date, RCP has been found to interact only with CLR [Egea *et al.* 2012], we assumed that RAMP1 and RCP were linked by CLR.

For both diabetic and control mice unwounded skin, co-immunoprecipitated RAMP1 was undetectable (Fig. 47). During healing in control mice, 18 kDa-RAMP1 was well detected at day 5 and 10, and then a lower signal was observed at closure day. On the contrary for diabetic mice, 18 kDa-RAMP1 was detected only at day 10.

Les résultats présentés dans cette partie indiquent que le proCGRP, RAMP1 et CLR sont surexprimés pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression, avec des taux équivalents en proCGRP chez les contrôles et chez les diabétiques. Cependant l'expression protéique des sous-unités RAMP1 et CLR est retardée, la formation du complexe RAMP1-CLR-RCP semble également retardée (J5 chez les contrôles et J10 chez les diabétiques), et il n'y a pas d'augmentation du niveau de CLR glycosylé avec le diabète. RAMP1 et CLR sont particulièrement surexprimés au niveau du néoépiderme (peau contrôle et diabétique) et du derme superficiel (peau contrôle uniquement) pendant la cicatrisation.

Cela semble indiquer que le retard de fermeture de la lésion n'est pas dû à un défaut de surexpression du CGRP au cours de la cicatrisation, mais plutôt dû à un défaut d'expression, de complexation et de maturation post-traductionnelle du récepteur au CGRP. Ceci pourrait affecter la prolifération des kératinocytes et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, contribuant au retard de cicatrisation avec le diabète.

Pendant ce travail de thèse, outre la voie du CGRP, d'autres marqueurs biologiques ont été étudiés en raison de leurs activités connues pour la cicatrisation, leur modulation respective avec la neuropathie diabétique pouvant participer au retard de cicatrisation de l'ulcère de pression.

b. Cinétique d'expression d'autres marqueurs biologiques pouvant participer au retard de cicatrisation

i. Cinétique d'expression de la Substance P, de son récepteur NK1R, et de l'enzyme NEP

La Substance P est co-exprimée dans les fibres nerveuses cutanées avec le CGRP, et ces deux neuromédiateurs partagent des activités biologiques telles que l'inflammation neurogène et la différenciation fibroblastes-myofibroblastes. Nous avons donc étudié également l'expression de la SP, de son récepteur NK1R et de l'enzyme NEP pouvant dégrader la SP ou bloquer NK1R pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression.

Défaut de surexpression de NK1R dans la peau diabétique 4wk à J5 et J10

L'expression protéique de la substance P (SP) est régulièrement augmentée au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression (Figure 48 A et B), sans différence notable entre C4wk et D4wk.

Le niveau de NK1R est similaire dans la peau non lésée entre C4wk et D4wk (Figure 48 A et C). Entre J0 et J10 le niveau de SP augmente fortement dans la peau C4wk, alors qu'il évolue peu dans la peau D4wk. Cependant à Jf le niveau de SP est similaire entre C4wk et D4wk.

Le taux de NEP dans la peau non lésée est supérieur dans le groupe diabétique que dans le groupe contrôle (Figure 48 A et D). Chez les contrôles, le taux de NEP chute ensuite à J5, puis

augmente graduellement jusqu'à Jf. Chez les diabétiques, le taux de NEP chute jusqu'à J10, et ne réaugmente qu'ensuite, rejoignant le taux des contrôles à Jf.

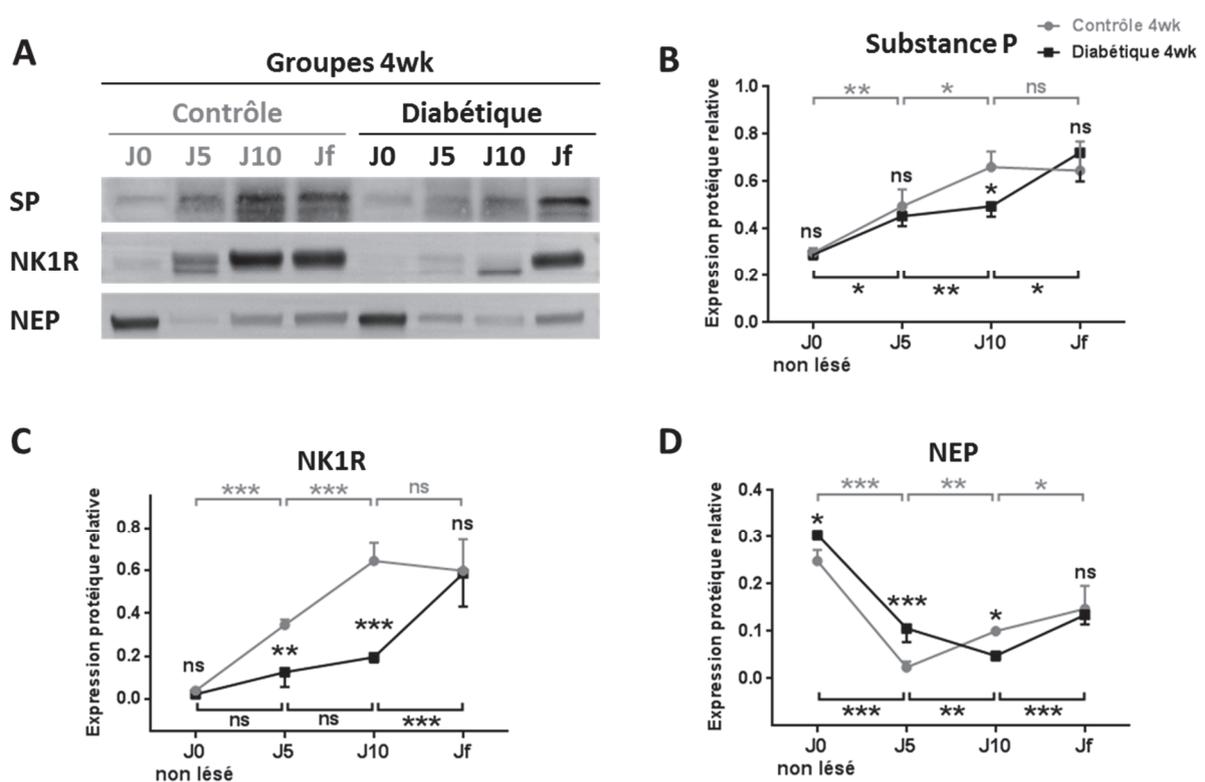


Figure 48. Expression protéique de la SP, de son récepteur NK1R, et de la Neuroendopeptidase (NEP) dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques. A/ Western-blots représentatifs d'extraits protéiques de peau totale avec anticorps anti-SP, NK1R et NEP. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C4wk et J23 pour les D4wk. B, C et D/ Expression relative des signaux en western-blot normalisés par la quantité protéique totale estimée par Rouge Ponceau. n = 3 souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteurs. La comparaison entre les points de cinétique du groupe contrôle est représentée par les accolades du haut, celle du groupe diabétique par les accolades du bas. Les étoiles près des courbes représentent la comparaison entre C4wk et D4wk à chaque point de cinétique.

On observe ainsi des taux plus faibles de SP et de NK1R pendant la cicatrisation chez les D4wk, comparativement aux contrôles, bien qu'à Jf il n'y ait pas de différence entre les groupes.

L'expression et la sécrétion des neuropeptides CGRP et SP par les fibres nerveuses peuvent être stimulées par le NGF via la sensibilisation de TRPV1 [Price *et al.* 2005, Skoff *et al.* 2006]. Nous avons donc étudié si le NGF et ses récepteurs étaient également surexprimés pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression et s'ils étaient affectés par la neuropathie diabétique.

ii. Cinétique d'expression du NGF et de ses récepteurs TrkA et p75NTR

Surexpression du NGF et de son récepteur p75NTR dans la peau non lésée diabétique à 4wk

L'expression du NGF à J0 (peau non lésée) est plus élevée chez les souris D4wk, que chez les souris contrôles (Figure 49 A et B). Cependant, à J5 la quantité de NGF chute brutalement dans tous les groupes à des niveaux similaires et n'évolue quasiment pas jusqu'à la fermeture.

L'expression protéique du récepteur p75NTR à J0 est plus élevée dans la peau D4wk (Figure 49 A et C). Comme pour le NGF, le niveau de p75NTR chute à J5 dans tous les groupes, puis augmente légèrement jusqu'à Jf de manière similaire entre les groupes.

Le niveau de TrkA augmente avec la lésion et la cicatrisation dans tous les groupes (Figure 49 A et D). On observe cependant une expression plus forte de TrkA à Jf dans le groupe D4wk, comparativement aux souris C4wk.

La voie NGF/p75NTR ne semble donc pas spécifiquement stimulée pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression.

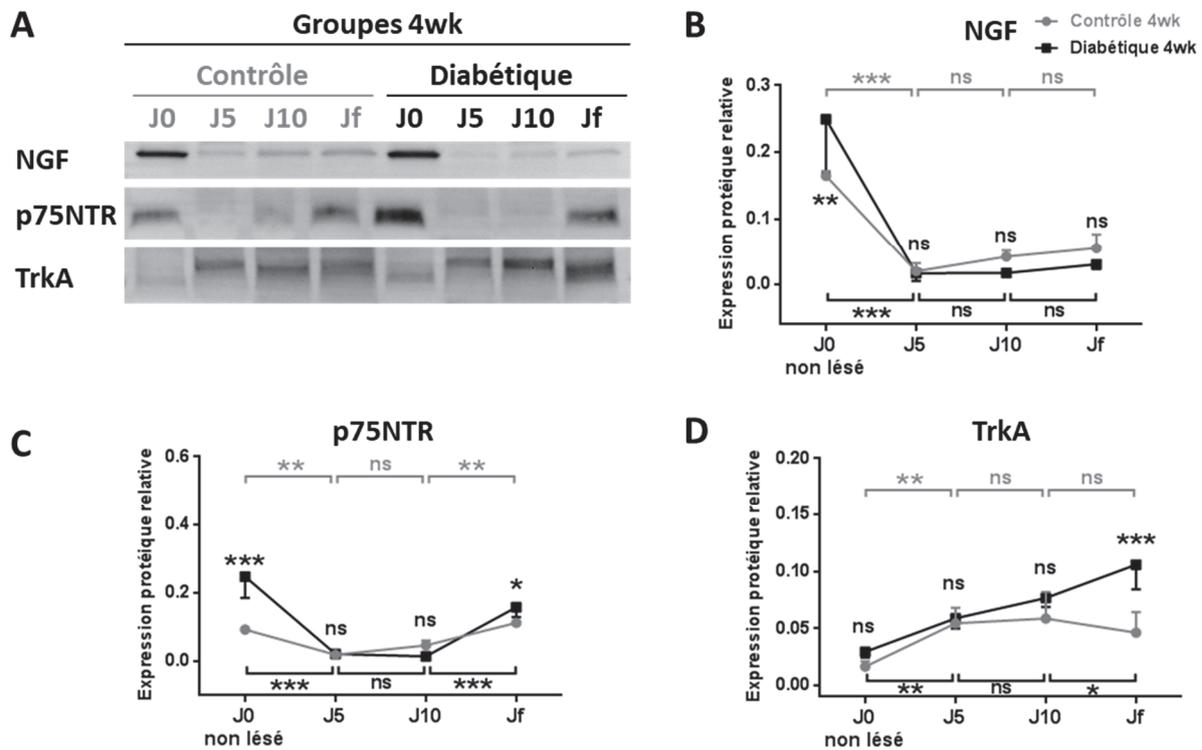


Figure 49. Expression protéique du NGF et de ses récepteurs p75NTR et TrkA dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques.

A/ Western-blots représentatifs d'extraits protéiques de peau totale avec anticorps anti-NGF, p75NTR et TrkA. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C4wk et J23 pour les D4wk. B, C et D/ Expression relative des signaux en western-blot normalisés par la quantité protéique totale estimée par Rouge Ponceau. $n = 3$ souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteurs. La comparaison entre les points de cinétique du groupe contrôle est représentée par les accolades du haut, celle du groupe diabétique par les accolades du bas. Les étoiles près des courbes représentent la comparaison entre C4wk et D4wk à chaque point de cinétique.

Tout comme les neuromédiateurs étudiés précédemment, la périostine est impliquée dans la cicatrisation au niveau kératinocytaire et fibroblastique. Nous avons donc étudié sa participation éventuelle dans la cicatrisation de l'ulcère de pression et sa modulation avec la neuropathie diabétique.

iii. Cinétique d'expression de la périostine

La périostine n'a été que récemment décrite au niveau cutané et son rôle dans la cicatrisation est encore mal connu. Cependant, il a été démontré que la périostine était impliquée dans la différenciation fibroblastes-myofibroblastes [Zhou *et al.* 2010, Kanaoka *et al.* 2018] et qu'elle était surexprimée au niveau des kératinocytes pendant la réépithélialisation [Jackson-Boeters *et al.* 2009].

Défaut de surexpression de la périostine dans la peau diabétique 4wk à J10 et Jf

La périostine est faiblement détectée dans la peau non lésée et à J5 pour tous les groupes

(Figure 50 A et B). Puis, la périostine est fortement surexprimée à J10 et augmente jusqu'à Jf chez les souris C4wk. Chez les D4wk, la périostine n'est significativement augmentée qu'à Jf, avec un taux plus faible que les contrôles.

L'analyse par immunomarquage permet de voir qu'à J10 la périostine est très présente dans le derme cicatriciel des souris contrôles (Figure 50 C zoom 1), et semble moins présent chez les souris diabétiques (Figure 50 C zoom 3). Au niveau du néoépiderme chez les contrôles (Figure 50 C zoom 2) on observe des kératinocytes surexprimant la périostine dans leur cytoplasme, contrairement au néoépiderme des souris diabétiques (Figure 50 C zoom 4).

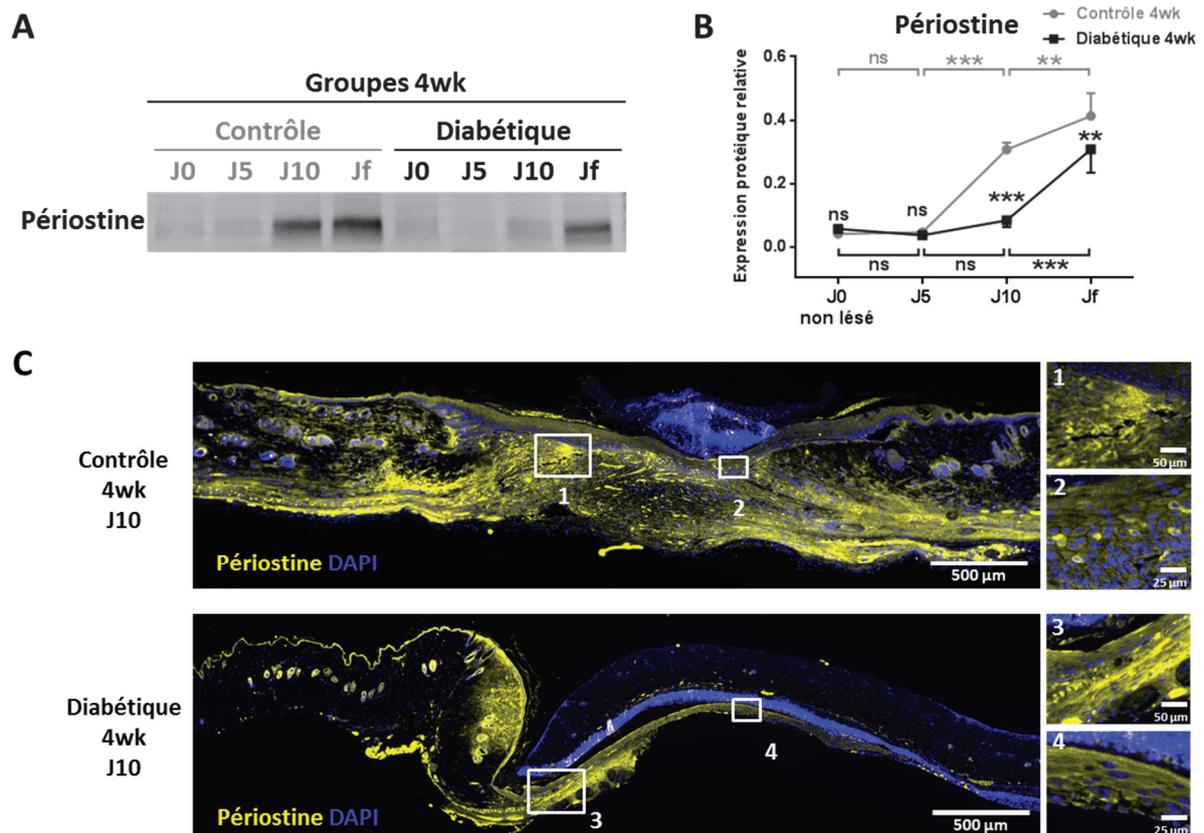


Figure 50. Expression protéique de la périostine dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques.

A/ Western-blot représentatifs d'extraits protéiques de peau totale avec anticorps anti-périostine. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C4wk et J23 pour les D4wk. B/ Expression relative des signaux en western-blot normalisée par la quantité protéique totale estimée par Rouge Ponceau. $n = 3$ souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteurs. La comparaison entre les points de cinétique du groupe contrôle est représentée par les accolades du haut, celle du groupe diabétique par les accolades du bas. Les étoiles près des courbes représentent la comparaison entre C4wk et D4wk à chaque point de cinétique. C/ Immunomarquage représentatif de la périostine (jaune) et des noyaux cellulaires (bleu) de coupe de peau de souris à J10 chez les souris contrôles et diabétiques du groupe 4wk.

Conclusion

Dans la partie précédente, nous avons observé que la cicatrisation de l'ulcère de pression avec la neuropathie diabétique est caractérisée par un retard de réépithélialisation, et un plausible défaut de prolifération kératinocytaire et de contraction.

Afin d'identifier quelles protéines pourraient participer à ce retard de fermeture de lésion, dans cette partie nous avons analysé l'expression de différentes molécules dans la peau non

lésée et au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques.

Ceci a permis d'observer que, bien qu'il y ait une surexpression protéique de NGF et de son récepteur p75NTR dans la peau non lésée diabétique à 4wk, comparativement aux contrôles, la voie NGF/ p75NTR est sous-exprimée à J5/J10/Jf dans tous les groupes et ne semble donc pas intervenir dans la fermeture de l'ulcère de pression (confirmé à 8wk, cf Annexe 4 page 240).

Le CGRP et la SP, connu pour être impliqués dans la cicatrisation cutanée, sont diminués dans la peau non lésée des patients diabétiques neuropathiques et pourraient contribuer au retard de cicatrisation de leur lésion. Chez les souris contrôles, CGRP/RAMP1/CLR et SP/NK1R sont en effet surexprimés au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression, mais avec la neuropathie diabétique, de manière surprenante, le proCGRP est correctement surexprimé pendant la cicatrisation à 4wk (et à 8wk, cf. Annexe 4 page 239). De plus, l'expression du récepteur est retardée/abaissée et la glycosylation de CLR n'augmente pas (comme pour les D8wk, cf. page 239). Pendant la cicatrisation chez les contrôles, RAMP1 et CLR semblent internalisés au niveau des kératinocytes du néoépiderme épais, contrairement à la peau diabétique. Il semble donc qu'avec la neuropathie diabétique à 4wk au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression, il y ait un défaut de formation et d'activation du récepteur au CGRP, malgré la présence du ligand.

Tout comme le proCGRP, la substance P est correctement surexprimée chez les D4wk, comparativement aux contrôles. Cependant l'expression de NK1R est plus faible à J5 et J10 que chez les contrôles (chez les D8wk, SP et NK1R semblent abaissés par rapport aux C8wk, cf. Annexe 4 page 240).

La périostine est impliquée dans la contraction de la lésion, via la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, et aurait un rôle dans la réépithélialisation. On observe que cette protéine est indétectable dans la peau non lésée et augmente à partir de J10 chez les contrôles. Son expression est retardée et diminuée avec le diabète à 4wk (et à 8wk, cf. Annexe 4 page 240).

L'étude de la cicatrisation chez l'animal fait intervenir de multiples processus, qui peuvent rendre complexe l'interprétation des résultats. De plus, ces expérimentations nécessitent un grand nombre d'animaux. C'est pourquoi, en parallèle du modèle *in vivo*, un modèle *ex vivo* a été initié.

IV. Analyse de la réépithélialisation post-compression dans un modèle *ex vivo*

Le modèle *ex vivo*, utilisant moins d'animaux (10 à 12 punchs de peau / souris et autant de conditions pouvant être testées), permet de s'affranchir notamment du système immunitaire circulant et de la synthèse de neuropeptides par les nerfs (axones coupés). De plus, le milieu de culture permet d'effacer les différences de concentration sanguine en glucose ou hormones (insuline) auxquelles sont exposées les peaux de souris, et qui pourraient inhiber ou participer à la cicatrisation. Nous avons donc étudié la cicatrisation *ex vivo* après compression sur peaux de souris contrôles ou diabétique, afin de déterminer i/ si un délai de réépithélialisation est également visible dans ces conditions, ii/ si ce modèle reproduit en partie les modulations moléculaires observées pendant la cicatrisation entre patient sain et patient diabétique neuropathique, et pourrait donc servir pour le screening d'autres marqueurs biologiques altérés ou d'actifs cicatrisants.

Matériels et méthodes

De la peau du dos dépilé a été prélevée chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk, et des punchs (8 mm de diamètre) ont été réalisés, mis en culture (J0) et compressés à l'aide d'aimants (4 mm de diamètre) pendant 16h.

Des coupes histologiques ont été réalisées à J1 (8h après retrait des aimants), J3 et J5 et analysées par un laboratoire indépendant (Novotec).

Un test MTT (viabilité cellulaire) a été réalisé tous les jours, et l'évolution de la surface compressée non viable a été mesurée.

Le secrétome a été réalisé à partir des milieux de culture récupérés à J1 et J2 et mixés.

Détails des matériels et méthodes page 83.

Résultats

Retard de réépithélialisation de la peau avec le diabète et la sévérité de la neuropathie post-compression *ex vivo*

Au niveau histologique (Figure 51 A), on observe qu'à J1 la zone compressée est visible par la diminution de l'épaisseur de la peau aussi bien chez les contrôles que les diabétiques. À J3 dans les deux groupes, l'épiderme apparaît fin et nécrotique au centre de la compression et la réépidermisation a débuté sur les berges, le derme contient des cellules en nécrose et la vascularisation est peu visible, le tissu adipeux est absent et le *Panniculus carnosus* est linéaire et altéré. À J5 dans la peau contrôle, la réépidermisation est totale avec un épiderme d'épaisseur modérée, pluristratifié et non organisé ; alors que dans la peau diabétique la réépidermisation n'est pas totale et l'épiderme du centre de l'échantillon apparaît encore fin et nécrotique. À J5 dans les deux groupes, la matrice dermique est majoritairement acellulaire et avasculaire.

En 5 jours de culture il est donc possible d'observer une progressive mort cellulaire au niveau dermique de la zone compressée, et une nécrose épidermique (C4wk et D4wk) suivi d'une réépithélialisation (complète chez la C4wk uniquement).

Un test de viabilité (MTT) a été réalisé et a permis d'observer macroscopiquement la formation du néoépiderme (Figure 51 B) sur un plus grand nombre de peaux de souris contrôles et diabétiques à 4wk et 8wk (Figure 51 C).

On observe qu'à J1 et J2 sur peaux contrôles et diabétiques 4wk et 8wk (Figure 51 B et C), la zone compressée est complètement blanche au test MTT et donc démontre une mortalité cellulaire due à la compression. À partir de J3 la réépithélialisation est initiée dans tous les groupes (Figure 51 C), avec un anneau de kératinocytes vivants (bleus) visibles sur la zone compressée (Figure 51 B). La peau C4wk est complètement réépidermée à J5, alors que le néoépiderme de la peau D4wk n'est fermé qu'à J6 (Figure 51 C). Bien qu'on observe une réépithélialisation plus lente de la peau C8wk (néoépiderme fermé à J6) que de la peau C4wk, la réépidermisation de la peau D8wk est très retardée, comparativement à C8wk et D4wk, puisqu'elle n'est toujours pas terminée à J6 (Figure 51 C).

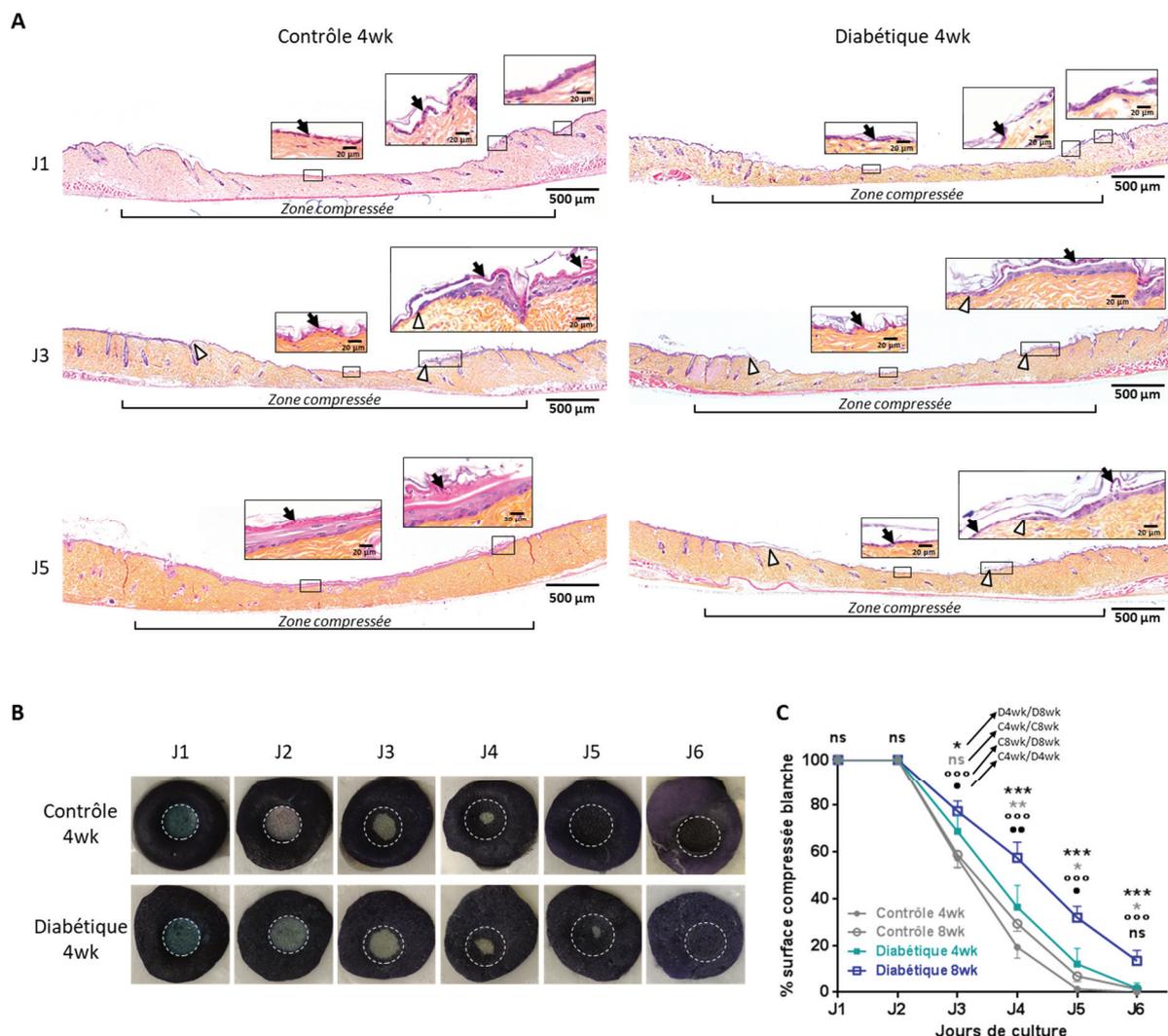


Figure 51. Suivi histologique et macroscopique de peau de souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk post-compression *ex vivo*.

J1 correspond à 24h de culture (16h de compression + 8h de reperfusion). A/ Coupes de peau de souris contrôles et diabétique 4wk colorée à l'HES. Les flèches indiquent l'épiderme nécrosé, les pointes blanches indiquent les limites de la langue kératinocytaire. B/ Photos représentatives (de 5 souris par condition) de peau de souris contrôles et diabétique 4wk après incubation avec du MTT. La couleur bleue indique une viabilité cellulaire. Le cercle pointillé indique la zone compressée. C/ Suivi du pourcentage de surface compressée blanche au test MTT sur la surface compressée totale de peau de souris contrôles et diabétique 4wk et 8wk. n = 5 peaux par condition. Moyenne ± écart-type. MultiTest T. Ronds noirs pour C4wk versus D4wk, cercles noirs pour C8wk versus D8wk, étoiles grises pour C4wk versus C8wk, étoiles noires pour D4wk versus D8wk.

Augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et diminution des facteurs de croissance et de la périostine par la peau diabétique post-compression *ex vivo*

La sécrétion de molécules dans le milieu de culture a été analysée entre J1 et J2 post-compression *ex vivo* (Figure 52). On constate que la peau diabétique 4wk compressée sécrète davantage d'IL-1beta (cytokine pro-inflammatoire) et de sRAGE (récepteur soluble aux AGE) et moins d'IL-10 et IL-1RA (cytokines anti-inflammatoires) que la peau contrôle compressée. On retrouve également moins de VEGF, d'EGF et de PDGF, et beaucoup moins de périostine avec la peau diabétique.

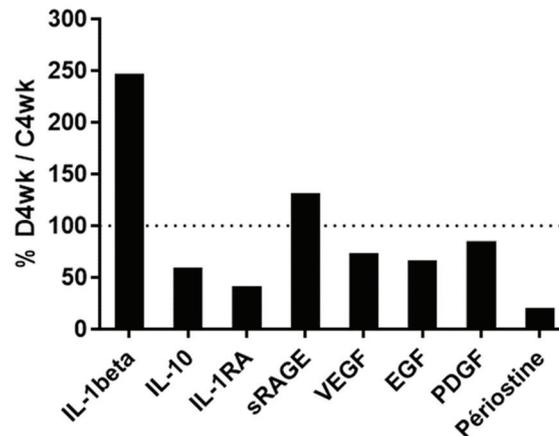


Figure 52. Taux relatif de cytokines sécrétées post-compression *ex vivo* par la peau de souris diabétique versus peau contrôle 4wk.

Concentrations relatives de cytokines dosées dans le milieu de culture à J1/J2 des peaux diabétiques versus peaux contrôles post-compression *ex vivo*. Ne sont représentées ici qu'une partie des cytokines dosées.

Conclusion

Le modèle d'étude de la cicatrisation post-compression *ex vivo* initié pendant ce travail de thèse montre qu'il est utilisable pour suivre la réépidermisation en seulement 6 jours, et a permis d'observer un retard avec la peau diabétique compressée, comparativement à la peau contrôle compressée, et ce retard est accentué avec la sévérité de la neuropathie. Le sécrétome de la peau diabétique compressée, comparativement à celui de la peau contrôle compressée, montre un phénotype pro-inflammatoire et une diminution de facteurs de croissance nécessaires à la cicatrisation cutanée. De plus, ce modèle a permis d'identifier la périostine comme possible marqueur altéré par la neuropathie diabétique pendant la cicatrisation cutanée.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ulcère du pied diabétique touche préférentiellement les patients diabétiques avec atteinte neuropathique [Reiber *et al.* 1999]. Il semble donc exister un lien entre la présence d'une neuropathie et la survenue de l'ulcère du pied. Cependant, les patients atteints de lésion chronique sont généralement à un stade avancé de neuropathie [Vouillarmet *et al.* 2019], et il n'est pas connu si l'atteinte des petites fibres nerveuse peu déjà fragiliser la peau diabétique. C'est ce à quoi s'est attaché à répondre ce travail de thèse dans une première partie.

I. Le degré d'atteinte neuropathique semble impacter négativement la résistance cutanée à la pression/friction

1. Caractérisation de la neuropathie diabétique

Dans ce travail de thèse nous avons défini deux stades de neuropathie sans et avec atteinte de la vitesse de conduction nerveuse, contrairement à la plupart des études existantes sur souris diabétiques neuropathiques (diabète de type 1 ou 2, induit ou génétique) qui ont toutes une atteinte de cette fonction (ou bien elle n'est pas évaluée) [Sullivan *et al.* 2008].

Bien que la vitesse de conduction nerveuse ne soit pas altérée dans notre modèle D4wk, la diminution de la densité en fibres nerveuses épidermiques démontre l'initiation de la dégradation nerveuse. De plus, la réponse rapide au test Tail Flick indique une hyperalgésie. Ce test évalue la durée de réaction réflexe [Irwin *et al.* 1951] de l'animal à la chaleur nocive. Les nocicepteurs thermiques présents sur les terminaisons nerveuses de la peau sont activés et engendrent un influx nerveux remontant jusqu'au GRD, induisant un réflexe musculaire de retrait de la queue. Ainsi ce test permet à la fois d'évaluer la sensibilité des nocicepteurs thermiques cutanés et la rapidité de réaction réflexe de l'animal.

La diminution de la latence de réaction au test Tail Flick des D4wk (versus C4wk), en l'absence de modification de la MNCV, démontre une hypersensibilité des nocicepteurs. Pendant le test, la lampe chauffe de 32 à 60°C, plusieurs nocicepteurs thermiques sont donc susceptibles d'être activés : TRPV1 (>43°C) et TRPV2 (>54°C) [Lumpkin *et al.* 2007]. Cependant les souris contrôles (C4wk et C8wk) ont une réaction à ce test à environ 5.5sec, ce qui peut correspondre ($5.5\text{sec} \times \text{incrémentation } 2.8^\circ\text{C}/\text{sec} = 47^\circ\text{C}$) à une activation des récepteurs TRPV1. La rapidité de réponse des D4wk au Tail Flick peut donc être interprétée comme une hypersensibilité de leurs récepteurs TRPV1 cutanés.

L'hyperalgésie cutanée avec le diabète induit par STZ a déjà été observé chez le rat STZ avec une diminution du seuil de sensibilité à la chaleur après 2 semaines [Chen *et al.* 2011], et une baisse du seuil de sensibilité mécanique dès 1 semaine (et maintenue après 4 semaines) corrélée à une augmentation de l'expression épidermique de TRPV1 [Cui *et al.* 2014]. Chez l'homme, la neuropathie douloureuse serait également associée à une hypersensibilité de TRPV1 [Danigo *et al.* 2013].

Dans notre étude, la potentielle hypersensibilité de TRPV1 chez les D4wk pourrait être en partie expliquée par l'augmentation de la quantité de NGF présent dans leur peau non lésée. En effet, le NGF favorise la translocation à la membrane [Stein *et al.* 2006] et la phosphorylation [Zhang *et al.* 2005] de TRPV1 au niveau des fibres nerveuses, diminuant ainsi son seuil d'activation.

Les D8wk, comme les D4wk, ont une augmentation forte de NGF dans la peau, il n'est donc pas exclu d'avoir également une hypersensibilité de TRPV1 à ce stade de diabète. La durée de réaction plus longue au test Tail Flick des D8wk (versus D4wk et C8wk), pourrait être expliquée par la diminution de leur conduction nerveuse. En effet, TRPV1 est exprimé par les fibres nerveuses cutanées sensorielles C (non myélinisées) et A δ (myélinisée) [Caterina *et al.* 2001], et l'incrément de la température de la lampe de l'appareil Tail Flick étant supérieure à 2°C/sec, ce test permet d'activer potentiellement aussi bien ces deux types de fibres nerveuses [Yeomans *et al.* 1996a, Yeomans *et al.* 1996b]. La démyélinisation partielle des fibres nerveuses chez les D8wk illustrée par la baisse de MNCV peut donc participer à retarder la réponse au Tail Flick.

L'augmentation du NGF cutané a déjà été observée dans des modèles de diabète de type 1 chez le rat à 4 semaines [Manni *et al.* 2011, Nori *et al.* 2013] (avec hyperalgésie à la chaleur) et chez la souris à 6 semaines [Christianson *et al.* 2003]. Or, il a été observé que l'expression génique de NGF par la peau était très augmentée suite à la dénervation chez le rat [Mearow *et al.* 1993], en particulier par les fibroblastes et les kératinocytes basaux. Il semble donc que l'augmentation du NGF cutané observée dans notre étude chez les D4wk et D8wk soit une réponse des cellules cutanées à l'installation de la neuropathie périphérique. Ces observations vont à l'encontre des données sur patients diabétiques (type 1) neuropathiques chez qui des taux faibles de NGF ont été dosés dans la peau, associée à une diminution de l'expression du NGF par les kératinocytes [Anand *et al.* 1996]. Cependant dans cette étude les patients présentaient une hypoalgésie à la chaleur, démontrant une atteinte neuropathique potentiellement plus sévère que dans notre modèle animal.

L'augmentation de p75NTR dans la peau des D4wk et D8wk pourrait également faire suite à l'atteinte nerveuse, puisque ce récepteur a été retrouvé augmenté dans le derme et l'épiderme après constriction du nerf sciatique chez le rat [Peleshok *et al.* 2012].

Diminution de la densité en fibres nerveuses intraépidermiques (IENF)

Dans notre étude, nous avons observé que le diabète conduisait à une diminution de la densité en fibres nerveuses au niveau de l'épiderme après 4 semaines, et que cette densité n'était pas altérée pas l'atteinte supplémentaire des grosses fibres myélinisées (8 semaines). Peu d'études ont analysé l'évolution de l'IENF chez la souris diabétique. Parmi elles, un modèle de souris diabétique STZ de souche MrgD/GFP, la densité en IENF n'est pas altérée après 4 semaines (versus contrôle) mais est diminuée après 8 semaines [Johnson *et al.* 2008]. Cependant dans ce modèle une diminution du nombre de fibres peptidergiques est observées dès 4 semaines. Il pourrait exister des différences de proportion entre fibres épidermiques peptidergiques et non-peptidergiques entre ce modèle de souris et le nôtre (souche C57Bl6) qui expliqueraient la disparité de densités IENF observées à 4 semaines.

Chez le patient la diminution de l'IENF est corrélée à la durée du diabète et le degré de neuropathie [Shun *et al.* 2004, Divisova *et al.* 2016]. Cependant, ces études ont été réalisées sur patients diabétiques de type 2, et chez la souris db/db (diabète de type 2) la diminution de l'IENF est également progressive [De Gregorio *et al.* 2018]. Dans notre modèle de diabète de type 1, la diminution drastique et rapide du signal neurotrophique de l'insuline via la destruction des cellules bêta du pancréas par la STZ pourrait également expliquer pourquoi il n'y a plus d'évolution de l'IENF dans notre modèle de souris STZ (diabète de type 1) entre D4wk et D8wk.

Diminution du proCGRP sans diminution de la Substance P

Dans notre étude, nous avons observé par western blot une diminution de la quantité totale de proCGRP dans la peau non lésée des D4wk, qui est confirmée par la baisse globale de l'immunomarquage du CGRP dans la peau et par la diminution apparente des fibres CGRP immunoréactives (Figure 53 B), et malgré l'étonnante surexpression par les cellules cutanées des gènes CALCA et CLACB (Figure 53 A) codant pour le CGRP.

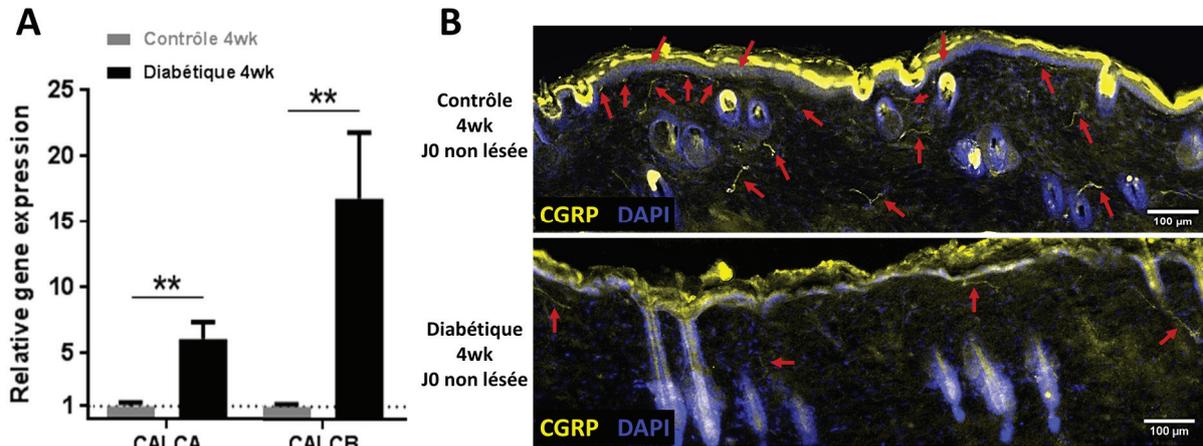


Figure 53. Expression génique et protéique du CGRP dans la peau non lésée des C4wk et D4wk.

A/ Expression génique dans la peau totale non lésée des gènes CALCA et CALCB codant respectivement pour les isoformes alpha et beta du CGRP. Les corps cellulaires des nerfs cutanés étant situés au niveau de la moelle épinière, l'ARNm analysé ici ne provient que des cellules cutanées. n = 3 souris par groupe. Moyenne \pm SD, Test T. Normalisé par les gènes de ménage RPL13A et B2M, et par la moyenne du groupe C4wk. B/ Immunomarquage représentatif du CGRP dans la peau non lésée à J0. Les flèches indiquent les fibres CGRP+.

Contrairement au CGRP, la substance P ne semble pas être diminuée dans la peau totale des D4wk. Bien qu'il ait été montré que la peau du patient diabétique neuropathique contenait une plus faible densité de fibres nerveuses SP et CGRP positives [Lindberger *et al.* 1989], en l'absence de fibres nerveuses la peau *ex vivo* sécrète toujours de la substance P mais pas de CGRP [Cheret *et al.* 2014]. Ceci démontre que les nerfs ne sont pas la seule source de SP dans la peau non lésée, contrairement au CGRP, et qu'ainsi, en cas de neuropathie, le taux global de CGRP dans la peau est le premier (versus SP) potentiellement impacté. Cependant, cela n'exclut pas la possibilité de la diminution, même minime, du nombre de fibres SP positives chez les D4wk.

Dans notre étude, l'augmentation du taux de NEP dans la peau non lésée des souris STZ pourrait également favoriser la dégradation enzymatique [Katayama *et al.* 1991] du CGRP sécrété localement. L'accroissement du taux de NEP cutanée a déjà été observé chez la souris db/db [Spenny *et al.* 2002], de même que la suractivité de cette enzyme dans la peau de patients diabétiques [Antezana *et al.* 2002].

De plus, l'augmentation de l'expression de p75NTR dans la peau non lésée dès 4 semaines de diabète pourrait être le reflet d'une augmentation de ce récepteur à la surface des fibres nerveuses qui contribuerait à la diminution de synthèse du CGRP. En effet, il a été montré que les souris KO pour p75NTR étaient protégées de la diminution de synthèse de CGRP par les GDR suite à l'induction du diabète par STZ, contrairement aux souris exprimant le récepteur [Jiang *et al.* 2004].

2. Impact de la neuropathie diabétique sur la peau non lésée

Epiderme plus fin

Dans notre étude nous avons observé que l'épaisseur de l'épiderme était très diminuée dès 4 semaines de diabète. Cette finesse épidermique a déjà été reportée chez la souris STZ dès les premières semaines de diabète [Sakai *et al.* 2003] et dans d'autres modèles de rongeurs de diabète de type 1 [Chen *et al.* 2010] ou de type 2 [Taylor *et al.* 2011]. Dans ces études, cette observation est associée à une diminution de la prolifération des kératinocytes. Cette altération pourrait être le résultat de l'hyperglycémie, car il a été montré qu'un taux élevé de glucose réduisait la capacité proliférative *in vitro* de ces cellules [Spravchikov *et al.* 2001, Hu *et al.* 2016]. La diminution de la signalisation à l'insuline peut également impacter négativement la prolifération kératinocytaire [Wertheimer *et al.* 2001, Mainzer *et al.* 2018].

Cependant, la neuropathie avec altération des petites fibres nerveuses semble jouer un rôle important dans la finesse épidermique, puisque dans notre modèle de souris STZ, bien que la durée de diabète soit différente entre les D4wk et les D8wk, leur densité IENF et l'épaisseur de leur épiderme ne sont pas différentes. La diminution (versus contrôle) sans évolution de l'IENF et de l'épaisseur épidermique entre différentes durées de diabète a également été rapportée chez le rat STZ (4/6/8 semaines [Kambiz *et al.* 2015], 6/12 mois [Jelicic Kadic *et al.* 2014]).

Les fibres nerveuses cutanées sécrètent de nombreux neuromédiateurs qui peuvent stimuler la prolifération kératinocytaire, comme démontré par la réinnervation d'explants de peau [Lebonvallet *et al.* 2012] ou de modèle *in vitro* 3D de peau [Roggenkamp *et al.* 2013]. Dans ce dernier article, le CGRP est très majoritairement responsable de la contribution des nerfs sur la prolifération et l'épaisseur de l'épiderme. Ainsi, la diminution du CGRP observé dans notre étude pourrait contribuer à la diminution de l'épaisseur de l'épiderme.

La substance P est souvent rapportée comme augmentant la prolifération épidermique dans les revues. Cependant, les études citées [Tanaka *et al.* 1988, Shi *et al.* 2013] ont été réalisées sur lignées de kératinocytes de rongeur, et l'action de la SP sur kératinocytes primaires n'a pas montré d'effet sur leur prolifération [Roggenkamp *et al.* 2013, Blais *et al.* 2014]. Ainsi, même si le taux cutané de SP n'est pas diminué chez les D4wk, cela peut ne pas avoir d'effet bénéfique sur l'épaisseur épidermique.

Les récepteurs au NGF sont exprimés par les nerfs, mais également par les kératinocytes [Shibayama *et al.* 1996, Liang *et al.* 1999]. Or, le NGF est responsable de l'arrêt de la prolifération et de l'entrée en différenciation des kératinocytes lorsqu'il se fixe sur p75NTR [Truzzi *et al.* 2011], contrairement à l'activation de TrkA qui stimule la prolifération épidermique [Pincelli *et al.* 2000]. La forte augmentation de p75NTR avec la neuropathie diabétique (D4wk et D8wk), sans changement de l'expression globale de TrkA, pourrait refléter la modification de la proportion de ces deux récepteurs à la surface des kératinocytes, qui contribuerait à la finesse épidermique.

La finesse épidermique avec le diabète n'a que très peu été reportée chez l'homme. Cependant une tendance à la diminution de l'épaisseur épidermique a été notée dans la peau du pied non lésée chez des patients diabétiques âgés (sans statut neuropathique renseigné) [Wang *et al.* 2011]. Cette différence d'atteinte épidermique avec le diabète entre l'homme et le rongeur peut être due au contrôle de la glycémie, limitant l'apparition des complications.

Sécheresse cutanée

Dans ce travail de thèse, on observe que les souris STZ ont une importante sécheresse cutanée dès 4 semaines, et qui n'est que légèrement aggravée à 8 semaines. Ceci a déjà été rapporté sur souris diabétiques de type 1 dès 2 semaines [Sakai *et al.* 2003], où la composition en lipides du sébum semble altérée. Les glandes sébacées n'étant pas innervées [Reznik 1996], il semble que cette sécheresse soit le résultat de l'hyperglycémie chronique.

Une sécheresse cutanée est également retrouvée chez les patients diabétiques associée à une diminution de l'activité des glandes sébacées [Sakai *et al.* 2005, Seirafi *et al.* 2009], mais aussi à la baisse de la fonction des glandes sudoripares par la neuropathie [Sheshah *et al.* 2016]. Les souris étant dépourvues de glandes sudoripares au niveau de la peau dorsale [Sundberg *et al.* 1996], cette contribution ne peut être observée dans notre modèle.

Diminution de la résistance et de l'élasticité cutanée

Les souris diabétiques neuropathiques ont une peau qui se déforme davantage et revient moins en place que la peau des souris contrôles. Ces propriétés mécaniques cutanées altérées ont déjà été observées chez la souris db/db et chez le patient diabétique, corrélées à la baisse du contenu dermique en collagène de type 1 par l'augmentation en MMP [Bermudez *et al.* 2011]. Dans une autre étude, à l'inverse, une augmentation de la rigidité et une baisse de la déformation cutanées ont été observées chez les patients diabétiques [Argyropoulos *et al.* 2016], mais cette divergence pourrait être due à la réticulation de la matrice extracellulaire, via la glycation [Reihnsner *et al.* 2000] ou l'augmentation de l'enzyme LOX [Argyropoulos *et al.* 2016]. La contribution de la neuropathie dans l'altération des propriétés mécaniques de la peau ne peut être estimée, puisque ces trois études réalisées chez l'homme n'ont pas caractérisé le système nerveux périphérique, et qu'il n'existe pas, à notre connaissance d'étude ayant recherché une éventuelle corrélation entre la présence d'une neuropathie périphérique et ces paramètres.

3. Implication de la neuropathie diabétique dans la gravité de la lésion avec la neuropathie diabétique

Qualité du modèle d'induction de l'ulcère de pression

La plupart des études sur l'ulcère de pression ont montré un développement « bottom-up » (atteinte des tissus profonds puis des tissus superficiels cutanés), notamment en raison de la plus faible résistance des tissus musculaires [Bouten 1996]. En effet lors de la mise au point de notre modèle d'induction de lésion de pression, nous avons observé que la pression seule (avec protection contre le léchage par le film) induisait une dégradation du derme profond jusqu'au muscle cutané, mais que seul l'ajout de la friction permettait la dégradation de l'épiderme. Très peu de publications existent induisant un ulcère de pression chez la souris diabétique de type 1 avec lésion de l'épiderme. L'étude de Demiot *et coll.* [Demiot *et al.* 2011] utilise uniquement des aimants (pas de friction) mais avec une pression très importante (2000 mmHg contre 420 mmHg dans notre modèle). Le kératinocyte, grâce à ses filaments de kératine, est une cellule bien plus résistante à la pression que les autres types cellulaires [Lulevich *et al.* 2010], ainsi la pression utilisée dans notre modèle peut ne pas suffire à induire leur destruction.

Néanmoins, notre modèle semble plus proche des facteurs à l'origine de l'ulcère de pression chez l'homme chez qui la pression au niveau des tissus lors de la position assise ou allongée est de 50 à 500 mmHg [Reilly *et al.* 2007], à laquelle sont associés de minimes mouvements répétés (repositionnement sur une chaise, pied/chaussure) qui induisent une friction et qui, par la

création de forces de cisaillement parallèles à la surface de la peau [Brienza *et al.* 2015], pourraient induire une destruction supra-basale de l'épiderme [Dinsdale 1973, Dinsdale 1974] à l'origine de la lésion ouverte.

Ainsi, notre modèle de lésion réalisé par la répétition d'une pression modérée et d'une friction semble reproduire davantage les facteurs déclenchant l'ulcère de pression au niveau du pied chez le patient diabétique.

Implication des caractéristiques structurelles et physiques cutanées dans la gravité de la lésion avec la neuropathie diabétique

Dans ce travail de thèse, nous avons observé que la surface lésée après compression et friction de la peau était supérieure chez les souris diabétiques neuropathiques, comparativement aux souris contrôles, dès 4 semaines (D4wk), et était encore augmentée après 8 semaines (D8wk). Il semble donc y avoir une relation directe entre le degré de neuropathie diabétique et la résistance de la peau à la combinaison des forces mécaniques de pression et de cisaillement.

Le diabète induit une lâcheté de la peau de souris qui s'accroît à 8 semaines. Or la distorsion tissulaire provoquée par la pression [Bouten *et al.* 2001] induit dommages et mort cellulaire [Oomens *et al.* 2015]. Ainsi lors de la compression par les aimants, l'augmentation de la déformation de la peau par la neuropathie diabétique et sa sévérité peut contribuer à augmenter la surface nécrotique, comparativement à la peau contrôle.

Dans notre étude, l'hydratation des couches superficielles de l'épiderme est également très altérée avec le diabète. Il a été montré que la sécheresse du *Stratum corneum* rendait l'épiderme plus rigide, favorisant sa fissure lors de la déformation [Engebretsen *et al.* 2016] et augmentant les contraintes mécaniques perçues par les tissus sous-jacents [Atlas *et al.* 2009].

La disparition dès le stade D4wk du tissu adipeux (ayant entre autre un rôle de coussin [Joodaki *et al.* 2018]) avec le diabète de type 1 pourrait également participer à la diminution de la résistance de la peau face à la déformation.

Bien que l'épiderme avant lésion soit légèrement plus fin chez les C8wk que chez les C4wk sans différence de surface de lésion de pression, la forte diminution de l'épaisseur de l'épiderme observée avec la neuropathie diabétique pourrait contribuer à la fragilité cutanée.

Implication des neuromédiateurs dans la gravité de la lésion avec la neuropathie diabétique

La peau non lésée des souris D4wk de notre étude présente moins de CGRP, sans différence de la quantité de SP, comparativement aux C4wk. On observe également à J5 un retard d'inflammation (versus C4wk). Or, Danigo et coll. [Danigo *et al.* 2014] ont démontré, dans un modèle de souris neuropathique non diabétique et de souris contrôle avec antagonistes, le rôle protecteur du CGRP et/ou de la SP libérés par les fibres nerveuses contre l'étendue des lésions de pression qui, selon ces auteurs, pourrait être attribué à leur capacité à induire une inflammation neurogène dans les premières heures suivant le retrait des aimants. Ainsi, dans notre modèle *in vivo*, la diminution du CGRP cutané avant lésion pourrait contribuer à l'augmentation de la surface lésée. Ceci semble être confirmé par le modèle *ex vivo*, privé de la sécrétion de neuropeptides par les nerfs, où peau contrôle et peau diabétique développent une lésion équivalente (nécrose cellulaire sur 100% de la zone compressée). Il aurait été intéressant de pouvoir comparer de manière précise l'expression du CGRP et de la SP entre D4wk et D8wk afin d'évaluer la contribution de l'atteinte neuropathique sévère sur ces neuropeptides, mais l'absence de peau parfaitement non lésée dans le groupe C8wk (cf. Annexe 4 page 238) ne permet pas de dissocier l'effet de l'âge ou de l'évolution de la neuropathie diabétique.

Cependant, on constate une quasi-absence de cellules immunitaires à J5 chez les D8wk, ce qui pourrait illustrer une baisse prononcée de l'inflammation neurogène.

D'après la bibliographie et nos observations, il semble donc que l'augmentation de la surface lésée chez les D4wk et les D8wk soit en partie due au diabète lui-même (sécheresse et lâcheté cutanées) et en partie due à la neuropathie périphérique (finesse épidermique, et CGRP/inflammation neurogène). On démontre ainsi que la neuropathie diabétique avec atteinte des petites fibres uniquement altère d'ores et déjà la peau face à la pression/friction.

Le pied diabétique est une lésion qui cicatrise mal voire pas, et les études animales pour mieux comprendre les mécanismes altérés par le diabète et la neuropathie ont essentiellement été réalisées sur plaie d'excision, ce type de plaie ne reproduisant que partiellement le processus de cicatrisation de la lésion de pression. Dans ce travail de thèse, après avoir induit un ulcère de pression/friction chez la souris, nous avons étudié la durée de fermeture selon le degré de neuropathie, et analysé la cinétique de certains marqueurs biologiques pouvant contribuer au retard de cicatrisation.

II. Le diabète et la sévérité de la neuropathie induisent un retard de fermeture de la lésion, potentiellement via l'altération du récepteur au CGRP et de la périostine

Dans ce travail de thèse, nous avons observé un retard de fermeture de la lésion de pression par la présence et la sévérité de la neuropathie diabétique. Ce retard de cicatrisation macroscopique peut être expliqué, outre par le fait que la lésion était plus grande au départ, par un retard de la réépithélialisation et une contraction du tissu lésé moins importante chez les souris diabétiques que chez les souris contrôles.

1. Fermeture de l'ulcère de pression

Intérêt de la grille CROMT pour l'évaluation du jour de fermeture d'une lésion

La plupart des études animales sur la cicatrisation mesurent la surface lésée macroscopique pour évaluer l'éventuel délai de cicatrisation. Dans ces études, le suivi de la surface lésée est généralement réalisé jusqu'à un jour donné où, la surface augmentée dans un groupe versus contrôle est considérée comme un retard de cicatrisation (par exemple : [Tellechea *et al.* 2016]). Lorsque la surface lésée est évaluée jusqu'à disparition (0 mm² de lésion), c'est le jour où la surface lésée est égale à 0mm² qui est considérée comme le jour de « fermeture » (« closed wound ») et qui permet de définir un retard de cicatrisation par rapport au jour de fermeture du groupe contrôle (par exemple : [Wong *et al.* 2015]). Dans ces études, la zone cutanée considérée visuellement comme lésée ou non n'est jamais définie, il peut donc exister une évaluation plus ou moins objective, et certainement différente, entre les multiples études sur animaux.

À notre connaissance, un seul outil a été développé et publié pour l'analyse de l'évolution de la lésion chez l'animal : le EWAT (*experimental wound assessment tool*) [Lima *et al.* 2018]. D'après ses auteurs, cet outil permet de mieux définir et quantifier les différents aspects d'une lésion de pression (8 paramètres dont surface de lésion, couleur de la lésion, aspect des contours, profondeur, couches tissulaires apparentes...), et la somme des paramètres gradés permet d'en évaluer la gravité. Bien que cet outil puisse aider à comparer l'évolution de plusieurs lésions, elle n'a pas été validée pour évaluer sa fermeture.

Dans notre étude nous souhaitons pouvoir comparer la durée de fermeture des lésions, cependant, nous avons constaté qu'il était difficile d'évaluer ce jour puisqu'il subsiste toujours une surface cicatricielle (de quelques mm²) d'aspect plus ou moins rosé ou squameux et de taille variable inter- et intra-groupes, qui n'évolue que très peu en 7 jours (résultats non présentés dans ce mémoire). C'est pourquoi la grille paramétrée CROMT a été développée, et que des critères visuels d'une lésion fermée ont été définis, indépendamment de la surface métrique. Ces critères visuels semblent de plus être corrélés à la présence d'une seule assise kératinocytaire positive pour la kératine 14 démontrant l'entrée en différenciation des couches supérieures [Fuchs *et al.* 1980] et donc l'arrêt de la phase d'hyperprolifération épidermique. Ceci a été confirmé par l'analyse histologique des groupes C/D 4/8wk chez qui l'épaisseur du néoépiderme à Jf est proche de l'épaisseur avant lésion.

L'état du néoderme a également été évalué histologiquement par le laboratoire indépendant (densité de fibroblastes et myofibroblastes, densité de la néovascularisation, proportion des collagènes de types I et III et orientation des fibres), mais il n'a pas été retrouvé de corrélation

entre la fin de la phase proliférative du tissu de granulation (peu/pas de myofibroblastes, densité matricielle importante, vascularisation modérée à faible) et les scores CRoMT (résultats non présentés dans ce mémoire), notamment en raison d'une grande variabilité interindividuelle. C'est pourquoi il est délicat d'interpréter les observations histologiques du derme à Jf dans nos groupes C/D 4/8wk prélevés à des temps différents.

Retard de fermeture en présence de neuropathie diabétique et en fonction de sa sévérité

La surface lésionnelle de l'ulcère de pression évolue très lentement les derniers jours, quel que soit le groupe, mais la grille CRoMT a permis de déterminer qu'il y avait un retard de fermeture de la lésion de pression avec la neuropathie diabétique (D4wk, J23) et sa sévérité (D8wk, J27), comparativement aux groupes contrôles (J19). Il n'existe pas d'étude chez l'animal regardant la cinétique de cicatrisation de l'ulcère de pression jusqu'à fermeture, ni d'étude utilisant ce type de critères visuels pour déterminer la durée de fermeture d'une lésion. Cependant, de nombreux articles ont démontré le retard de cicatrisation post-excision chez l'animal diabétique (type 1 et 2) [Cheng *et al.* 2018]. En outre, il ne semble pas exister d'études comparant la durée de fermeture de lésion chez l'animal avec différentes durées de diabète.

Quelques études cliniques [Ince *et al.* 2007, Yotsu *et al.* 2014] ont tenté de déterminer quels facteurs (degré de neuropathie périphérique, type de durée de diabète, contrôle de la glycémie, âge, artériopathie, infection ...) étaient les plus prédictifs du pronostic de fermeture de l'ulcère du pied diabétique, cependant les résultats divergent, probablement en raison de la grande variabilité de l'historique des patients et de l'étiologie de leurs lésions. De plus, dans ces études, l'évaluation de la neuropathie périphérique est réalisée sans examen histologique ; or les fibres nerveuses cutanées peuvent être déjà endommagées sans signe clinique de neuropathie [Levy *et al.* 1989], ceci démontrant la difficulté d'évaluer le degré de neuropathie dans les études cliniques.

Intérêt du modèle *ex vivo* pour l'évaluation de la réépithélialisation

Le retard de fermeture de l'épiderme *in vivo* peut également être évalué par l'analyse histologique de la peau (par exemple : [Saito *et al.* 2008]), mais cela nécessite la mise à mort, augmentant le nombre d'animaux utilisés dans l'étude.

Dans ce travail de thèse, un modèle *ex vivo* a été développé dans le but futur de limiter l'utilisation d'animaux si ce modèle peut reproduire en partie des aspects de la cicatrisation *in vivo* de l'ulcère de pression diabétique. Nous avons constaté que chez les souris *in vivo* comme sur la peau *ex vivo*, on retrouve un retard de réépidermisation croissant avec la durée de neuropathie diabétique. La peau de souris D4wk en cours de cicatrisation post-compression *ex vivo* sécrète moins d'EGF, PDGF, VEGF et IL-10, et plus d'IL-1beta que la peau contrôle, ce qui a également été observé dans les lésions des patients diabétiques [Galkowska *et al.* 2006, Mirza *et al.* 2013], et elle sécrète moins de IL-1RA, dont la concentration plasmatique est diminuée chez les patients diabétiques de type 1 nouvellement diagnostiqués [Netea *et al.* 1997]. On retrouve également une expression augmentée de sRAGE, déjà rapportée dans la peau de patients diabétiques de type 1 [Bakker *et al.* 2015].

Tout ceci indique que le modèle *ex vivo* de compression pourrait contribuer à l'analyse de certains processus altérés par la neuropathie diabétique et de cribler des actifs permettant leur modulation, avant de valider les résultats *in vivo* sur un plus petit nombre d'animaux.

2. Retard de réépithélialisation potentiellement due à l'altération du récepteur au CGRP

Par l'analyse histologique des lésions de pression à J5 et J10, nous avons observé qu'il y avait un retard de réépithélialisation chez les souris diabétiques (J10 versus J5 chez les contrôles), qui semble être accentué chez les D8wk comparativement aux D4wk. Ceci a été confirmé dans le modèle *ex vivo*.

La réépithélialisation nécessite la migration des kératinocytes au front des berges, et la prolifération des kératinocytes en aval, ces deux zones pouvant être identifiées histologiquement lors de la cicatrisation cutanée chez la souris par l'augmentation de l'épaisseur du néoépiderme au niveau des kératinocytes prolifératifs [Aragona *et al.* 2017].

Dans notre étude, l'épaisseur maximale du néoépiderme est diminuée chez les souris diabétiques neuropathiques à J5 et J10 (sans différence entre D4wk et D8wk), comparativement aux contrôles, démontrant une baisse importante de la prolifération kératinocytaire au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression. Cette observation semble contradictoire avec l'hyperprolifération kératinocytaire observée dans les berges de lésions plantaires chroniques de patients diabétiques [Galkowska *et al.* 2003, Usui *et al.* 2008], cependant dans ces études, l'infection et la présence éventuelle d'une artériopathie pourrait perturber le microenvironnement et être à l'origine de ce phénotype kératinocytaire [Galkowska *et al.* 2003]. De plus, dans notre modèle murin diabétique neuropathique, bien que la fermeture soit retardée, la lésion n'est pas chronique.

Le CGRP stimule la prolifération kératinocytaire [Seike *et al.* 2002, Roggenkamp *et al.* 2013] et son déficit pourrait participer à la finesse du néoépiderme observée et au retard de cicatrisation, cependant, son expression et celle de leur récepteur n'ont jamais été étudiées pendant la cicatrisation avec le diabète.

Dans notre étude, de manière surprenante, bien que le taux de proCGRP soit plus faible dans la peau non lésée des D4wk que des C4wk, à J5 le taux est augmenté et similaire dans les deux groupes. La surexpression toujours présente à J5 des gènes du CGRP par les cellules de la peau des D4wk (Figure 54 A) pourrait participer à cette augmentation.

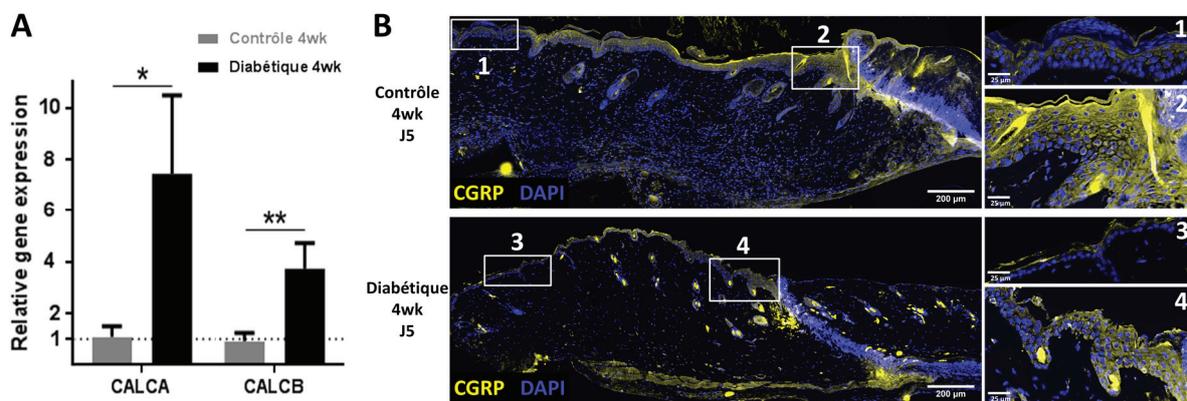


Figure 54. Expression génique et protéique du CGRP dans la peau lésée à J5 des C4wk et D4wk.

A/ Expression génique dans la peau totale lésée à J5 des gènes CALCA et CALCB codant respectivement pour les isoformes alpha et beta du CGRP. Les corps cellulaires des nerfs cutanés étant situés au niveau de la moelle épinière, l'ARNm analysé ici ne provient que des cellules cutanées. n = 3 souris par groupe. Moyenne \pm SD, Test T. Normalisé par les gènes de ménage RPL13A et B2M, et par la moyenne du groupe C4wk dans la peau non lésée à J0. B/ Immunomarquage représentatif du CGRP dans la peau lésée à J5.

L'expression de CGRP par les kératinocytes a précédemment été montré *in vitro* [Hou *et al.* 2011, Roggenkamp *et al.* 2013]. Dans notre étude, l'immunomarquage réalisé sur peau lésée à J5 (Figure 54 B) semble indiquer que l'épiderme est une source majeure de CGRP lors de la cicatrisation de l'ulcère de pression, avec une augmentation de l'immunomarquage entre épiderme non lésé (Figure 54 B, zooms 1 et 3) et berge/néoépiderme (Figure 54 B, zooms 2 et 4) aussi bien chez les contrôles que chez les diabétiques.

Puisque la synthèse de CGRP ne semble pas être affectée durant la cicatrisation avec le diabète, nous avons étudié l'expression de son récepteur spécifique (le complexe RAMP1-CLR-RCP [Hay *et al.* 2018]). L'immunomarquage sur coupe de peau et la quantification par western blot de RAMP1 et CLR au cours de la cicatrisation ont révélé que ces deux protéines sont surexprimées dès J5 chez les C4wk, particulièrement au niveau du néoépiderme, ce qui est cohérent avec l'augmentation transitoire de l'expression génique de RAMP1 observée pendant la formation de l'épiderme reconstruit *in vitro* [Hou *et al.* 2011]. De plus, ces protéines démontrent une localisation intracellulaire au niveau des kératinocytes du néoépiderme épais. À l'inverse, le pic de surexpression de RAMP1 et CLR est retardé à J10 chez les D4wk, avec une localisation qui ne semble pas purement intracellulaire au niveau du néoépiderme épais. Il a été montré *in vitro* que ces deux sous-unités du récepteur au CGRP sont internalisées après l'activation par leur ligand [Cottrell *et al.* 2007], ce qui suggère que dans notre étude, RAMP1 et CLR pourraient ne pas être correctement activés durant la cicatrisation de l'ulcère de pression chez les D4wk.

RAMP1 et CLR sont deux protéines qui peuvent chacune se complexer à d'autres protéines, formant ainsi des récepteurs pour d'autres ligands que le CGRP [Hay *et al.* 2018]. De plus, RAMP1-CLR doit se complexer à RCP au niveau membranaire afin de permettre la signalisation intracellulaire du CGRP [Egea *et al.* 2012]. Par conséquent, nous avons vérifié la présence du complexe RAMP1-CLR-RCP par immunoprécipitation, qui semble indiquer que le complexe est présent dès J5 chez les C4wk mais seulement à J10 chez les D4wk. Ce délai pourrait être expliqué par le fait que CLR n'est surexprimé qu'à J10, et que RAMP1 et CLR doivent être exprimés simultanément pour pouvoir se complexer l'un à l'autre [Kuwasako *et al.* 2000].

RAMP1 joue le rôle de chaperonne pour CLR et permet sa glycosylation sans laquelle le CGRP ne peut pas se fixer au récepteur [Hilairt *et al.* 2001b]. Dans notre étude, bien que le complexe récepteur semble présent à J10 chez les D4wk, le taux de CLR glycosylé observé en western blot, contrairement aux C4wk, n'est pas augmenté. Cela suggère que la maturation du CLR pourrait être affectée chez les D4wk ; tout comme il a déjà été rapporté un défaut de modification post-traductionnelle d'autres protéines avec le diabète [Mellor *et al.* 2015].

En résumé, bien que chez les D4wk l'expression du CGRP ne semble pas être altérée pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression, l'expression de son récepteur est retardée et possiblement non correctement glycosylé, ce qui aboutirait à sa non-fonctionnalité. La correcte expression du CGRP accompagnée d'un défaut d'expression de CLR avec le diabète a déjà été observée chez le rat STZ au niveau cardiaque [Chottová Dvoráková *et al.* 2005].

Dans notre étude, nous avons constaté qu'au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression, le CGRP et ses récepteurs semblaient être majoritairement exprimés par l'épiderme. Dans notre modèle *ex vivo*, en l'absence de systèmes nerveux / immunitaires / vasculaires fonctionnels, la peau diabétique neuropathique réépithélialise moins vite que la peau contrôle, avec un

néoépiderme visuellement plus fin. Il se pourrait donc que le défaut d'expression/formation du récepteur au CGRP soit acquise par l'épiderme et que la peau garde ce phénotype même une fois mise en culture. L'analyse de ce récepteur *ex vivo* pourrait renseigner sur cet éventuel pré-conditionnement par la neuropathie diabétique, ou sur les causes de cette altération.

D'après une récente étude, le CGRP peut se fixer avec la même affinité sur le complexe RAMP1-CLR que sur le complexe RAMP1-CTR (également récepteur de l'amyline) [Hay *et al.* 2018], cependant dans notre étude *in vivo* l'expression de CTR n'a pas été détectée au niveau génique que ce soit dans la peau lésée ou non lésée, diabétique ou contrôle (résultats non présentés). De ce fait, le complexe RAMP1-CLR-RCP est très probablement le principal récepteur au CGRP présent dans la peau de souris dans les conditions d'étude, et son altération chez les D4wk pourrait participer au défaut de cicatrisation observé.

Un défaut de migration des kératinocytes pourrait également participer au retard de réépithélialisation observé ici. Le CGRP n'a pas d'effet démontré sur ce processus, contrairement à la substance P [Blais *et al.* 2014]. Dans notre étude, bien que le niveau de substance P dans la peau totale au cours de la cicatrisation des D4wk ne semble pas très différent de celui des C4wk, l'augmentation du récepteur NK1R est plus lente avec des taux plus faibles à J5 et J10 que chez les C4wk. Si l'expression de NK1R est déficitaire au niveau épidermique, l'action migratoire de la SP pourrait être limitée. Cependant, l'expression génique dans la peau des D4wk des MMP-9, -10 et -13 (MMP caractéristiques de la langue migratoire [Saarialho-Kere *et al.* 1994, Aragona *et al.* 2017]) (cf. Figure S3 en Annexe 5) est augmentée et prolongée par rapport aux C4wk. Il serait donc nécessaire d'approfondir les analyses afin de déterminer s'il y a ou non retard de migration dans notre modèle, d'autant qu'il a déjà été montré une inhibition de la migration kératinocytaire dans la plaie chronique du patient diabétique [Stojadinovic *et al.* 2005].

3. Défaut de contraction de la lésion

Nous avons observé que la surface lésée diminuait moins rapidement entre J7 et J12 chez les souris diabétiques neuropathiques, et qu'à Jf leur surface lésée relative était supérieure à celles des groupes contrôles. Ceci semble indiquer un défaut de contraction de la lésion chez les D4wk et D8wk, qui engendre une surface plus importante à régénérer, allongeant la durée de cicatrisation.

La contraction au cours de la cicatrisation est médiée par l'action contractile des myofibroblastes, à laquelle s'ajoute chez les rongeurs l'effet de la contraction du muscle cutané [Hayward *et al.* 1991]. Cependant, le défaut de contraction observé dans notre étude a déjà été rapporté chez les souris diabétiques [Albertson *et al.* 1993], ainsi que la diminution du nombre de myofibroblastes dans l'ulcère diabétique chez l'homme [Olerud *et al.* 1995].

La modulation de certains marqueurs biologiques étudiés pendant ce travail pourrait contribuer à ce défaut de contraction cutanée.

Potentielle implication des neuromédiateurs

Le CGRP, la SP [Cheret *et al.* 2014, Um *et al.* 2016], le NGF [Palazzo *et al.* 2012] participent à la transition fibroblastes-myofibroblastes.

Le NGF n'est que quasiment pas détecté pendant la cicatrisation chez les souris contrôles et diabétiques, et ne semble donc pas être impliqué dans l'éventuel défaut de contraction des D4wk et D8wk.

L'immunomarquage des sous-unités RAMP1 et CLR pendant la cicatrisation a permis d'observer une expression de ses protéines au niveau du tissu de granulation chez les C4wk, contrairement aux D4wk. L'absence d'expression de ces récepteurs au niveau sous-épidermique chez les D4wk pourrait limiter l'effet contractile du CGRP.

La diminution de l'expression de NK1R, récepteur de la SP, pourrait être le reflet d'un défaut de synthèse de ce récepteur par les fibroblastes, limitant par conséquent leur transformation. La réalisation d'un immunomarquage de NK1R permettrait de vérifier son expression au niveau du tissu de granulation chez la souris diabétique neuropathique.

Potentielle implication de la périostine

Nous avons observé *in vivo* que la périostine n'était pas détectable dans la peau non lésée et à J5, et que son niveau augmentait à J10 et Jf, mais avec un taux plus faible chez les souris diabétiques neuropathiques que chez les souris contrôles. Cette sous-expression de la périostine a été confirmée par l'analyse du sécrétome *ex vivo*.

La périostine est une protéine matricellaire initialement identifiée dans les ostéoblastes et le périoste [Takeshita *et al.* 1993, Horiuchi *et al.* 1999], et ce n'est qu'en 2007 qu'elle a été décrite pour la première fois dans la peau, démontrant son rôle dans la fibrillogenèse du collagène de type I dans le derme [Norris *et al.* 2007] et son implication dans la fibrose cutanée [Wang *et al.* 2007, Yang *et al.* 2012]. Par la suite, il a été démontré que la périostine est faiblement exprimée dans la peau saine, mais qu'au cours de la cicatrisation post-excision chez la souris son expression augmente (pic protéique à J7) avec une localisation dans tout l'épiderme et au niveau extracellulaire dans le tissu de granulation où elle est colocalisée avec α -SMA [Jackson-Boeters *et al.* 2009]. Les études suivantes sur souris ont confirmé cette surexpression spatio-temporelle et ont montré que l'ablation de cette protéine modifie la cinétique de cicatrisation (moins rapide vers J5-J7) [Zhou *et al.* 2010, Nishiyama *et al.* 2011, Elliott *et al.* 2012, Ontsuka *et al.* 2012]. En effet, la périostine et le TGF- β s'autorégulent et induisent la différenciation des fibroblastes dermiques en myofibroblastes [Zhou *et al.* 2010, Kanaoka *et al.* 2018], permettant la contraction de la plaie, ce qui peut contribuer à ce changement de cinétique [Elliott *et al.* 2012]. De plus la périostine favorise la prolifération des myofibroblastes [Crawford *et al.* 2015], augmentant ainsi son effet.

Dans notre étude, la diminution de l'expression de la périostine au niveau dermique chez les D4wk pourrait contribuer à une plus faible contraction du tissu par les myofibroblastes, et expliquerait la différence de cinétique observée entre J7 et J12 et la surface relative plus grande à Jf.

Nous avons également observé une plus faible surexpression de la périostine au niveau du néoépiderme chez les D4wk (versus C4wk), mais le rôle de cette protéine sur les kératinocytes au cours de la cicatrisation n'est à ce jour pas élucidé.

Il n'y a, à ce jour, pas de publication sur l'expression de la périostine avec la cicatrisation cutanée et le diabète permettant de confronter nos résultats.

Chez les patients diabétiques de type 2, la concentration plasmatique de la périostine est augmentée [Luo *et al.* 2016], et corrèle avec la présence d'une néphropathie [El-Dawla *et al.* 2019] ou d'une rétinopathie [Ding *et al.* 2018], et l'expression génique de la périostine est augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané [Graja *et al.* 2018]. Cependant, cette augmentation cutanée pourrait être liée uniquement au type 2 du diabète (et non au type 1), puisque la périostine semble être impliquée dans le métabolisme des adipocytes [Graja *et al.* 2018].

Les résultats de ce travail ont démontré un retard de fermeture de l'ulcère de pression avec la neuropathie diabétique et sa sévérité. Le défaut de contraction de la lésion pourrait notamment être dû à la plus faible expression de la périostine, conduisant à une surface plus grande à régénérer, à laquelle s'ajoute un potentiel défaut de signalisation CGRP/RAMP1-CLR-RCP au niveau épidermique diminuant la prolifération kératinocytaire et la réépithélialisation.

Quels apports de ces résultats de thèse pour la prise en charge des pieds diabétiques ?

Chez le patient diabétique, le diagnostic de neuropathie périphérique est réalisé à l'aide de tests non invasifs tels que celui du Monofilament 10 grammes. La corrélation entre la réponse à ces tests et la vitesse de conduction nerveuse non altérée a été démontrée [Baraz *et al.* 2014], mais ils ne permettent pas d'identifier précocement la neuropathie des petites fibres nerveuses [Yang *et al.* 2018]. De plus, le diagnostic de diabète peut être établi tardivement après le début réel de la pathologie (9 à 12 ans pour le diabète de type 2 [Harris *et al.* 1992]), alors que la densité IENF semble altérée dès 5 ans de diabète [Pittenger *et al.* 2004].

Notre étude a démontré qu'il existe une prédisposition au développement aggravé de l'ulcère de pression dès l'atteinte des petites fibres nerveuses. Il est donc essentiel de développer des tests cliniques spécifiques au diagnostic précoce de la neuropathie diabétique petites fibres, et de considérer ses patients également comme « à risque d'ulcère ».

Nous avons observé que le degré de sévérité de la neuropathie et le délai de fermeture de la lésion étaient corrélés. En l'absence actuelle de traitement ayant démontré son efficacité sur la plaie chronique du pied diabétique, l'identification des patients neuropathiques avant l'atteinte de la conduction nerveuse pourrait permettre de ne pas aboutir au stade de lésion chronique et à l'amputation qui en découle souvent.

Perspectives

Ce travail a permis d'observer une corrélation entre, d'une part, le degré de sévérité de la neuropathie diabétique et, d'autre part, la fragilité cutanée à la pression et la durée de fermeture de l'ulcère de pression. Il sera nécessaire dans un premier temps de compléter l'étude avec l'analyse des marqueurs protéiques à 8 semaines (par exemple en isolant chaque souris contrôle bien avant le prélèvement de la peau « non lésée » pour éviter toute morsure), afin de déterminer quelles sont les variations entre les deux degrés de sévérité de la neuropathie.

Les mécanismes biologiques et voies de signalisation impliqués ne sont pas totalement décryptés, et une étude approfondie serait nécessaire afin de mieux comprendre la part de la neuropathie pure, de l'hyperglycémie, et des éventuelles complications vasculaires additionnelles. Notamment, afin de déterminer l'influence des neuromédiateurs différemment exprimés dans la peau diabétique neuropathique, il serait intéressant de réaliser des immunomarquages et hybridations *in situ* afin d'identifier quels types cellulaires/fibres nerveuses sont responsables de ces dérégulations. De plus, les formes 16 et 65kDa de RAMP1 observées uniquement pendant la cicatrisation chez les souris diabétiques nécessiteraient une analyse approfondie afin de déterminer leur nature (forme tronquée et agrégat, respectivement ?) et leur origine. L'analyse sur le modèle *ex vivo* de l'expression du CGRP et

de son récepteur en fonction de différents stress pourrait être une première approche pour la compréhension des mécanismes à l'origine de la formation de ces formes spécifiques de RAMP1.

Notre étude a été réalisée sur souris diabétique de type 1, or la majeure partie des patients ont un type 2. De nombreuses voies métaboliques peuvent être différemment régulées, et il serait nécessaire de vérifier si les observations (fragilité cutanée et délai de cicatrisation associés au degré de neuropathie, expression du récepteur au CGRP et de la périostine) sont les mêmes dans un modèle de souris diabétique de type 2.

Il existe un modèle de souris RAMP1 KO qui a montré un retard de cicatrisation post-excision, cependant les auteurs n'ont étudié que l'angiogenèse [Kurashige *et al.* 2014]. Réaliser le suivi de cicatrisation de l'ulcère de pression sur ce modèle versus souris wild type permettrait de vérifier l'importance de RAMP1 pour la réépithélialisation.

La possibilité d'analyser des biopsies de peau humaine diabétique provenant de lésions cicatrisantes et chroniques permettrait de savoir si les résultats obtenus en laboratoire sont concordants. La séquence de RAMP1 étant très conservée entre souris et humain [Sexton *et al.* 2001], des formes particulières de cette protéine pourraient également être retrouvées chez le patient diabétique neuropathique, ce qui laisserait entrevoir une application thérapeutique. Par exemple, un actif permettant leur diminution en faveur de la forme 18kDa pourrait permettre d'améliorer la voie CGRP. Le modèle *ex vivo* peut être utilisé dans un premier temps pour cribler des actifs, puis le modèle de lésion *in vivo* associant pression et friction, qui reproduit davantage la lésion du pied diabétique que les modèles existants, peut être utilisé pour tester de nouveaux actifs et étudier leurs effets. Le modèle *in vivo* d'ulcère de pression est d'ailleurs actuellement utilisé au laboratoire pour mieux comprendre les mécanismes d'action d'actifs URGO ayant démontré leur efficacité thérapeutique chez l'homme.

CONCLUSION

Dans ce travail de thèse nous avons mis en évidence pour la première fois que l'altération des petites fibres nerveuses cutanées induite par le diabète prédispose à la fragilité cutanée face à la combinaison de la pression et de la friction, facteurs de risque dans l'apparition de l'ulcère du pied diabétique. En effet, la neuropathie diabétique provoque une sécheresse cutanée, une diminution de l'épaisseur épidermique, et une moindre résistance à la déformation.

De plus, nous avons démontré que la neuropathie diabétique, dès l'atteinte des petites fibres nerveuses cutanées, induit un allongement de la durée de cicatrisation de l'ulcère de pression causé par un retard de formation du néoépiderme et un probable défaut de contraction.

Bien que le diabète induit de nombreuses complications, la modification de l'expression des neuromédiateurs est une cause directe de la neuropathie. L'analyse de l'expression de la voie CGRP a démontré que, bien que ce neuropeptide soit déficitaire dans la peau neuropathique diabétique avant lésion, le CGRP est correctement surexprimé pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression. En revanche, la formation du complexe récepteur au CGRP, RAMP1-CLR-RCP, est perturbée avec la neuropathie diabétique. Cette dysfonction pourrait participer au retard de réépithélialisation, en limitant l'effet prolifératif du CGRP sur les kératinocytes.

En outre, la faible surexpression de la périostine, protéine très récemment décrite au niveau cutané, au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression avec la neuropathie diabétique pourrait restreindre la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et participer au défaut de contraction de la lésion.

Bien que ce travail ait été réalisé sur la souris, des similitudes ont été constatées avec la pathologie humaine. Par conséquent, les résultats obtenus dans cette étude pourraient contribuer à la meilleure connaissance de la neuropathie diabétique et des lésions cutanées qui y sont associées, et conduire au développement de traitements plus spécifiques du pied diabétique, permettant de réduire la durée de cicatrisation et le risque d'amputation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarabi, S., K. A. Bhatt, Y. Shi, J. Paterno, E. I. Chang, S. A. Loh, J. W. Holmes, M. T. Longaker, H. Yee and G. C. Gurtner (2007). "Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis." *Faseb J* **21**(12): 3250-3261.
- Abe, R., S. C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala and C. N. Metz (2001). "Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites." *J Immunol* **166**(12): 7556-7562.
- Abraira, V. E. and D. D. Ginty (2013). "The sensory neurons of touch." *Neuron* **79**(4): 618-639.
- Ackermann, P. W. and D. A. Hart (2013). "Influence of Comorbidities: Neuropathy, Vasculopathy, and Diabetes on Healing Response Quality." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**(8): 410-421.
- Akinduro, O., K. Sully, A. Patel, D. J. Robinson, A. Chikh, G. McPhail, K. M. Braun, M. P. Philpott, C. A. Harwood, C. Byrne, R. F. L. O'Shaughnessy and D. Bergamaschi (2016). "Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation." *J Invest Dermatol* **136**(7): 1460-1470.
- Albertin, G., G. Carraro, P. P. Parnigotto, M. T. Conconi, A. Ziolkowska, L. K. Malendowicz and G. G. Nussdorfer (2003). "Human skin keratinocytes and fibroblasts express adrenomedullin and its receptors, and adrenomedullin enhances their growth in vitro by stimulating proliferation and inhibiting apoptosis." *Int J Mol Med* **11**(5): 635-639.
- Alberts, D. (2012). *Dorland's illustrated medical dictionary (32nd ed.)*. Philadelphia, Saunders/Elsevier.
- Albertson, S., R. P. Hummel, 3rd, M. Breeden and D. G. Greenhalgh (1993). "PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice." *Surgery* **114**(2): 368-372.
- Allan, J., W. Munro and E. Figgins (2016). "Foot deformities within the diabetic foot and their influence on biomechanics: A review of the literature." *Prosthet Orthot Int* **40**(2): 182-192.
- Anand, P., G. Terenghi, G. Warner, P. Kopelman, R. E. Williams-Chestnut and D. V. Sinicropi (1996). "The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy." *Nat Med* **2**(6): 703-707.
- Anghel, S. I. and W. Wahli (2007). "Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma." *Cell Res* **17**(6): 486-511.
- Antezana, M., S. R. Sullivan, M. Usui, N. Gibran, M. Spenny, J. Larsen, J. Ansel, N. Bunnett and J. Olerud (2002). "Neutral endopeptidase activity is increased in the skin of subjects with diabetic ulcers." *J Invest Dermatol* **119**(6): 1400-1404.
- Aragona, M., S. Dekoninck, S. Rulands, S. Lenglez, G. Mascre, B. D. Simons and C. Blanpain (2017). "Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis." *Nat Commun* **8**(14684).
- Argyropoulos, A. J., P. Robichaud, R. M. Balimunkwe, G. J. Fisher, C. Hammerberg, Y. Yan and T. Quan (2016). "Alterations of Dermal Connective Tissue Collagen in Diabetes: Molecular Basis of Aged-Appearing Skin." *PLoS ONE* **11**(4).
- Armstrong, D. G., A. J. M. Boulton and S. A. Bus (2017). "Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence." *N Engl J Med* **376**(24): 2367-2375.
- Ashrafi, M., M. Baguneid and A. Bayat (2016). "The Role of Neuromediators and Innervation in Cutaneous Wound Healing." *Acta Derm Venereol* **96**(5): 587-594.
- Assurance Maladie (2017). Améliorer la qualité du système de santé et maîtriser les dépenses : propositions de l'Assurance Maladie pour 2018.
- Atlas, E., Z. Yizhar, S. Khamis, N. Slomka, S. Hayek and A. Gefen (2009). "Utilization of the foot load monitor for evaluating deep plantar tissue stresses in patients with diabetes: proof-of-concept studies." *Gait Posture* **29**(3): 377-382.
- Ayuk, S. M., H. Abrahamse and N. N. Houreld (2016). "The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation." *J Diabetes Res* **2016**: 2897656.
- Bakker, S. F., M. E. Tushuizen, E. Gozutok, A. Ciftci, K. A. Gelderman, C. J. Mulder and S. Simsek (2015). "Advanced glycation end products (AGEs) and the soluble receptor for AGE (sRAGE) in patients with type 1 diabetes and coeliac disease." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **25**(2): 230-235.
- Baltzis, D., I. Eleftheriadou and A. Veves (2014). "Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights." *Adv Ther* **31**(8): 817-836.
- Banerjee, S., J. Evanson, E. Harris, S. L. Lowe, K. A. Thomasson and J. E. Porter (2006). "Identification of specific calcitonin-like receptor residues important for calcitonin gene-related peptide high affinity binding." *BMC Pharmacol* **6**(9): 1471-2210.
- Bannon, P., S. Wood, T. Restivo, L. Campbell, M. J. Hardman and K. A. Mace (2013). "Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice." *Dis Model Mech* **6**(6): 1434-1447.

- Baraz, S., K. Zarea, H. B. Shahbazian and S. M. Latifi (2014). "Comparison of the accuracy of monofilament testing at various points of feet in peripheral diabetic neuropathy screening." *J Diabetes Metab Disord* **13**(1): 19.
- Bäsler, K., S. Bergmann, M. Heisig, A. Naegel, M. Zorn-Kruppa and J. M. Brandner (2016). "The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption." *J Control Release* **242**: 105-118.
- Baumbauer, K. M., J. J. DeBerry, P. C. Adelman, R. H. Miller, J. Hachisuka, K. H. Lee, S. E. Ross, H. R. Koerber, B. M. Davis and K. M. Albers (2015). "Keratinocytes can modulate and directly initiate nociceptive responses." *Elife* **4**: e09674.
- Bayat, A., D. A. McGrouther and M. W. Ferguson (2003). "Skin scarring." *Bmj* **326**(7380): 88-92.
- Beckman, J. A. and M. A. Creager (2016). "Vascular Complications of Diabetes." *Circ Res* **118**(11): 1771-1785.
- Benavides, F., T. M. Oberyszyn, A. M. VanBuskirk, V. E. Reeve and D. F. Kusewitt (2009). "The hairless mouse in skin research." *J Dermatol Sci* **53**(1): 10-18.
- Bermudez, D. M., B. J. Herdrich, J. Xu, R. Lind, D. P. Beason, M. E. Mitchell, L. J. Soslowsky and K. W. Liechty (2011). "Impaired biomechanical properties of diabetic skin implications in pathogenesis of diabetic wound complications." *Am J Pathol* **178**(5): 2215-2223.
- Bernard, B. A. (2017). "The hair follicle enigma." *Exp Dermatol* **26**(6): 472-477.
- Bessou, P. and E. R. Perl (1969). "Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli." *J Neurophysiol* **32**(6): 1025-1043.
- Biessels, G. J., V. Bril, N. A. Calcutt, N. E. Cameron, M. A. Cotter, R. Dobrowsky, E. L. Feldman, P. Fernyhough, J. Jakobsen, R. A. Malik, A. P. Mizisin, P. J. Oates, I. G. Obrosova, R. Pop-Busui, J. W. Russell, A. A. Sima, M. J. Stevens, R. E. Schmidt, S. Tesfaye, A. Veves, A. I. Vinik, D. E. Wright, S. Yagihashi, M. A. Yorek, D. Ziegler and D. W. Zochodne (2014). "Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab)." *J Peripher Nerv Syst* **19**(2): 77-87.
- Biga, L. M., S. Dawson, A. Harwell, R. Hopkins, J. Kaufmann, M. LeMaster, P. Matern, K. Morrison-Graham, D. Quick and J. Runyeon (2019). *Anatomy & Physiology. Section 5.1 Layers of the Skin*. O. S. University.
- Bitar, M. S. (2019). "Diabetes Impairs Angiogenesis and Induces Endothelial Cell Senescence by Up-Regulating Thrombospondin-CD47-Dependent Signaling." *Int J Mol Sci* **20**(3).
- Blais, M., L. Mottier, M. A. Germain, S. Bellenfant, S. Cadau and F. Berthod (2014). "Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model." *Tissue Eng Part A* **20**(15-16): 2180-2188.
- Bora, P. and A. S. Majumdar (2017). "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation." *Stem Cell Res Ther* **8**(1): 145.
- Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." *J Invest Dermatol* **112**(4): 411-418.
- Boulais, N. and L. Misery (2007). "Merkel cells." *J Am Acad Dermatol* **57**(1): 147-165.
- Boulton, A. J. (2013). "The pathway to foot ulceration in diabetes." *Med Clin North Am* **97**(5): 775-790.
- Boulton, A. J., L. Vileikyte, G. Ragnarson-Tennvall and J. Apelqvist (2005). "The global burden of diabetic foot disease." *Lancet* **366**(9498): 1719-1724.
- Bouten, C. (1996). "Etiology and pathology of pressure sores: a literature review."
- Bouten, C. V., M. M. Knight, D. A. Lee and D. L. Bader (2001). "Compressive deformation and damage of muscle cell subpopulations in a model system." *Ann Biomed Eng* **29**(2): 153-163.
- Brain, S. D. and P. K. Moore (1999). *Progress in Inflammation Research, Section Pain and neurogenic inflammation*. Basel, Birkhäuser.
- Brain, S. D., T. J. Williams, J. R. Tippins, H. R. Morris and I. MacIntyre (1985). "Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator." *Nature* **313**(5997): 54-56.
- Branchet-Gumila, M. C., S. Boisnic, Y. Le Charpentier, I. Nonotte, C. Montastier and L. Breton (1999). "Neurogenic modifications induced by substance P in an organ culture of human skin." *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **12**(4): 211-220.
- Braun, L. R., W. A. Fisk, H. Lev-Tov, R. S. Kirsner and R. R. Isseroff (2014). "Diabetic foot ulcer: an evidence-based treatment update." *Am J Clin Dermatol* **15**(3): 267-281.
- Braverman, I. M. (2000). "The cutaneous microcirculation." *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**(1): 3-9.

- Breathnach, A. S. (1977). "Electron microscopy of cutaneous nerves and receptors." *J Invest Dermatol* **69**(1): 8-26.
- Breitkreutz, D., I. Koxholt, K. Thiemann and R. Nischt (2013). "Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan." *Biomed Res Int* **2013**: 179784.
- Brem, H., O. Stojadinovic, R. F. Diegelmann, H. Entero, B. Lee, I. Pastar, M. Golinko, H. Rosenberg and M. Tomic-Canic (2007a). "Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement." *Mol Med* **13**(1-2): 30-39.
- Brem, H. and M. Tomic-Canic (2007b). "Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes." *J Clin Invest* **117**(5): 1219-1222.
- Brienza, D., S. Antokal, L. Herbe, S. Logan, J. Maguire, J. Van Ranst and A. Siddiqui (2015). "Friction-induced skin injuries-are they pressure ulcers? An updated NPUAP white paper." *J Wound Ostomy Continence Nurs* **42**(1): 62-64.
- Briggaman, R. A. and C. E. Wheeler, Jr. (1975). "The epidermal-dermal junction." *J Invest Dermatol* **65**(1): 71-84.
- Brown, L. F., K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak and L. van de Water (1992). "Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing." *J Exp Med* **176**(5): 1375-1379.
- Buckley, G., J. Wong, A. D. Metcalfe and M. W. Ferguson (2012). "Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds." *J Anat* **220**(1): 3-12.
- Bulkley, G. B. (1987). "Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review." *Br J Cancer Suppl* **8**: 66-73.
- Byrd, A. L., Y. Belkaid and J. A. Segre (2018). "The human skin microbiome." *Nat Rev Microbiol* **16**(3): 143-155.
- Caballero, A. E., S. Arora, R. Saouaf, S. C. Lim, P. Smakowski, J. Y. Park, G. L. King, F. W. LoGerfo, E. S. Horton and A. Veves (1999). "Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes." *Diabetes* **48**(9): 1856-1862.
- Cai, W. Q., P. Bodin, A. Loesch, A. Sexton and G. Burnstock (1993). "Endothelium of human umbilical blood vessels: ultrastructural immunolocalization of neuropeptides." *J Vasc Res* **30**(6): 348-355.
- Callaghan, B. C., H. T. Cheng, C. L. Stables, A. L. Smith and E. L. Feldman (2012). "Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments." *Lancet Neurol* **11**(6): 521-534.
- Candi, E., R. Schmidt and G. Melino (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 328-340.
- Cardoso, A. L., M. M. Bachion, J. M. Morais, M. S. Fantinati, V. L. Almeida and R. S. J. Lino (2016). "Adipose tissue stromal vascular fraction in the treatment of full thickness burns in rats." *Acta Cir Bras* **31**(9): 578-585.
- Caselli, A., H. Pham, J. M. Giurini, D. G. Armstrong and A. Veves (2002). "The forefoot-to-rearfoot plantar pressure ratio is increased in severe diabetic neuropathy and can predict foot ulceration." *Diabetes Care* **25**(6): 1066-1071.
- Caterina, M. J. and D. Julius (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." *Annu Rev Neurosci* **24**: 487-517.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-824.
- Centre Européen d'Etude du Diabète. "Le diabète, les chiffres." Retrieved 04 juin 2019, from <http://ceed-diabete.org/fr/le-diabete/les-chiffres/>.
- Chen, B., Y. W. Niu, T. Xie, M. Y. Miao, M. Tian, X. Y. Ji, C. Qing and S. L. Lu (2011). "[Relationship between cutaneous glycometabolic disorders and cutaneous neuropathy in diabetic rats]." *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* **27**(2): 139-144.
- Chen, X. F., W. D. Lin, S. L. Lu, T. Xie, K. Ge, Y. Q. Shi, J. J. Zou, Z. M. Liu and W. Q. Liao (2010). "Mechanistic study of endogenous skin lesions in diabetic rats." *Exp Dermatol* **19**(12): 1088-1095.
- Cheng, K. Y., Z. H. Lin, Y. P. Cheng, H. Y. Chiu, N. L. Yeh, T. K. Wu and J. S. Wu (2018). "Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet." *Sci Rep* **8**(1): 12214.

- Cheret, J., N. Lebonvallet, V. Buhe, J. L. Carre, L. Misery and C. Le Gall-Ianotto (2014). "Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process." *J Dermatol Sci* **74**(3): 193-203.
- Cheret, J., N. Lebonvallet, J. L. Carre, L. Misery and C. Le Gall-Ianotto (2013). "Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing." *Wound Repair Regen* **21**(6): 772-788.
- Chiarelli, F., C. Giannini and M. Primavera (2019). "Prediction and prevention of type 1 diabetes in children." *Clin Pediatr Endocrinol* **28**(3): 43-57.
- Chilton, L., A. Middlemas, N. Gardiner and D. R. Tomlinson (2004). "The p75 neurotrophin receptor appears in plasma in diabetic rats-characterisation of a potential early test for neuropathy." *Diabetologia* **47**(11): 1924-1930.
- Choksi, T., D. L. Hay, S. Legon, D. R. Poyner, S. Hagner, S. R. Bloom and D. M. Smith (2002). "Comparison of the expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) with CGRP and adrenomedullin binding in cell lines." *Br J Pharmacol* **136**(5): 784-792.
- Chottová Dvoráková, M., J. Kuncová, U. Pfeil, G. P. McGregor, J. Švíglerová, J. Slavíková and W. Kummer (2005). "Cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetes involves intra-axonal accumulation of calcitonin gene-related peptide and altered expression of its receptor in rats." *Neuroscience* **134**(1): 51-58.
- Christianson, J. A., J. T. Riekhof and D. E. Wright (2003). "Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice." *Exp Neurol* **179**(2): 188-199.
- Clausen, M. L. and T. Agner (2016). "Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier." *Curr Probl Dermatol* **49**: 38-46.
- Clementi, G., M. Amico-Roxas, A. Caruso, V. M. Catena Cutuli, A. Prato, S. Maugeri, E. de Bernardis and U. Scapagnini (1994). "Effects of CGRP in different models of mouse ear inflammation." *Life Sci* **54**(8): L119-124.
- Clementi, G., A. Caruso, V. M. Cutuli, A. Prato, E. de Bernardis, C. E. Fiore and M. Amico-Roxas (1995). "Anti-inflammatory activity of amylin and CGRP in different experimental models of inflammation." *Life Sci* **57**(14): L193-197.
- Cohen, P. and B. M. Spiegelman (2016). "Cell biology of fat storage." *Mol Biol Cell* **27**(16): 2523-2527.
- Copeland, N. G., N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, J. T. Eppig, L. J. Maltais, J. C. Miller, W. F. Dietrich, A. Weaver, S. E. Lincoln, R. G. Steen and et al. (1993). "A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects." *Science* **262**(5130): 57-66.
- Cormack, D. (1987). *Ham's Histology, 9th edition, Chapter The integumentary system*. Philadelphia, J.B. Lippincott Company.
- Coste, B., B. Xiao, J. S. Santos, R. Syeda, J. Grandl, K. S. Spencer, S. E. Kim, M. Schmidt, J. Mathur, A. E. Dubin, M. Montal and A. Patapoutian (2012). "Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels." *Nature* **483**(7388): 176-181.
- Cottrell, G. S., B. Padilla, S. Pikios, D. Roosterman, M. Steinhoff, E. F. Grady and N. W. Bunnett (2007). "Post-endocytic sorting of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 1." *J Biol Chem* **282**(16): 12260-12271.
- Crawford, J., K. Nygard, B. S. Gan and D. B. O'Gorman (2015). "Periostin induces fibroblast proliferation and myofibroblast persistence in hypertrophic scarring." *Exp Dermatol* **24**(2): 120-126.
- Cueille, C. and J. M. Garel (2004). "[RAMPs and G protein coupled receptors]." *Med Sci* **20**(8-9): 773-778.
- Cui, F. F., Y. Y. Pan, H. H. Xie, X. H. Wang, H. X. Shi, J. Xiao, H. Y. Zhang, H. T. Chang and L. P. Jiang (2016). "Pressure Combined with Ischemia/Reperfusion Injury Induces Deep Tissue Injury via Endoplasmic Reticulum Stress in a Rat Pressure Ulcer Model." *Int J Mol Sci* **17**(3): 284.
- Cui, Y. Y., H. Xu, H. H. Wu, J. Qi, J. Shi and Y. Q. Li (2014). "Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats." *PLoS ONE* **9**(7).
- Dallos, A., M. Kiss, H. Polyanka, A. Dobozy, L. Kemeny and S. Husz (2006). "Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes." *Neuropeptides* **40**(4): 251-263.

- Danigo, A., L. Magy and C. Demiot (2013). "[TRPV1 in neuropathic pain: from animal models to therapeutical prospects]." *Med Sci* **29**(6-7): 597-606.
- Danigo, A., L. Magy, L. Richard, A. Desmoulière, S. Bourthoumieu, B. Funalot and C. Demiot (2014). "Neuroprotective Effect of Erythropoietin against Pressure Ulcer in a Mouse Model of Small Fiber Neuropathy." *PLoS ONE* **9**(11): e113454.
- De Gregorio, C., D. Contador, M. Campero, M. Ezquer and F. Ezquer (2018). "Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus." *Biol Open* **7**(9).
- de Wert, L. A., D. L. Bader, C. W. Oomens, L. Schoonhoven, M. Poeze and N. D. Bouvy (2015). "A new method to evaluate the effects of shear on the skin." *Wound Repair Regen* **23**(6): 885-890.
- Deckers, J., H. Hammad and E. Hoste (2018). "Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease." *Front Immunol* **9**: 93.
- Delgado, A. V., A. T. McManus and J. P. Chambers (2005). "Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model." *Exp Biol Med* **230**(4): 271-280.
- Demiot, C., V. Sarrazy, J. Javellaud, L. Gourloi, L. Botelle, N. Oudart and J.-M. Achard (2011). "Erythropoietin Restores C-Fiber Function and Prevents Pressure Ulcer Formation in Diabetic Mice." *Journal of Investigative Dermatology* **131**(11): 2316-2322.
- Denda, M., M. Tsutsumi, M. Goto, K. Ikeyama and S. Denda (2010). "Topical application of TRPA1 agonists and brief cold exposure accelerate skin permeability barrier recovery." *J Invest Dermatol* **130**(7): 1942-1945.
- Denecker, G., P. Ovaere, P. Vandenabeele and W. Declercq (2008). "Caspase-14 reveals its secrets." *J Cell Biol* **180**(3): 451-458.
- Derbenev, A. V. and A. Zsombok (2016). "Potential therapeutic value of TRPV1 and TRPA1 in diabetes mellitus and obesity." *Semin Immunopathol* **38**(3): 397-406.
- Desmoulière, A., M. Redard, I. Darby and G. Gabbiani (1995). "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar." *Am J Pathol* **146**(1): 56-66.
- Desta, T., J. Li, T. Chino and D. T. Graves (2010). "Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds." *J Dent Res* **89**(6): 609-614.
- Ding, Y., Q. Ge, H. Qu, Z. Feng, J. Long, Q. Wei, Q. Zhou, R. Wu, L. Yao and H. Deng (2018). "Increased serum periostin concentrations are associated with the presence of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus." *J Endocrinol Invest* **41**(8): 937-945.
- Dinh, T., F. Tecilazich, A. Kafanas, J. Doupis, C. Gnardellis, E. Leal, A. Tellechea, L. Pradhan, T. E. Lyons, J. M. Giurini and A. Veves (2012). "Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration." *Diabetes* **61**(11): 2937-2947.
- Dinsdale, S. M. (1973). "Decubitus ulcers in swine: light and electron microscopy study of pathogenesis." *Arch Phys Med Rehabil* **54**(2): 51-56.
- Dinsdale, S. M. (1974). "Decubitus ulcers: role of pressure and friction in causation." *Arch Phys Med Rehabil* **55**(4): 147-152.
- Diridollou, S., F. Patat, F. Gens, L. Vaillant, D. Black, J. M. Lagarde, Y. Gall and M. Berson (2000). "In vivo model of the mechanical properties of the human skin under suction." *Skin Res Technol* **6**(4): 214-221.
- Divisova, S., E. Vlckova, I. Srotova, S. Kincova, M. Skorna, L. Dusek, P. Dubovy and J. Bednarik (2016). "Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus." *Diabet Med* **33**(5): 650-654.
- Domingueti, C. P., L. M. Dusse, M. Carvalho, L. P. de Sousa, K. B. Gomes and A. P. Fernandes (2016). "Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications." *J Diabetes Complications* **30**(4): 738-745.
- Dong, M. W., M. Li, J. Chen, T. T. Fu, K. Z. Lin, G. H. Ye, J. G. Han, X. P. Feng, X. B. Li, L. S. Yu and Y. Y. Fan (2016). "Activation of alpha7nAChR Promotes Diabetic Wound Healing by Suppressing AGE-Induced TNF-alpha Production." *Inflammation* **39**(2): 687-699.
- Dovi, J. V., A. M. Szpaderska and L. A. DiPietro (2004). "Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury?" *Thromb Haemost* **92**(2): 275-280.
- Drela, E., K. Stankowska, A. Kulwas and D. Rosc (2012). "Endothelial progenitor cells in diabetic foot syndrome." *Adv Clin Exp Med* **21**(2): 249-254.

- Driskell, R. R., C. A. Jahoda, C. M. Chuong, F. M. Watt and V. Horsley (2014). "Defining dermal adipose tissue." *Exp Dermatol* **23**(9): 629-631.
- Driskell, R. R. and F. M. Watt (2015). "Understanding fibroblast heterogeneity in the skin." *Trends Cell Biol* **25**(2): 92-99.
- Duo, L., L. Hu, N. Tian, G. Cheng, H. Wang, Z. Lin, Y. Wang and Y. Yang (2018). "TRPV1 gain-of-function mutation impairs pain and itch sensations in mice." *Mol Pain* **14**: 1744806918762031.
- Dyck, P. J., K. M. Kratz, J. L. Karnes, W. J. Litchy, R. Klein, J. M. Pach, D. M. Wilson, P. C. O'Brien, L. J. Melton, 3rd and F. J. Service (1993). "The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study." *Neurology* **43**(4): 817-824.
- Eckert, R. L., J. F. Crish, T. Efimova, S. R. Dashti, A. Deucher, F. Bone, G. Adhikary, G. Huang, R. Gopalakrishnan and S. Balasubramanian (2004). "Regulation of involucrin gene expression." *J Invest Dermatol* **123**(1): 13-22.
- Edmonds, M. (2013). "Modern treatment of infection and ischaemia to reduce major amputation in the diabetic foot." *Curr Pharm Des* **19**(27): 5008-5015.
- Edsberg, L. E., J. M. Black, M. Goldberg, L. McNichol, L. Moore and M. Sieggreen (2016). "Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System: Revised Pressure Injury Staging System." *J Wound Ostomy Continence Nurs* **43**(6): 585-597.
- Edwards, R. and K. G. Harding (2004). "Bacteria and wound healing." *Curr Opin Infect Dis* **17**(2): 91-96.
- Egea, S. C. and I. M. Dickerson (2012). "Direct interactions between calcitonin-like receptor (CLR) and CGRP-receptor component protein (RCP) regulate CGRP receptor signaling." *Endocrinology* **153**(4): 1850-1860.
- El-Dawla, N. M. Q., A. M. Sallam, M. H. El-Hefnawy and H. O. El-Mesallamy (2019). "E-cadherin and periostin in early detection and progression of diabetic nephropathy: epithelial-to-mesenchymal transition." *Clin Exp Nephrol* [**Epub ahead of print**].
- Elias, P. M. (1983). "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation." *J Invest Dermatol* **80**(1 Suppl): 44s-49s.
- Elliott, C. G., J. Wang, X. Guo, S. W. Xu, M. Eastwood, J. Guan, A. Leask, S. J. Conway and D. W. Hamilton (2012). "Periostin modulates myofibroblast differentiation during full-thickness cutaneous wound repair." *J Cell Sci* **125**(Pt 1): 121-132.
- Emanuelli, C., M. B. Salis, A. Pinna, G. Graiani, L. Manni and P. Madeddu (2002). "Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs." *Circulation* **106**(17): 2257-2262.
- Emanuelli, T., A. Burgeiro and E. Carvalho (2016). "Effects of insulin on the skin: possible healing benefits for diabetic foot ulcers." *Arch Dermatol Res* **308**(10): 677-694.
- Engelbrechtsen, K. A., J. D. Johansen, S. Kezic, A. Linneberg and J. P. Thyssen (2016). "The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis." *J Eur Acad Dermatol Venereol* **30**(2): 223-249.
- Engin, C. (1998). "Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: a preliminary report." *Plast Reconstr Surg* **101**(7): 1887-1890.
- Epstein, E. H., Jr. (1974). "(Alpha1(3))3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life." *J Biol Chem* **249**(10): 3225-3231.
- Evans, B. N., M. I. Rosenblatt, L. O. Mnayer, K. R. Oliver and I. M. Dickerson (2000). "CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors." *J Biol Chem* **275**(40): 31438-31443.
- Evans, J. L. and I. D. Goldfine (2016). "A New Road for Treating the Vascular Complications of Diabetes: So Let's Step on the Gas." *Diabetes* **65**(2): 346-348.
- Fadini, G. P., L. Menegazzo, M. Rigato, V. Scattolini, N. Poncina, A. Bruttocao, S. Ciciliot, F. Mammano, C. D. Ciubotaru, E. Brocco, M. C. Marescotti, R. Cappellari, G. Arrigoni, R. Million, S. Vigili de Kreutzenberg, M. Albiero and A. Avogaro (2016). "NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans." *Diabetes* **65**(4): 1061-1071.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott and P. M. Henson (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." *J Clin Invest* **101**(4): 890-898.

- Fajuyigbe, D., S. M. Lwin, B. L. Diffey, R. Baker, D. J. Tobin, R. P. E. Sarkany and A. R. Young (2018). "Melanin distribution in human epidermis affords localized protection against DNA photodamage and concurs with skin cancer incidence difference in extreme phototypes." *Faseb J* **32**(7): 3700-3706.
- Fang, X., L. Djouhri, S. McMullan, C. Berry, K. Okuse, S. G. Waxman and S. N. Lawson (2005). "trkA is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors." *J Neurosci* **25**(19): 4868-4878.
- Faradji, V. and J. Sotelo (1990). "Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy." *Acta Neurol Scand* **81**(5): 402-406.
- Feingold, K. R. and P. M. Elias (2014). "Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier." *Biochim Biophys Acta* **1841**(3): 280-294.
- Flahaut, M., B. C. Rossier and D. Firsov (2002). "Respective roles of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying proteins (RAMP) in cell surface expression of CRLR/RAMP heterodimeric receptors." *J Biol Chem* **277**(17): 14731-14737.
- Flier, J. S. (1995). "The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway?" *Cell* **80**(1): 15-18.
- Fosse-Edorh, S., L. Mandereau-Bruno and C. Piffaretti (2018). Le poids du diabète en France en 2016. Synthèse épidémiologique., Santé publique France.
- Fouchard, M., L. Misery, R. Le Garrec, D. Sigaudou-Roussel and B. Fromy (2019). "Alteration of Pressure-Induced Vasodilation in Aging and Diabetes, a Neuro-Vascular Damage." *Front Physiol* **10**: 862.
- Fraser, N. J., A. Wise, J. Brown, L. M. McLatchie, M. J. Main and S. M. Foord (1999). "The amino terminus of receptor activity modifying proteins is a critical determinant of glycosylation state and ligand binding of calcitonin receptor-like receptor." *Mol Pharmacol* **55**(6): 1054-1059.
- Fuchs, E. and H. Green (1980). "Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte." *Cell* **19**(4): 1033-1042.
- Fuchs, E. and S. Raghavan (2002). "Getting under the skin of epidermal morphogenesis." *Nat Rev Genet* **3**(3): 199-209.
- Fujiwara, T., T. Kubo, S. Kanazawa, K. Shingaki, M. Taniguchi, S. Matsuzaki, G. C. Gurtner, M. Tohyama and K. Hosokawa (2013). "Direct contact of fibroblasts with neuronal processes promotes differentiation to myofibroblasts and induces contraction of collagen matrix in vitro." *Wound Repair Regen* **21**(4): 588-594.
- Gagnon, D. and C. G. Crandall (2018). "Sweating as a heat loss thermoeffector." *Handb Clin Neurol* **156**: 211-232.
- Galiano, R. D., O. M. Tepper, C. R. Pelo, K. A. Bhatt, M. Callaghan, N. Bastidas, S. Bunting, H. G. Steinmetz and G. C. Gurtner (2004). "Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells." *Am J Pathol* **164**(6): 1935-1947.
- Galkowska, H., W. L. Olszewsk, U. Wojewodzka, J. Mijal and E. Filipiuk (2003). "Expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers." *Surgery* **134**(2): 213-220.
- Galkowska, H., U. Wojewodzka and W. L. Olszewski (2006). "Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers." *Wound Repair Regen* **14**(5): 558-565.
- Gallik, S. (2013, 2013). "HistologyOLM, The on-line laboratory manual for mammalian histology." Retrieved 19/07/2019, from http://stevegallik.org/sites/histologyolm.stevegallik.org/htmlpages/HOLM_Chapter12_Page08.html.
- Gaudillere, A., L. Misery, C. Souchier, A. Claudy and D. Schmitt (1996). "Intimate associations between PGP9.5-positive nerve fibres and Langerhans cells." *Br J Dermatol* **135**(2): 343-344.
- Geerligts, M., C. Oomens, P. Ackermans, F. Baaijens and G. Peters (2011). "Linear shear response of the upper skin layers." *Biorheology* **48**(3-4): 229-245.
- Gherardini, G., A. Gurlek, S. M. Milner, A. Matarasso, G. R. Evans, J. Jernbeck and T. Lundeberg (1998). "Calcitonin gene-related peptide improves skin flap survival and tissue inflammation." *Neuropeptides* **32**(3): 269-273.

- Gibbins, I. L., D. Wattchow and B. Coventry (1987). "Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin." *Brain Res* **414**(1): 143-148.
- Gibran, N. S., Y. C. Jang, F. F. Isik, D. G. Greenhalgh, L. A. Muffley, R. A. Underwood, M. L. Usui, J. Larsen, D. G. Smith, N. Bunnett, J. C. Ansel and J. E. Olerud (2002). "Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus." *J Surg Res* **108**(1): 122-128.
- Gibran, N. S., R. Tamura, R. Tsou and F. F. Isik (2003). "Human dermal microvascular endothelial cells produce nerve growth factor: implications for wound repair." *Shock* **19**(2): 127-130.
- Goh, C. C., M. Evrard, S. Z. Chong, Y. Tan, L. L. Tan, K. W. W. Teng, W. Weninger, D. L. Becker, H. L. Tey, E. W. Newell, B. Liu and L. G. Ng (2018). "The impact of ischemia-reperfusion injuries on skin resident murine dendritic cells." *Eur J Immunol*. **48**(6): 1014-1019.
- Goldman, A., S. Harper and D. W. Speicher (2016). "Detection of Proteins on Blot Membranes." *Curr Protoc Protein Sci* **86**(10): 1-10.
- Goldsmith, L. A., S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, D. J. Leffell and K. Wolff (2012). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8e édition*.
- Golebiewska, E. and A. Poole (2015). "Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond." *Blood Rev* **29**(3): 153-162.
- Goren, I., E. Muller, J. Pfeilschifter and S. Frank (2006). "Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-alpha." *Am J Pathol* **168**(3): 765-777.
- Gouin, O., K. L'Herondelle, N. Lebonvallet, C. Le Gall-Ianotto, M. Sakka, V. Buhe, E. Plee-Gautier, J. L. Carre, L. Lefeuvre, L. Misery and R. Le Garrec (2017). "TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization." *Protein Cell* **8**(9): 644-661.
- Gould, J. (2018). "Superpowered skin." *Nature* **563**(7732): S84-S85.
- Grada, A., J. Mervis and V. Falanga (2018). "Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing." *J Invest Dermatol* **138**(10): 2095-2105.
- Graja, A., F. Garcia-Carrizo, A. M. Jank, S. Gohlke, T. H. Ambrosi, W. Jonas, S. Ussar, M. Kern, A. Schurmann, K. Aleksandrova, M. Bluher and T. J. Schulz (2018). "Loss of periostin occurs in aging adipose tissue of mice and its genetic ablation impairs adipose tissue lipid metabolism." *Aging Cell* **17**(5): e12810.
- Greenman, R. L., S. Panasyuk, X. Wang, T. E. Lyons, T. Dinh, L. Longoria, J. M. Giurini, J. Freeman, L. Khaodhiar and A. Veves (2005). "Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot." *Lancet* **366**(9498): 1711-1717.
- Groop, L. (2000). "Pathogenesis of type 2 diabetes: the relative contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion." *Int J Clin Pract Suppl*(113): 3-13.
- Haegerstrand, A., C. J. Dalsgaard, B. Jonzon, O. Larsson and J. Nilsson (1990). "Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3299-3303.
- Hamberger, B. and K. A. Norberg (1964). "Histochemical Demonstration of Catecholamines in Fresh Frozen Sections." *J Histochem Cytochem* **12**: 48-49.
- Hara, M., M. Toyoda, M. Yaar, J. Bhawan, E. M. Avila, I. R. Penner and B. A. Gilchrest (1996). "Innervation of melanocytes in human skin." *J Exp Med* **184**(4): 1385-1395.
- Harding, K. G., H. L. Morris and G. K. Patel (2002). "Science, medicine and the future: healing chronic wounds." *BMJ* **324**(7330): 160-163.
- Harris, M. I., R. Klein, T. A. Welborn and M. W. Knuiman (1992). "Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis." *Diabetes Care* **15**(7): 815-819.
- Hart, K. (2019, 2019). "Histology Photomicrographs for Human Anatomy and Physiology course at Peninsula College, Section Adipose tissue." Retrieved 19/07/2019, from <https://eugraph.com/histology/ctprop/adip.html>.
- Hartopo, A. B., N. Emoto, N. Vignon-Zellweger, Y. Suzuki, K. Yagi, K. Nakayama and K. Hirata (2013). "Endothelin-converting enzyme-1 gene ablation attenuates pulmonary fibrosis via CGRP-cAMP/EPAC1 pathway." *Am J Respir Cell Mol Biol* **48**(4): 465-476.

- Hatje, L. K., C. Richter, U. Blume-Peytavi and J. Kottner (2015). "Blistering time as a parameter for the strength of dermoepidermal adhesion: a systematic review and meta-analysis." *Br J Dermatol* **172**(2): 323-330.
- Hay, D. L., M. L. Garelja, D. R. Poyner and C. S. Walker (2018). "Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25." *Br J Pharmacol* **175**(1): 3-17.
- Hayward, P. G. and M. C. Robson (1991). "Animal models of wound contraction." *Prog Clin Biol Res* **365**: 301-312.
- Heidari, F., A. Yari, H. Rasoolijazi, M. Soleimani, A. Dehpoor, N. Sajedi, S. Joulai Veijouye and M. Nobakht (2016). "Bulge Hair Follicle Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing in Rats." *Wounds* **28**(4): 132-141.
- Heidenreich, M., S. G. Lechner, V. Vardanyan, C. Wetzel, C. W. Cremers, E. M. De Leenheer, G. Aranguéz, M. A. Moreno-Pelayo, T. J. Jentsch and G. R. Lewin (2011). "KCNQ4 K(+) channels tune mechanoreceptors for normal touch sensation in mouse and man." *Nat Neurosci* **15**(1): 138-145.
- Henderson, J., G. Terenghi, D. A. McGrouther and M. W. Ferguson (2006). "The reinnervation pattern of wounds and scars may explain their sensory symptoms." *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **59**(9): 942-950.
- Hendriks, F. M., D. Brokken, C. W. Oomens, D. L. Bader and F. P. Baaijens (2006). "The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using suction experiments." *Med Eng Phys* **28**(3): 259-266.
- Herrman, E. C., C. F. Knapp, J. C. Donofrio and R. Salcido (1999). "Skin perfusion responses to surface pressure-induced ischemia: implication for the developing pressure ulcer." *J Rehabil Res Dev* **36**(2): 109-120.
- Herrmann, D. N., M. L. Ferguson, V. Pannoni, R. L. Barbano, M. Stanton and E. L. Logigian (2004). "Plantar nerve AP and skin biopsy in sensory neuropathies with normal routine conduction studies." *Neurology* **63**(5): 879-885.
- Hilairët, S., C. Belanger, J. Bertrand, A. Laperrière, S. M. Foord and M. Bouvier (2001a). "Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin." *J Biol Chem* **276**(45): 42182-42190.
- Hilairët, S., S. M. Foord, F. H. Marshall and M. Bouvier (2001b). "Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins." *J Biol Chem* **276**(31): 29575-29581.
- Hilliges, M., L. Wang and O. Johansson (1995). "Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis." *J Invest Dermatol* **104**(1): 134-137.
- Hinz, B. (2007). "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair." *J Invest Dermatol* **127**(3): 526-537.
- Hirsch, I. B. (2015). "Glycemic Variability and Diabetes Complications: Does It Matter? Of Course It Does!" *Diabetes Care* **38**(8): 1610-1614.
- Hirt, D. and G. W. Bernard (1997). "CGRP-beta unlike CGRP-alpha has no osteogenic stimulatory effect in vitro." *Peptides* **18**(9): 1461-1463.
- Holzer, P. (1998). "Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin." *Gen Pharmacol* **30**(1): 5-11.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, S. Takeshita, H. Takamatsu, M. Katsuura, H. Ozawa, Y. Toyama, L. F. Bonewald and A. Kudo (1999). "Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta." *J Bone Miner Res* **14**(7): 1239-1249.
- Hou, Q., T. Barr, L. Gee, J. Vickers, J. Wymer, E. Borsani, L. Rodella, S. Getsios, T. Burdo, E. Eisenberg, U. Guha, R. Lavker, J. Kessler, S. Chittur, D. Fiorino, F. Rice and P. Albrecht (2011). "Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide beta: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms." *Pain* **152**(9): 2036-2051.
- Hu, S. C. and C. E. Lan (2016). "High-glucose environment disturbs the physiologic functions of keratinocytes: Focusing on diabetic wound healing." *J Dermatol Sci* **84**(2): 121-127.

- Huang, J., L. L. Stohl, X. Zhou, W. Ding and R. D. Granstein (2011). "Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells." *Brain Behav Immun* **25**(4): 787-799.
- Husmann, K., P. M. Sexton, J. A. Fischer and W. Born (2000). "Mouse receptor-activity-modifying proteins 1, -2 and -3: amino acid sequence, expression and function." *Mol Cell Endocrinol* **162**(1-2): 35-43.
- Huysman, E. and C. Mathieu (2009). "Diabetes and peripheral vascular disease." *Acta Chir Belg* **109**(5): 587-594.
- Igaki, M., T. Higashi, S. Hamamoto, S. Kodama, S. Naito and S. Tokuhara (2014). "A study of the behavior and mechanism of thermal conduction in the skin under moist and dry heat conditions." *Skin Res Technol* **20**(1): 43-49.
- Ikoma, A., M. Steinhoff, S. Stander, G. Yosipovitch and M. Schmelz (2006). "The neurobiology of itch." *Nat Rev Neurosci* **7**(7): 535-547.
- Ince, P., D. Kendrick, F. Game and W. Jeffcoate (2007). "The association between baseline characteristics and the outcome of foot lesions in a UK population with diabetes." *Diabet Med* **24**(9): 977-981.
- Inoue, K., S. Koizumi, S. Fuziwara, S. Denda and M. Denda (2002). "Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **291**(1): 124-129.
- INSERM and R. Burcelin. (2019a, 13/02/2019). "Diabète de type 2." Retrieved 11/07/2019, from <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-2>.
- INSERM and R. Mallone. (2019b, 10/04/2019). "Diabète de type 1." Retrieved 11/07/2019, from <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-1>.
- International Pressure Ulcer Guideline. (2019, Août 2019). "Prevention and Treatment of Pressure Ulcers/Injuries: Clinical Practice Guideline." Retrieved 28/08/2019, from http://internationalguideline.com/statements#staging_system_revision.
- Iorio, V., L. D. Troughton and K. J. Hamill (2015). "Laminins: Roles and Utility in Wound Repair." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **4**(4): 250-263.
- Irwin, S., R. W. Houde, D. R. Bennett, L. C. Hendershot and M. H. Seevers (1951). "The effects of morphine methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation." *J Pharmacol Exp Ther* **101**(2): 132-143.
- Ito, M., Z. Yang, T. Andl, C. Cui, N. Kim, S. E. Millar and G. Cotsarelis (2007). "Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding." *Nature* **447**(7142): 316-320.
- Jackson-Boeters, L., W. Wen and D. W. Hamilton (2009). "Periostin localizes to cells in normal skin, but is associated with the extracellular matrix during wound repair." *J Cell Commun Signal* **3**(2): 125-133.
- Jameson, J. and W. L. Havran (2007). "Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing." *Immunol Rev* **215**: 114-122.
- Jeffcoate, W. J. and K. G. Harding (2003). "Diabetic foot ulcers." *Lancet* **361**(9368): 1545-1551.
- Jelicic Kadic, A., M. Boric, M. Vidak, L. Ferhatovic and L. Puljak (2014). "Changes in epidermal thickness and cutaneous innervation during maturation in long-term diabetes." *J Tissue Viability* **23**(1): 7-12.
- Jensen, D. D., T. Lieu, M. L. Halls, N. A. Veldhuis, W. L. Imlach, Q. N. Mai, D. P. Poole, T. Quach, L. Aurelio, J. Conner, C. K. Herenbrink, N. Barlow, J. S. Simpson, M. J. Scanlon, B. Graham, A. McCluskey, P. J. Robinson, V. Escriou, R. Nassini, S. Materazzi, P. Geppetti, G. A. Hicks, M. J. Christie, C. J. H. Porter, M. Canals and N. W. Bunnett (2017). "Neurokinin 1 receptor signaling in endosomes mediates sustained nociception and is a viable therapeutic target for prolonged pain relief." *Sci Transl Med* **9**(392).
- Ji, R. R., T. A. Samad, S. X. Jin, R. Schmoll and C. J. Woolf (2002). "p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia." *Neuron* **36**(1): 57-68.
- Jiang, Y., J. R. Nyengaard, J. S. Zhang and J. Jakobsen (2004). "Selective loss of calcitonin gene-related Peptide-expressing primary sensory neurons of the a-cell phenotype in early experimental diabetes." *Diabetes* **53**(10): 2669-2675.

- Johnson, G. D., T. Stevenson and K. Ahn (1999). "Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin." *J Biol Chem* **274**(7): 4053-4058.
- Johnson, M. S., J. M. Ryals and D. E. Wright (2008). "Early loss of peptidergic intraepidermal nerve fibers in an STZ-induced mouse model of insensate diabetic neuropathy." *Pain* **140**(1): 35-47.
- Jolival, C. G., K. E. Frizzi, L. Guernsey, A. Marquez, J. Ochoa, M. Rodriguez and N. A. Calcutt (2016). "Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes." *Curr Protoc Mouse Biol*. **6**(3): 223-255.
- Joodaki, H. and M. Panzer (2018). "Skin mechanical properties and modeling: A review." *Proc Inst Mech Eng H* **232**(4): 323-343.
- Joost, S., T. Jacob, X. Sun, K. Annusver, G. La Manno, I. Sur and M. Kasper (2018). "Single-Cell Transcriptomics of Traced Epidermal and Hair Follicle Stem Cells Reveals Rapid Adaptations during Wound Healing." *Cell Rep* **25**(3): 585-597.
- Joost, S., A. Zeisel, T. Jacob, X. Sun, G. La Manno, P. Lonnerberg, S. Linnarsson and M. Kasper (2016). "Single-Cell Transcriptomics Reveals that Differentiation and Spatial Signatures Shape Epidermal and Hair Follicle Heterogeneity." *Cell Syst* **3**(3): 221-237.
- Jörneskog, G., K. Brismar and B. Fagrell (1995a). "Skin capillary circulation is more impaired in the toes of diabetic than non-diabetic patients with peripheral vascular disease." *Diabet Med* **12**(1): 36-41.
- Jörneskog, G., K. Brismar and B. Fagrell (1995b). "Skin capillary circulation severely impaired in toes of patients with IDDM, with and without late diabetic complications." *Diabetologia* **38**(4): 474-480.
- Jude, E. B., S. O. Oyibo, N. Chalmers and A. J. Boulton (2001). "Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome." *Diabetes Care* **24**(8): 1433-1437.
- Jung, D., Y. B. Kim, J. B. Lee, A. M. C. Muhamed and J. Y. Lee (2018). "Sweating distribution and active sweat glands on the scalp of young males in hot-dry and hot-humid environments." *Eur J Appl Physiol* **118**(12): 2655-2667.
- Jung, E. C. and H. I. Maibach (2014). Chapter 2: Animal models for percutaneous absorption. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. V. Shah, H. Maibach and J. Jenner, Springer Science+Business Media New York.
- Juster-Switlyk, K. and A. G. Smith (2016). "Updates in diabetic peripheral neuropathy." *F1000Res* **5**(F1000 Faculty Rev): 738.
- Kambiz, S., J. W. van Neck, S. G. Cosgun, M. H. van Velzen, J. A. Janssen, N. Avazverdi, S. E. Hovius and E. T. Walbeehm (2015). "An early diagnostic tool for diabetic peripheral neuropathy in rats." *PLoS One* **10**(5): e0126892.
- Kammeyer, A., M. B. Teunissen, S. Pavel, M. A. de Rie and J. D. Bos (1995). "Photoisomerization spectrum of urocanic acid in human skin and in vitro: effects of simulated solar and artificial ultraviolet radiation." *Br J Dermatol* **132**(6): 884-891.
- Kanaoka, M., Y. Yamaguchi, N. Komitsu, C. A. Feghali-Bostwick, M. Ogawa, K. Arima, K. Izuhara and M. Aihara (2018). "Pro-fibrotic phenotype of human skin fibroblasts induced by periostin via modulating TGF-beta signaling." *J Dermatol Sci* **90**(2): 199-208.
- Katayama, M., J. A. Nadel, N. W. Bunnett, G. U. Di Maria, M. Haxhiu and D. B. Borson (1991). "Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance P by neutral endopeptidase." *Peptides* **12**(3): 563-567.
- Kelly, E. J., G. Terenghi, A. Hazari and M. Wiberg (2005). "Nerve fibre and sensory end organ density in the epidermis and papillary dermis of the human hand." *Br J Plast Surg* **58**(6): 774-779.
- Khalil, Z. and R. Helme (1996). "Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **51**(5).
- Khanna, S., S. Biswas, Y. Shang, E. Collard, A. Azad, C. Kauh, V. Bhasker, G. M. Gordillo, C. K. Sen and S. Roy (2010). "Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice." *PLoS One* **5**(3): e9539.
- Kim, Y. G., A. M. Lone, W. M. Nolte and A. Saghatelian (2012). "Peptidomics approach to elucidate the proteolytic regulation of bioactive peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(22): 8523-8527.
- Koh, T. J. and L. A. DiPietro (2011). "Inflammation and wound healing: the role of the macrophage." *Expert Rev Mol Med* **13**: e23.

- Kokate, J. Y., K. J. Leland, A. M. Held, G. L. Hansen, G. L. Kveen, B. A. Johnson, M. S. Wilke, E. M. Sparrow and P. A. Iazzo (1995). "Temperature-modulated pressure ulcers: a porcine model." *Arch Phys Med Rehabil* **76**(7): 666-673.
- Koltzenburg, M., C. L. Stucky and G. R. Lewin (1997). "Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin." *J Neurophysiol* **78**(4): 1841-1850.
- Kordestani, S. S. (2019). *Atlas of Wound Healing, Chapter 3: Wound Healing Process*, Elsevier.
- Kosiak, M. (1959). "Etiology and pathology of ischemic ulcers." *Arch Phys Med Rehabil* **40**(2): 62-69.
- Kosiak, M. (1961). "Etiology of decubitus ulcers." *Arch Phys Med Rehabil* **42**: 19-29.
- Koster, M. I. (2009). "Making an epidermis." *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 7-10.
- Kottner, J., J. Black, E. Call, A. Gefen and N. Santamaria (2018). "Microclimate: A critical review in the context of pressure ulcer prevention." *Clin Biomech* **59**: 62-70.
- Krouskop, T. A., N. P. Reddy, W. A. Spencer and J. W. Secor (1978). "Mechanisms of decubitus ulcer formation--an hypothesis." *Med Hypotheses* **4**(1): 37-39.
- Krzyszczuk, P., R. Schloss, A. Palmer and F. Berthiaume (2018). "The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes." *Front Physiol* **9**: 419.
- Kunt, T., T. Forst, S. Schmidt, A. Pfutzner, S. Schneider, O. Harzer, M. Lobig, M. Engelbach, K. Goitom, T. Pohlmann and J. Beyer (2000). "Serum levels of substance P are decreased in patients with type 1 diabetes." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**(3): 164-167.
- Kurashige, C., K. Hosono, H. Matsuda, K. Tsujikawa, H. Okamoto and M. Majima (2014). "Roles of receptor activity-modifying protein 1 in angiogenesis and lymphangiogenesis during skin wound healing in mice." *Faseb J* **28**(3): 1237-1247.
- Kuwasako, K., Y. Shimekake, M. Masuda, K. Nakahara, T. Yoshida, M. Kitaura, K. Kitamura, T. Eto and T. Sakata (2000). "Visualization of the calcitonin receptor-like receptor and its receptor activity-modifying proteins during internalization and recycling." *J Biol Chem* **275**(38): 29602-29609.
- Kwak, S. H. and K. S. Park (2016). "Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes." *Exp Mol Med* **48**: e220.
- Lachenbruch, C., Y. T. Tzen, D. Brienza, P. E. Karg and P. A. Lachenbruch (2015). "Relative contributions of interface pressure, shear stress, and temperature on ischemic-induced, skin-reactive hyperemia in healthy volunteers: a repeated measures laboratory study." *Ostomy Wound Manage* **61**(2): 16-25.
- Lan, C. C., I. H. Liu, A. H. Fang, C. H. Wen and C. S. Wu (2008). "Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes." *Br J Dermatol* **159**(5): 1103-1115.
- Lan, C. C., C. S. Wu, S. M. Huang, I. H. Wu and G. S. Chen (2013). "High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing." *Diabetes* **62**(7): 2530-2538.
- Landsman, A. S., D. F. Meaney, R. S. Cargill, 2nd, E. J. Macarak and L. E. Thibault (1995). "1995 William J. Stickel Gold Award. High strain rate tissue deformation. A theory on the mechanical etiology of diabetic foot ulcerations." *J Am Podiatr Med Assoc* **85**(10): 519-527.
- Lang, E., A. Novak, P. W. Reeh and H. O. Handwerker (1990). "Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro." *J Neurophysiol* **63**(4): 887-901.
- Langton, A. K., H. K. Graham, J. C. McConnell, M. J. Sherratt, C. E. M. Griffiths and R. E. B. Watson (2017). "Organization of the dermal matrix impacts the biomechanical properties of skin." *Br J Dermatol* **177**(3): 818-827.
- Laurens, N., P. Koolwijk and M. P. de Maat (2006). "Fibrin structure and wound healing." *J Thromb Haemost* **4**(5): 932-939.
- Lauria, G., D. R. Cornblath, O. Johansson, J. C. McArthur, S. I. Mellgren, M. Nolano, N. Rosenberg and C. Sommer (2005). "EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy." *Eur J Neurol* **12**(10): 747-758.
- Laursen, W. J., E. O. Anderson, L. J. Hoffstaetter, S. N. Bagriantsev and E. O. Gracheva (2015). "Species-specific temperature sensitivity of TRPA1." *Temperature* **2**(2): 214-226.
- Laverdet, B., A. Danigo, D. Girard, L. Magy, C. Demiot and A. Desmouliere (2015). "Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair." *Histol Histopathol* **30**(8): 875-892.

- Le Bars, D. and F. Adam (2002). "Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire." Ann Fr Anesth Reanim **21**(4): 315-335.
- Lebonvallet, N., N. Boulais, C. Le Gall, U. Pereira, D. Gauche, E. Gobin, J. O. Pers, C. Jeanmaire, L. Danoux, G. Pauly and L. Misery (2012). "Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis." Exp Dermatol. **21**(2): 156-158.
- Lee-Kubli, C. A. and N. A. Calcutt (2014). "Painful neuropathy: Mechanisms." Handb Clin Neurol **126**: 533-557.
- Lennerz, J. K., V. Rühle, E. P. Ceppa, W. L. Neuhuber, N. W. Bunnett, E. F. Grady and K. Messlinger (2008). "Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: Differences between peripheral and central CGRP receptor distribution." The Journal of Comparative Neurology **507**(3): 1277-1299.
- Leung, M. S. and C. C. Wong (2000). "Expressions of putative neurotransmitters and neuronal growth related genes in Merkel cell-neurite complexes of the rats." Life Sci **66**(16): 1481-1490.
- Levine, J. M. (2019). "Historical Perspective on Pressure Injury Classification: The Legacy of J. Darrell Shea." Adv Skin Wound Care **32**(3): 103-106.
- Levy, D. M., S. S. Karanth, D. R. Springall and J. M. Polak (1989). "Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study." Diabetologia **32**(7): 427-433.
- Lewin, G. R. and L. M. Mendell (1993). "Nerve growth factor and nociception." Trends Neurosci **16**(9): 353-359.
- Lewin, G. R. and R. Moshourab (2004). "Mechanosensation and pain." J Neurobiol **61**(1): 30-44.
- Lewin, G. R. and A. Nykjaer (2014). "Pro-neurotrophins, sortilin, and nociception." Eur J Neurosci **39**(3): 363-374.
- Li, H. J., N. Kanazawa, A. Kimura, C. Kaminaka, N. Yonei, Y. Yamamoto and F. Furukawa (2012). "Severe ulceration with impaired induction of growth factors and cytokines in keratinocytes after trichloroacetic acid application on TRPV1-deficient mice." Eur J Dermatol **22**(5): 614-621.
- Li, L., M. Rutlin, V. E. Abraira, C. Cassidy, L. Kus, S. Gong, M. P. Jankowski, W. Luo, N. Heintz, H. R. Koerber, C. J. Woodbury and D. D. Ginty (2011). "The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons." Cell **147**(7): 1615-1627.
- Liang, Y., J. A. Marcusson and O. Johansson (1999). "Light and electron microscopic immunohistochemical observations of p75 nerve growth factor receptor-immunoreactive dermal nerves in prurigo nodularis." Arch Dermatol Res **291**(1): 14-21.
- Lim, X., S. H. Tan, W. L. Koh, R. M. Chau, K. S. Yan, C. J. Kuo, R. van Amerongen, A. M. Klein and R. Nusse (2013). "Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling." Science **342**(6163): 1226-1230.
- Lima, R. O., F. V. Fachine, M. R. Lisboa, F. K. Leitaó and M. L. Vale (2018). "Development and validation of the experimental wound assessment tool (EWAT) for pressure ulcer in laboratory animals." J Pharmacol Toxicol Methods **90**: 13-18.
- Lindberger, M., H. D. Schroder, M. Schultzberg, K. Kristensson, A. Persson, J. Ostman and H. Link (1989). "Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus." J Neurol Sci **93**(2-3): 289-296.
- Lindsay, S., A. Oates and K. Bourdillon (2017). "The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing." Int Wound J **14**(6): 1237-1247.
- Linscheid, P., D. Seboek, D. J. Schaer, H. Zulewski, U. Keller and B. Muller (2004). "Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes." Crit Care Med **32**(8): 1715-1721.
- Liu, J. Y., J. H. Hu, Q. G. Zhu, F. Q. Li and H. J. Sun (2006). "Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts." Br J Dermatol **155**(4): 657-662.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lobmann, R., A. Ambrosch, G. Schultz, K. Waldmann, S. Schiweck and H. Lehnert (2002). "Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients." Diabetologia **45**(7): 1011-1016.

- Löffek, S., O. Schilling and C. W. Franzke (2011). "Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance." *Eur Respir J* **38**(1): 191-208.
- Lott, D. J., D. Zou and M. J. Mueller (2008). "Pressure gradient and subsurface shear stress on the neuropathic forefoot." *Clin Biomech* **23**(3): 342-348.
- Lulevich, V., H. Y. Yang, R. R. Isseroff and G. Y. Liu (2010). "Single cell mechanics of keratinocyte cells." *Ultramicroscopy* **110**(12): 1435-1442.
- Lumpkin, E. A. and M. J. Caterina (2007). "Mechanisms of sensory transduction in the skin." *Nature* **445**(7130): 858-865.
- Luo, Y., H. Qu, H. Wang, H. Wei, J. Wu, Y. Duan, D. Liu and H. Deng (2016). "Plasma Periostin Levels Are Increased in Chinese Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes and Are Positively Correlated with Glucose and Lipid Parameters." *Mediators Inflamm* **2016**: 6423637.
- Lynn, B. and S. E. Carpenter (1982). "Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb." *Brain Res* **238**(1): 29-43.
- Macfarlane, R. M. and W. J. Jeffcoate (1997). "Factors contributing to the presentation of diabetic foot ulcers." *Diabet Med* **14**(10): 867-870.
- Madison, K. C. (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis." *J Invest Dermatol* **121**(2): 231-241.
- Mainzer, C., N. Remoue, J. Molinari, P. Rousselle, C. Barricchello, J. C. Lago, P. Sommer, D. Sigaudou-Roussel and R. Debret (2018). "In vitro epidermis model mimicking IGF-1-specific age-related decline." *Exp Dermatol* **27**(5): 537-543.
- Makarova, A. M., S. Pasta, G. Watson, C. Shackleton and E. H. Epstein, Jr. (2017). "Attenuation of UVR-induced vitamin D3 synthesis in a mouse model deleted for keratinocyte lathosterol 5-desaturase." *J Steroid Biochem Mol Biol* **171**: 187-194.
- Manni, L., F. Florenzano and L. Aloe (2011). "Electroacupuncture counteracts the development of thermal hyperalgesia and the alteration of nerve growth factor and sensory neuromodulators induced by streptozotocin in adult rats." *Diabetologia* **54**(7): 1900-1908.
- Mapp, P. I., D. F. McWilliams, M. J. Turley, E. Hargin and D. A. Walsh (2012). "A role for the sensory neuropeptide calcitonin gene-related peptide in endothelial cell proliferation in vivo." *Br J Pharmacol* **166**(4): 1261-1271.
- Marconi, A., M. C. Panza, M. Bonnet-Duquennoy, K. Lazou, R. Kurfurst, F. Truzzi, R. Lotti, G. De Santis, M. Dumas, F. Bonte and C. Pincelli (2006). "Expression and function of neurotrophins and their receptors in human melanocytes." *Int J Cosmet Sci* **28**(4): 255-261.
- Marconi, A., M. Terracina, C. Fila, J. Franchi, F. Bonte, G. Romagnoli, R. Maurelli, C. M. Failla, M. Dumas and C. Pincelli (2003). "Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **121**(6): 1515-1521.
- Martin, P. and R. Nunan (2015). "Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing." *Br J Dermatol* **173**(2): 370-378.
- Martinot, V., V. Mitchell, P. Fevrier, A. Duhamel and P. Pellerin (1994). "Comparative study of split thickness skin grafts taken from the scalp and thigh in children." *Burns* **20**(2): 146-150.
- Martins, V. L., M. Caley and E. A. O'Toole (2013). "Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair." *Cell Tissue Res* **351**(2): 255-268.
- Matejuk, A. (2018). "Skin Immunity." *Arch Immunol Ther Exp* **66**(1): 45-54.
- Matsuda, H., H. Koyama, H. Sato, J. Sawada, A. Itakura, A. Tanaka, M. Matsumoto, K. Konno, H. Ushio and K. Matsuda (1998). "Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice." *J Exp Med* **187**(3): 297-306.
- McLatchie, L. M., N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee and S. M. Foord (1998). "RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor." *Nature* **393**(6683): 333-339.
- Mearow, K. M., Y. Kril and J. Diamond (1993). "Increased NGF mRNA expression in denervated rat skin." *Neuroreport* **4**(4): 351-354.
- Mehrel, T., D. Hohl, J. A. Rothnagel, M. A. Longley, D. Bundman, C. Cheng, U. Lichti, M. E. Bisher, A. C. Steven, P. M. Steinert and et al. (1990). "Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin." *Cell* **61**(6): 1103-1112.

- Meigel, W. N., S. Gay and L. Weber (1977). "Dermal architecture and collagen type distribution." Arch Dermatol Res **259**(1): 1-10.
- Mellor, K. M., M. A. Brimble and L. M. Delbridge (2015). "Glucose as an agent of post-translational modification in diabetes--New cardiac epigenetic insights." Life Sci **129**: 48-53.
- Menon, G. K., S. E. Lee and S. H. Lee (2018). "An overview of epidermal lamellar bodies: Novel roles in biological adaptations and secondary barriers." J Dermatol Sci **92**(1): 10-17.
- Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.
- Micera, A., A. Lambiase, B. Stampachiacchiere, S. Bonini and F. Levi-Schaffer (2007). "Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate." Cytokine Growth Factor Rev **18**(3-4): 245-256.
- Milenkovic, N., C. Wetzel, R. Moshourab and G. R. Lewin (2008). "Speed and temperature dependences of mechanotransduction in afferent fibers recorded from the mouse saphenous nerve." J Neurophysiol **100**(5): 2771-2783.
- Miller, G. E. and J. Seale (1981). "Lymphatic clearance during compressive loading." Lymphology **14**(4): 161-166.
- Mirza, R. E., M. M. Fang, W. J. Ennis and T. J. Koh (2013). "Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes." Diabetes **62**(7): 2579-2587.
- Misery, L. (1997). "Skin, immunity and the nervous system." Br J Dermatol **137**(6): 843-850.
- Misery, L. (2014). "[Pruritus: considerable progress in pathophysiology]." Med Sci (Paris) **30**(12): 1123-1128.
- Moehring, F., A. M. Cowie, A. D. Menzel, A. D. Weyer, M. Grzybowski, T. Arzua, A. M. Geurts, O. Palygin and C. L. Stucky (2018). "Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling." Elife **7**: e31684.
- Moll, I., R. Paus and R. Moll (1996). "Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density." J Invest Dermatol **106**(2): 281-286.
- Moll, R., M. Divo and L. Langbein (2008). "The human keratins: biology and pathology." Histochem Cell Biol **129**(6): 705-733.
- Monteiro-Soares, M., D. Russell, E. J. Boyko, W. Jeffcoate, J. L. Mills, S. Morbach and F. Game (2019). IWGDF Guideline on the classification of diabetic foot ulcers.
- Morran, M. P., A. Vonberg, A. Khadra and M. Pietropaolo (2015). "Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus." Mol Aspects Med **42**: 42-60.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.
- Mulderry, P. K., M. A. Ghatei, R. A. Spokes, P. M. Jones, A. M. Pierson, Q. A. Hamid, S. Kanse, S. G. Amara, J. M. Burrin, S. Legon and et al. (1988). "Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat." Neuroscience **25**(1): 195-205.
- Munger, B. L. and C. Ide (1988). "The structure and function of cutaneous sensory receptors." Arch Histol Cytol **51**(1): 1-34.
- Murakami, M. and M. Simons (2008). "Fibroblast growth factor regulation of neovascularization." Curr Opin Hematol **15**(3): 215-220.
- Netea, M. G., N. Hancu, W. L. Blok, P. Grigorescu-Sido, L. Popa, V. Popa and J. W. van der Meer (1997). "Interleukin 1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1 receptor antagonist in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus: comparison to long-standing diabetes and healthy individuals." Cytokine **9**(4): 284-287.
- Nikitenko, L. L., N. Blucher, S. B. Fox, R. Bicknell, D. M. Smith and M. C. Rees (2006). "Adrenomedullin and CGRP interact with endogenous calcitonin-receptor-like receptor in endothelial cells and induce its desensitisation by different mechanisms." J Cell Sci **119**(Pt 5): 910-922.
- Nikoleishvili, L. R., R. B. Kurashvili, D. K. Virsaladze, N. G. Khachapuridze and L. R. Kurashvili (2006). "[Characteristic changes of skin and its accessories in type 2 diabetes mellitus]." Georgian Med News(131): 43-46.
- Nishiguchi, M. A., C. A. Spencer, D. H. Leung and T. H. Leung (2018). "Aging Suppresses Skin-Derived Circulating SDF1 to Promote Full-Thickness Tissue Regeneration." Cell Rep **24**(13): 3383-3392.

- Nishiyama, T., I. Kii, T. G. Kashima, Y. Kikuchi, A. Ohazama, M. Shimazaki, M. Fukayama and A. Kudo (2011). "Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing." *PLoS One* **6**(4): e18410.
- Nithya, M., L. Suguna and C. Rose (2003). "The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing." *Biochim Biophys Acta* **1620**(1-3): 25-31.
- Nori, S. L., M. L. Rocco, F. Florenzano, M. T. Ciotti, L. Aloe and L. Manni (2013). "Increased nerve growth factor signaling in sensory neurons of early diabetic rats is corrected by electroacupuncture." *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**: 652735.
- Norris, R. A., B. Damon, V. Mironov, V. Kasyanov, A. Ramamurthi, R. Moreno-Rodriguez, T. Trusk, J. D. Potts, R. L. Goodwin, J. Davis, S. Hoffman, X. Wen, Y. Sugi, C. B. Kern, C. H. Mjaatvedt, D. K. Turner, T. Oka, S. J. Conway, J. D. Molkenin, G. Forgacs and R. R. Markwald (2007). "Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues." *J Cell Biochem* **101**(3): 695-711.
- Nuyttens, B. P., T. Thijs, H. Deckmyn and K. Broos (2011). "Platelet adhesion to collagen." *Thromb Res* **127**(Suppl 2): S26-29.
- O'Brien, K., A. Bhatia, F. Tsen, M. Chen, A. K. Wong, D. T. Woodley and W. Li (2014). "Identification of the critical therapeutic entity in secreted Hsp90alpha that promotes wound healing in newly re-standardized healthy and diabetic pig models." *PLoS ONE* **9**(12).
- Okada, Y., P. S. Reinach, K. Shirai, A. Kitano, W. W. Kao, K. C. Flanders, M. Miyajima, H. Liu, J. Zhang and S. Saika (2011). "TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice." *Am J Pathol* **178**(6): 2654-2664.
- Okamoto, A., M. Lovett, D. G. Payan and N. W. Bunnnett (1994). "Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1) receptor expressed in mammalian cells." *Biochem J* **299**(Pt 3): 683-693.
- Okano, J., H. Kojima, M. Katagi, T. Nakagawa, Y. Nakae, T. Terashima, T. Kurakane, M. Kubota, H. Maegawa and J. Udagawa (2016). "Hyperglycemia Induces Skin Barrier Dysfunctions with Impairment of Epidermal Integrity in Non-Wounded Skin of Type 1 Diabetic Mice." *PLoS ONE* **11**(11).
- Okonkwo, U. A. and L. A. DiPietro (2017). "Diabetes and Wound Angiogenesis." *Int J Mol Sci* **18**(7).
- Olerud, J. E., G. F. Odland, E. M. Burgess, C. R. Wyss, L. D. Fisher and F. A. Matsen, 3rd (1995). "A model for the study of wounds in normal elderly adults and patients with peripheral vascular disease or diabetes mellitus." *J Surg Res* **59**(3): 349-360.
- Olerud, J. E., M. L. Usui, D. Seckin, D. S. Chiu, C. L. Haycox, I. S. Song, J. C. Ansel and N. W. Bunnnett (1999). "Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds." *J Invest Dermatol* **112**(6): 873-881.
- Omary, M. B., P. A. Coulombe and W. H. McLean (2004). "Intermediate filament proteins and their associated diseases." *N Engl J Med* **351**(20): 2087-2100.
- Ontsuka, K., Y. Kotobuki, H. Shiraishi, S. Serada, S. Ohta, A. Tanemura, L. Yang, M. Fujimoto, K. Arima, S. Suzuki, H. Murota, S. Toda, A. Kudo, S. J. Conway, Y. Narisawa, I. Katayama, K. Izuhara and T. Naka (2012). "Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts." *Exp Dermatol* **21**(5): 331-336.
- Oomens, C. W., D. L. Bader, S. Loerakker and F. Baaijens (2015). "Pressure induced deep tissue injury explained." *Ann Biomed Eng* **43**(2): 297-305.
- Padilla, B. E., G. S. Cottrell, D. Roosterman, S. Pikiros, L. Muller, M. Steinhoff and N. W. Bunnnett (2007). "Endothelin-converting enzyme-1 regulates endosomal sorting of calcitonin receptor-like receptor and beta-arrestins." *J Cell Biol* **179**(5): 981-997.
- Palazzo, E., A. Marconi, F. Truzzi, K. Dallaglio, T. Petrachi, P. Humbert, S. Schnebert, E. Perrier, M. Dumas and C. Pincelli (2012). "Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation." *J Cell Physiol* **227**(3): 1017-1025.
- Pang, Z., T. Sakamoto, V. Tiwari, Y. S. Kim, F. Yang, X. Dong, A. D. Guler, Y. Guan and M. J. Caterina (2015). "Selective keratinocyte stimulation is sufficient to evoke nociception in mice." *Pain* **156**(4): 656-665.
- Papir, Y. S., K. H. Hsu and R. H. Wildnauer (1975). "The mechanical properties of stratum corneum. I. The effect of water and ambient temperature on the tensile properties of newborn rat stratum corneum." *Biochim Biophys Acta* **399**(1): 170-180.

- Paramio, J. M., M. L. Casanova, C. Segrelles, S. Mittnacht, E. B. Lane and J. L. Jorcano (1999). "Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16." *Mol Cell Biol* **19**(4): 3086-3094.
- Parenti, A., S. Amerini, F. Ledda, C. A. Maggi and M. Ziche (1996). "The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **353**(5): 475-481.
- Park, S., D. G. Gonzalez, B. Guirao, J. D. Boucher, K. Cockburn, E. D. Marsh, K. R. Mesa, S. Brown, P. Rompolas, A. M. Haberman, Y. Bellaiche and V. Greco (2017). "Tissue-scale coordination of cellular behaviour promotes epidermal wound repair in live mice." *Nat Cell Biol* **19**(2): 155-163.
- Pasparakis, M., I. Haase and F. O. Nestle (2014). "Mechanisms regulating skin immunity and inflammation." *Nat Rev Immunol* **14**(5): 289-301.
- Patton, K. T., G. A. Thibodeau and A. Hutton (2018). *Anatomy and Physiology, ninth edition, chapter 10 - Skin*.
- Peirce, S. M., T. C. Skalak and G. T. Rodeheaver (2000). "Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat." *Wound Repair Regen* **8**(1): 68-76.
- Peleshok, J. C. and A. Ribeiro-da-Silva (2012). "Neurotrophic factor changes in the rat thick skin following chronic constriction injury of the sciatic nerve." *Mol Pain* **8**: 1.
- Peltier, A. C., M. I. Myers, K. J. Artibee, A. D. Hamilton, Q. Yan, J. Guo, Y. Shi, L. Wang and J. Li (2013). "Evaluation of dermal myelinated nerve fibers in diabetes mellitus." *J Peripher Nerv Syst* **18**(2): 162-167.
- Pence, B. D. and J. A. Woods (2014). "Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**(1): 71-79.
- Pincelli, C. and A. Marconi (2000). "Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes." *J Dermatol Sci* **22**(2): 71-79.
- Pittenger, G. L., M. Ray, N. I. Burcus, P. McNulty, B. Basta and A. I. Vinik (2004). "Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients." *Diabetes Care* **27**(8): 1974-1979.
- Plikus, M. V., C. F. Guerrero-Juarez, M. Ito, Y. R. Li, P. H. Dedhia, Y. Zheng, M. Shao, D. L. Gay, R. Ramos, T. C. Hsi, J. W. Oh, X. Wang, A. Ramirez, S. E. Konopelski, A. Elzein, A. Wang, R. J. Supapannachart, H. L. Lee, C. H. Lim, A. Nace, A. Guo, E. Treffeisen, T. Andl, R. N. Ramirez, R. Murad, S. Offermanns, D. Metzger, P. Chambon, A. D. Widgerow, T. L. Tuan, A. Mortazavi, R. K. Gupta, B. A. Hamilton, S. E. Millar, P. Seale, W. S. Pear, M. A. Lazar and G. Cotsarelis (2017). "Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing." *Science* **355**(6326): 748-752.
- Ponec, M., S. Gibbs, G. Pilgram, E. Boelsma, H. Koerten, J. Bouwstra and M. Mommaas (2001). "Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin." *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol Suppl* **1**: 63-71.
- Pop-Busui, R., A. J. Boulton, E. L. Feldman, V. Bril, R. Freeman, R. A. Malik, J. M. Sosenko and D. Ziegler (2017). "Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association." *Diabetes Care* **40**(1): 136-154.
- Potten, C. S. (1975). "Epidermal cell production rates." *J Invest Dermatol* **65**(6): 488-500.
- Pradhan, L., C. Nabzdyk, N. D. Andersen, F. W. LoGerfo and A. Veves (2009). "Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing." *Expert Rev Mol Med* **13**(11).
- Prado, M. A., B. Evans-Bain, K. R. Oliver and I. M. Dickerson (2001). "The role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction." *Peptides* **22**(11): 1773-1781.
- Price, T. J., M. D. Louria, D. Candelario-Soto, G. O. Dussor, N. A. Jeske, A. M. Patwardhan, A. Diogenes, A. A. Trott, K. M. Hargreaves and C. M. Flores (2005). "Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion." *BMC Neurosci* **6**(4): 1471-2202.
- Proksch, E. (2018). "pH in nature, humans and skin." *J Dermatol* **45**(9): 1044-1052.
- Provitera, V., M. Nolano, A. Pagano, G. Caporaso, A. Stancanelli and L. Santoro (2007). "Myelinated nerve endings in human skin." *Muscle Nerve* **35**(6): 767-775.
- Puglisi-Allegra, S. and S. Cabib (1985). "The effect of age on two kinds of aggressive behavior in inbred strains of mice." *Dev Psychobiol* **18**(6): 477-482.

- Pullar, C. E., A. Rizzo and R. R. Isseroff (2006). "beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis." *J Biol Chem* **281**(30): 21225-21235.
- Quick, D. C., W. R. Kennedy and K. S. Yoon (1984). "Ultrastructure of the secretory epithelium, nerve fibers, and capillaries in the mouse sweat gland." *Anat Rec* **208**(4): 491-499.
- Quinlan, K. L., I. S. Song, N. W. Bunnett, E. Letran, M. Steinhoff, B. Harten, J. E. Olerud, C. A. Armstrong, S. Wright Caughman and J. C. Ansel (1998). "Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function." *Am J Physiol* **275**(6).
- Raddant, A. C. and A. F. Russo (2011). "Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation." *Expert Rev Mol Med* **29**(13).
- Rahim, K., S. Saleha, X. Zhu, L. Huo, A. Basit and O. L. Franco (2017). "Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds." *Microb Ecol* **73**(3): 710-721.
- Rawlings, A. V. and P. J. Matts (2005). "Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle." *J Invest Dermatol* **124**(6): 1099-1110.
- Raychaudhuri, S. K., S. P. Raychaudhuri, H. Weltman and E. M. Farber (2001). "Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells." *Arch Dermatol Res* **293**(6): 291-295.
- Redlarski, G., A. Palkowski and M. Krawczuk (2016). "Body surface area formulae: an alarming ambiguity." *Sci Rep* **6**: 27966.
- Reiber, G. E., L. Vileikyte, E. J. Boyko, M. del Aguila, D. G. Smith, L. A. Lavery and A. J. Boulton (1999). "Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings." *Diabetes Care* **22**(1): 157-162.
- Reihnsner, R., M. Melling, W. Pfeiler and E. J. Menzel (2000). "Alterations of biochemical and two-dimensional biomechanical properties of human skin in diabetes mellitus as compared to effects of in vitro non-enzymatic glycation." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* **15**(5): 379-386.
- Reilly, D. M., D. Ferdinando, C. Johnston, C. Shaw, K. D. Buchanan and M. R. Green (1997). "The epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations." *Br J Dermatol* **137**(2): 163-170.
- Reilly, E. F., G. C. Karakousis, S. P. Schrag and S. P. Stawicki (2007). "Pressure ulcers in the intensive care unit: The 'forgotten' enemy." *OPUS 12 Scientist* **1**(2).
- Remoué, N., C. Bonod, B. Fromy and D. Sigaudou-Roussel (2020). Chapter 12 - Animal models in chronic wound healing research: for innovations and emerging technologies in wound care. *Innovations and Emerging Technologies in Wound Care*. A. Gefen, Academic Press: 197-224.
- Reznik, M. (1996). "[Structure and functions of the cutaneous nervous system]." *Pathol Biol (Paris)* **44**(10): 831-837.
- Rich, K. M., J. R. Luszczynski, P. A. Osborne and E. M. Johnson, Jr. (1987). "Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury." *J Neurocytol* **16**(2): 261-268.
- Rinkevich, Y., G. G. Walmsley, M. S. Hu, Z. N. Maan, A. M. Newman, M. Drukker, M. Januszyk, G. W. Krampitz, G. C. Gurtner, H. P. Lorenz, I. L. Weissman and M. T. Longaker (2015). "Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential." *Science* **348**(6232): aaa2151.
- Rio, C. D., E. Millan, V. Garcia, G. Appendino, J. DeMesa and E. Munoz (2018). "The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders." *Biochem Pharmacol* **157**: 122-133.
- Ritter, A. M., C. J. Woodbury, K. Albers, B. M. Davis and H. R. Koerber (2000). "Maturation of cutaneous sensory neurons from normal and NGF-overexpressing mice." *J Neurophysiol* **83**(3): 1722-1732.
- Rittié, L., D. L. Sachs, J. S. Orringer, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2013). "Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelialization of human wounds." *Am J Pathol* **182**(1): 163-171.
- Roggenkamp, D., S. Kopnick, F. Stab, H. Wenck, M. Schmelz and G. Neufang (2013). "Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model." *J Invest Dermatol* **133**(6): 1620-1628.
- Roosterman, D., G. S. Cottrell, F. Schmidlin, M. Steinhoff and N. W. Bunnett (2004). "Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases." *J Biol Chem* **279**(29): 30670-30679.

- Roosterman, D., T. Goerge, S. W. Schneider, N. W. Bunnett and M. Steinhoff (2006). "Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ." *Physiol Rev* **86**(4): 1309-1379.
- Rothberg, S., R. G. Crouse and J. L. Lee (1961). "Glycine-C-14-incorporation into the proteins of normal stratum corneum and the abnormal stratum corneum of psoriasis." *J Invest Dermatol* **37**: 497-505.
- Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." *Nat Med* **8**(11): 1227-1234.
- Russell, F. A., R. King, S. J. Smillie, X. Kodji and S. D. Brain (2014). "Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* **94**(4): 1099-1142.
- Saarialho-Kere, U. K., A. P. Pentland, H. Birkedal-Hansen, W. C. Parks and H. G. Welgus (1994). "Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds." *J Clin Invest* **94**(1): 79-88.
- Saito, Y., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T. Matsushita, M. Horikawa, M. Takenaka, F. Ogawa, J. Sugama, D. A. Steeber, S. Sato and K. Takehara (2008). "The Loss of MCP-1 Attenuates Cutaneous Ischemia-Reperfusion Injury in a Mouse Model of Pressure Ulcer." *Journal of Investigative Dermatology* **128**(7): 1838-1851.
- Sakai, S., Y. Endo, N. Ozawa, T. Sugawara, A. Kusaka, T. Sayo, H. Tagami and S. Inoue (2003). "Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus." *J Invest Dermatol* **120**(1): 79-85.
- Sakai, S., K. Kikuchi, J. Satoh, H. Tagami and S. Inoue (2005). "Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis." *Br J Dermatol* **153**(2): 319-323.
- Sandilands, A., C. Sutherland, A. D. Irvine and W. H. McLean (2009). "Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease." *J Cell Sci* **122**(Pt 9): 1285-1294.
- Scholzen, T., C. A. Armstrong, N. W. Bunnett, T. A. Luger, J. E. Olerud and J. C. Ansel (1998). "Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems." *Exp Dermatol* **7**(2-3): 81-96.
- Seike, M., M. Ikeda, A. Morimoto, M. Matsumoto and H. Kodama (2002). "Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin." *J Dermatol Sci* **28**(2): 135-143.
- Seirafi, H., K. Farsinejad, A. Firooz, S. M. Davoudi, R. M. Robati, M. S. Hoseini, A. H. Ehsani and B. Sadr (2009). "Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study." *J Eur Acad Dermatol Venereol* **23**(2): 146-149.
- Sexton, P. M., A. Albiston, M. Morfis and N. Tilakaratne (2001). "Receptor activity modifying proteins." *Cell Signal* **13**(2): 73-83.
- Shea, J. D. (1975). "Pressure sores: classification and management." *Clin Orthop Relat Res*(112): 89-100.
- Sheshah, E., A. Madanat, F. Al-Greesheh, D. Al-Qaisi, M. Al-Harbi, R. Aman, A. A. Al-Ghamdi and K. Al-Madani (2016). "Electrochemical skin conductance to detect sudomotor dysfunction, peripheral neuropathy and the risk of foot ulceration among Saudi patients with diabetes mellitus." *J Diabetes Metab Disord* **15**: 29.
- Shi, X., L. Wang, J. D. Clark and W. S. Kingery (2013). "Keratinocytes express cytokines and nerve growth factor in response to neuropeptide activation of the ERK1/2 and JNK MAPK transcription pathways." *Regul Pept* **186**: 92-103.
- Shi, Y. and P. Vanhoutte (2017). "Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes." *J Diabetes* **9**(5): 434-449.
- Shibayama, E. and H. Koizumi (1996). "Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues." *Am J Pathol* **148**(6): 1807-1818.
- Shun, C. T., Y. C. Chang, H. P. Wu, S. C. Hsieh, W. M. Lin, Y. H. Lin, T. Y. Tai and S. T. Hsieh (2004). "Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments." *Brain* **127**(Pt 7): 1593-1605.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer and E. Keshet (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* **359**(6398): 843-845.
- Singh, S., A. Young and C. McNaught (2017). "The physiology of wound healing." *Surgery (Oxford)* **35**(9): 473-477.

- Skobe, M. and M. Detmar (2000). "Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system." *J Investig Dermatol Symp Proc* **5**(1): 14-19.
- Skoff, A. M. and J. E. Adler (2006). "Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors." *Exp Neurol* **197**(2): 430-436.
- Slomka, N. and A. Gefen (2012). "Relationship between strain levels and permeability of the plasma membrane in statically stretched myoblasts." *Ann Biomed Eng* **40**(3): 606-618.
- Sloniecka, M., S. Le Roux, P. Boman, B. Bystrom, Q. Zhou and P. Danielson (2015). "Expression Profiles of Neuropeptides, Neurotransmitters, and Their Receptors in Human Keratocytes In Vitro and In Situ." *PLoS One* **10**(7): e0134157.
- Sorrell, J. M. and A. I. Caplan (2004). "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep." *J Cell Sci* **117**(Pt 5): 667-675.
- Spenny, M. L., P. Muangman, S. R. Sullivan, N. W. Bunnett, J. C. Ansel, J. E. Olerud and N. S. Gibran (2002). "Neutral endopeptidase inhibition in diabetic wound repair." *Wound Repair Regen* **10**(5): 295-301.
- Spravchikov, N., G. Sizyakov, M. Gartsbein, D. Accili, T. Tennenbaum and E. Wertheimer (2001). "Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications." *Diabetes* **50**(7): 1627-1635.
- Stadler, I., R.-Y. Zhang, P. Oskoui, M. B. S. S. Whittaker and R. J. Lanzafame (2004). "Development of a Simple, Noninvasive, Clinically Relevant Model of Pressure Ulcers in the Mouse." *Journal of Investigative Surgery* **17**(4): 221-227.
- Stein, A. T., C. A. Ufret-Vincenty, L. Hua, L. F. Santana and S. E. Gordon (2006). "Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane." *J Gen Physiol* **128**(5): 509-522.
- Steinert, P. M. and L. N. Marekov (1995). "The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope." *J Biol Chem* **270**(30): 17702-17711.
- Steinhoff, M., S. Stander, S. Seeliger, J. C. Ansel, M. Schmelz and T. Luger (2003). "Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation." *Arch Dermatol* **139**(11): 1479-1488.
- Stojadinovic, O., H. Brem, C. Vouthounis, B. Lee, J. Fallon, M. Stallcup, A. Merchant, R. D. Galiano and M. Tomic-Canic (2005). "Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing." *Am J Pathol* **167**(1): 59-69.
- Strudwick, X. L., D. L. Lang, L. E. Smith and A. J. Cowin (2015). "Combination of low calcium with Y-27632 rock inhibitor increases the proliferative capacity, expansion potential and lifespan of primary human keratinocytes while retaining their capacity to differentiate into stratified epidermis in a 3D skin model." *PLoS One* **10**(4).
- Sueki, H., B. Telegan and G. F. Murphy (1995). "Computer-assisted three-dimensional reconstruction of human dermal dendrocytes." *J Invest Dermatol* **105**(5): 704-708.
- Sullivan, K. A., S. I. Lentz, J. L. Roberts, Jr. and E. L. Feldman (2008). "Criteria for creating and assessing mouse models of diabetic neuropathy." *Curr Drug Targets* **9**(1): 3-13.
- Sumioka, T., Y. Okada, P. S. Reinach, K. Shirai, M. Miyajima, O. Yamanaka and S. Saika (2014). "Impairment of corneal epithelial wound healing in a TRPV1-deficient mouse." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**(5): 3295-3302.
- Sun, B. K., Z. Siprashvili and P. A. Khavari (2014). "Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds." *Science* **346**(6212): 941-945.
- Sundberg, J. (1994). *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools*. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Sundberg, J. P. and L. E. King, Jr. (1996). "Mouse mutations as animal models and biomedical tools for dermatological research." *J Invest Dermatol* **106**(2): 368-376.
- Sundberg, P. (2004). Skin and adnexa of the laboratory mouse. *The Laboratory Mouse*. H. H. a. G. Bullock. San Diego, Elsevier Academic Press: 195-206.
- Sung, C. P., A. J. Arleth, N. Aiyar, P. K. Bhatnagar, P. G. Lysko and G. Feuerstein (1992). "CGRP stimulates the adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells." *Peptides* **13**(3): 429-434.
- Supowit, S. C., H. Zhao and D. J. DiPette (2001). "Nerve growth factor enhances calcitonin gene-related peptide expression in the spontaneously hypertensive rat." *Hypertension* **37**(2 Pt 2): 728-732.

- Suri, A. and A. Szallasi (2008). "The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity." Trends Pharmacol Sci **29**(1): 29-36.
- Susaki, Y., S. Shimizu, K. Katakura, N. Watanabe, K. Kawamoto, M. Matsumoto, M. Tsudzuki, T. Furusaka, Y. Kitamura and H. Matsuda (1996). "Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor." Blood **88**(12): 4630-4637.
- Takahashi, M., M. Yamada and Y. Y. T. Machida (1984). "A new method to evaluate the softening effect of cosmetic ingredients on the skin." J. Soc. Cosmet. Chem **35**(3): 171-181.
- Takeshita, S., R. Kikuno, K. Tezuka and E. Amann (1993). "Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I." Biochem J **294**(Pt 1): 271-278.
- Talagas, M., N. Lebonvallet, F. Berthod and L. Misery (2019). "Cutaneous nociception: Role of keratinocytes." Exp Dermatol [**Epub ahead of print**].
- Tanaka, T., K. Danno, K. Ikai and S. Imamura (1988). "Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes." J Invest Dermatol **90**(3): 399-401.
- Taylor, K. R., A. E. Costanzo and J. M. Jameson (2011). "Dysfunctional gammadelta T cells contribute to impaired keratinocyte homeostasis in mouse models of obesity." J Invest Dermatol **131**(12): 2409-2418.
- Tellechea, A., A. Kafanas, E. C. Leal, F. Tecilazich, S. Kuchibhotla, M. E. Auster, I. Kontoes, J. Paolino, E. Carvalho, L. P. Nabzdyk and A. Veves (2013). "Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes." Int J Low Extrem Wounds **12**(1): 4-11.
- Tellechea, A., E. C. Leal, A. Kafanas, M. E. Auster, S. Kuchibhotla, Y. Ostrovsky, F. Tecilazich, D. Baltzis, Y. Zheng, E. Carvalho, J. M. Zabolotny, Z. Weng, A. Petra, A. Patel, S. Panagiotidou, L. Pradhan-Nabzdyk, T. C. Theoharides and A. Veves (2016). "Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes." Diabetes **65**(7): 2006-2019.
- Terenghi, G., D. Mann, P. G. Kopelman and P. Anand (1997). "trkA and trkC expression is increased in human diabetic skin." Neurosci Lett **228**(1): 33-36.
- Thresh, L. (1846). "Isolation of capsaicin." Pharm. J. **6**: 941.
- Toda, M., T. Suzuki, K. Hosono, Y. Kurihara, H. Kurihara, I. Hayashi, H. Kitasato, S. Hoka and M. Majima (2008). "Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis." Biomed Pharmacother **62**(6): 352-359.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum and D. Julius (1998). "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli." Neuron **21**(3): 531-543.
- Toriyama, Y., Y. Iesato, A. Imai, T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, A. Yamauchi, K. Igarashi, M. Tanaka, T. Liu, X. Xian, L. Zhai, S. Owa, T. Murata and T. Shindo (2015). "Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular vascular diseases." Am J Pathol **185**(6): 1783-1794.
- Truzzi, F., A. Marconi, P. Atzei, M. C. Panza, R. Lotti, K. Dallaglio, R. Tiberio, E. Palazzo, C. Vaschieri and C. Pincelli (2011). "p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes." Cell Death Differ **18**(6): 948-958.
- Tschachler, E., C. M. Reinisch, C. Mayer, K. Paiha, H. Lassmann and W. Weninger (2004). "Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis." J Invest Dermatol **122**(1): 177-182.
- Uberti, F., V. Morsanuto, S. Ghirlanda, S. Ruga, N. Clemente, C. Boieri, R. Boldorini and C. Molinari (2018). "Highly Diluted Acetylcholine Promotes Wound Repair in an In Vivo Model." Adv Wound Care **7**(4): 121-133.
- Udawela, M., G. Christopoulos, M. Morfis, A. Christopoulos, S. Ye, N. Tilakaratne and P. M. Sexton (2006). "A critical role for the short intracellular C terminus in receptor activity-modifying protein function." Mol Pharmacol **70**(5): 1750-1760.
- Um, J., N. Jung, S. Chin, Y. Cho, S. Choi and K. S. Park (2016). "Substance P enhances EPC mobilization for accelerated wound healing." Wound Repair Regen **24**(2): 402-410.
- Uniprot-RCP9. (08 May 2019). "UniProtKB - O75575 (RPC9_HUMAN)." from <https://www.uniprot.org/uniprot/O75575>.

- Uniprot -CALCA. (08 May 2019). "UniProtKB - Q99JA0 (CALCA_MOUSE)." from <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99JA0>.
- Usui, M. L., J. N. Mansbridge, W. G. Carter, M. Fujita and J. E. Olerud (2008). "Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds." *J Histochem Cytochem* **56**(7): 687-696.
- Vestweber, D. (2015). "How leukocytes cross the vascular endothelium." *Nat Rev Immunol* **15**(11): 692-704.
- Vetrugno, R., R. Liguori, P. Cortelli and P. Montagna (2003). "Sympathetic skin response: basic mechanisms and clinical applications." *Clin Auton Res* **13**(4): 256-270.
- Vouillarmet, J., A. Josset-Lamaugarny, P. Michon, J. L. Saumet, A. Koitka-Weber, S. Henni, B. Fromy and D. Sigaudou-Roussel (2019). "Neurovascular Response to Pressure in Patients With Diabetic Foot Ulcer." *Diabetes* **68**(4): 832-836.
- Walcher, J., J. Ojeda-Alonso, J. Haseleu, M. K. Oosthuizen, A. H. Rowe, N. C. Bennett and G. R. Lewin (2018). "Specialized mechanoreceptor systems in rodent glabrous skin." *J Physiol* **596**(20): 4995-5016.
- Wallengren, J., D. Chen and F. Sundler (1999). "Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing." *Br J Dermatol* **140**(3): 400-408.
- Walløe, L. (2015). "Arterio-venous anastomoses in the human skin and their role in temperature control." *Temperature* **3**(1): 92-103.
- Wang, H., L. Xing, W. Li, L. Hou, J. Guo and X. Wang (2002). "Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes." *J Neuroimmunol* **130**(1-2): 155-162.
- Wang, Q., F. F. Nie, X. Zhao and Z. L. Qin (2007). "[The expression of periostin in hyperplastic scars and the relations to TGF-beta1 and its receptors]." *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* **23**(3): 229-232.
- Wang, Y., K. Marshall, Y. Baba, G. Gerling and E. Lumpkin (2013). "Hyperelastic Material Properties of Mouse Skin under Compression." *PLoS One* **8**(6): e67439.
- Wang, Y. N., K. Lee and W. R. Ledoux (2011). "Histomorphological evaluation of diabetic and non-diabetic plantar soft tissue." *Foot Ankle Int* **32**(8): 802-810.
- Warner, R. R., K. J. Stone and Y. L. Boissy (2003). "Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure." *J Invest Dermatol* **120**(2): 275-284.
- Wehrman, T., X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau and K. C. Garcia (2007). "Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors." *Neuron* **53**(1): 25-38.
- Wei, J. C. J., G. A. Edwards, D. J. Martin, H. Huang, M. L. Crichton and M. A. F. Kendall (2017). "Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans." *Sci Rep* **7**(1): 017-15830.
- Weinstein, B. M. (2005). "Vessels and nerves: marching to the same tune." *Cell* **120**(3): 299-302.
- Wende, H., S. G. Lechner, C. Cheret, S. Bourane, M. E. Kolanczyk, A. Pattyn, K. Reuter, F. L. Munier, P. Carroll, G. R. Lewin and C. Birchmeier (2012). "The transcription factor c-Maf controls touch receptor development and function." *Science* **335**(6074): 1373-1376.
- Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." *Physiol Rev* **83**(3): 835-870.
- Wertheimer, E., N. Spravchikov, M. Trebicz, M. Gartsbein, D. Accili, I. Avinoah, S. Nofeh-Moses, G. Sizyakov and T. Tennenbaum (2001). "The regulation of skin proliferation and differentiation in the IR null mouse: implications for skin complications of diabetes." *Endocrinology* **142**(3): 1234-1241.
- Wessler, I. and C. J. Kirkpatrick (2008). "Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans." *Br J Pharmacol* **154**(8): 1558-1571.
- Wiesner-Menzel, L., B. Schulz, F. Vakilzadeh and B. M. Czarnetzki (1981). "Electron microscopical evidence for a direct contact between nerve fibres and mast cells." *Acta Derm Venereol* **61**(6): 465-469.
- Wietecha, M. S., W. L. Cerny and L. A. DiPietro (2013). "Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* **367**: 3-32.

- Wilgus, T. A., Y. Vodovotz, E. Vittadini, E. A. Clubbs and T. M. Oberyszyn (2003). "Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment." *Wound Repair Regen* **11**(1): 25-34.
- Wilyard, C. (2018). "Unlocking the secrets of scar-free skin healing." *Nature* **563**(7732): S86-S88.
- Wimalawansa, S. J. (1997). "Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily." *Crit Rev Neurobiol* **11**(2-3): 167-239.
- Winkelmann, R. K. and A. S. Breathnach (1973). "The Merkel cell." *J Invest Dermatol* **60**(1): 2-15.
- Woessner, J. F., Jr. (1991). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling." *Faseb J* **5**(8): 2145-2154.
- Wojciechowicz, K., K. Gledhill, C. A. Ambler, C. B. Manning and C. A. Jahoda (2013). "Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4." *PLoS One* **8**(3): 26.
- Wolberg, A. S. (2007). "Thrombin generation and fibrin clot structure." *Blood Rev* **21**(3): 131-142.
- Wong, S. L., M. Demers, K. Martinod, M. Gallant, Y. Wang, A. B. Goldfine, C. R. Kahn and D. D. Wagner (2015). "Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing." *Nat Med* **21**(7): 815-819.
- Wong, V. W., M. Sorkin, J. P. Glotzbach, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2011). "Surgical approaches to create murine models of human wound healing." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 969618.
- Woo, S. H., S. Ranade, A. D. Weyer, A. E. Dubin, Y. Baba, Z. Qiu, M. Petrus, T. Miyamoto, K. Reddy, E. A. Lumpkin, C. L. Stucky and A. Patapoutian (2014). "Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction." *Nature* **509**(7502): 622-626.
- Wood, S., V. Jayaraman, E. J. Huelsmann, B. Bonish, D. Burgad, G. Sivaramakrishnan, S. Qin, L. A. DiPietro, A. Zloza, C. Zhang and S. H. Shafikhani (2014). "Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response." *PLoS One* **9**(3): e91574.
- Wood, W. A., M. A. Wood, S. A. Werter, J. J. Menn, S. A. Hamilton, R. Jacoby and A. L. Dellon (2005). "Testing for loss of protective sensation in patients with foot ulceration: a cross-sectional study." *J Am Podiatr Med Assoc* **95**(5): 469-474.
- Woodley, D. T., J. D. Chen, J. P. Kim, Y. Sarret, T. Iwasaki, Y. H. Kim and E. J. O'Keefe (1993). "Re-epithelialization. Human keratinocyte locomotion." *Dermatol Clin* **11**(4): 641-646.
- Wu, Y., Y. Ding, Y. Tanaka and W. Zhang (2014). "Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention." *Int J Med Sci* **11**(11): 1185-1200.
- Yamada, N., Y. Kashima and T. Inoue (1996). "Scanning electron microscopy of the basal surface of the epidermis of human digits." *Acta Anat* **155**(4): 242-248.
- Yan, D., X. Liu and S. W. Guo (2019). "Neuropeptides Substance P and Calcitonin Gene Related Peptide Accelerate the Development and Fibrogenesis of Endometriosis." *Sci Rep* **9**(1): 019-39170.
- Yang, L., S. Serada, M. Fujimoto, M. Terao, Y. Kotobuki, S. Kitaba, S. Matsui, A. Kudo, T. Naka, H. Murota and I. Katayama (2012). "Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma." *PLoS One* **7**(7): e41994.
- Yang, Z., Y. Zhang, R. Chen, Y. Huang, L. Ji, F. Sun, T. Hong and S. Zhan (2018). "Simple tests to screen for diabetic peripheral neuropathy." *Cochrane Database Syst Rev* **2018**(7): CD010975.
- Yeomans, D. C., V. Pirec and H. K. Proudfit (1996a). "Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence." *Pain* **68**(1): 133-140.
- Yeomans, D. C. and H. K. Proudfit (1996b). "Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence." *Pain* **68**(1): 141-150.
- Yoneda, K., T. Nakagawa, O. T. Lawrence, J. Huard, T. Demitsu, Y. Kubota and R. B. Presland (2012). "Interaction of the profilaggrin N-terminal domain with lorycin in human cultured keratinocytes and epidermis." *J Invest Dermatol* **132**(4): 1206-1214.
- Yoon, S. O., P. Casaccia-Bonnel, B. Carter and M. V. Chao (1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." *J Neurosci* **18**(9): 3273-3281.
- Yotsu, R. R., N. M. Pham, M. Oe, T. Nagase, H. Sanada, H. Hara, S. Fukuda, J. Fujitani, R. Yamamoto-Honda, H. Kajio, M. Noda and T. Tamaki (2014). "Comparison of characteristics and healing

- course of diabetic foot ulcers by etiological classification: neuropathic, ischemic, and neuro-ischemic type." *J Diabetes Complications* **28**(4): 528-535.
- Zhang, X., J. Huang and P. A. McNaughton (2005). "NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels." *Embo J* **24**(24): 4211-4223.
- Zhao, J., Y. Yao, C. Xu, B. Cheng and Q. Xu (2011). "Expression of GAP-43 in fibroblast cell lines influences the orientation of cell division." *Int J Dev Neurosci* **29**(4): 469-474.
- Zhao, R., H. Liang, E. Clarke, C. Jackson and M. Xue (2016). "Inflammation in Chronic Wounds." *Int J Mol Sci* **17**(12).
- Zheng, X., S. Narayanan, V. G. Sunkari, S. Eliasson, I. R. Botusan, J. Grunler, A. I. Catrina, F. Radtke, C. Xu, A. Zhao, N. R. Ekberg, U. Lendahl and S. B. Catrina (2019). "Triggering of a Dll4-Notch1 loop impairs wound healing in diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**(14): 6985-6994.
- Zhou, H. M., J. Wang, C. Elliott, W. Wen, D. W. Hamilton and S. J. Conway (2010). "Spatiotemporal expression of periostin during skin development and incisional wound healing: lessons for human fibrotic scar formation." *J Cell Commun Signal* **4**(2): 99-107.
- Ziche, M., L. Morbidelli, M. Pacini, P. Dolara and C. A. Maggi (1990a). "NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins." *Br J Pharmacol* **100**(1): 11-14.
- Ziche, M., L. Morbidelli, M. Pacini, P. Geppetti, G. Alessandri and C. A. Maggi (1990b). "Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells." *Microvasc Res* **40**(2): 264-278.
- Zimmerman, A., L. Bai and D. D. Ginty (2014). "The gentle touch receptors of mammalian skin." *Science* **346**(6212): 950-954.
- Zomer, H. D. and A. G. Trentin (2018). "Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research." *J Dermatol Sci* **90**(1): 3-12.
- Zouboulis, C. C. (2004). "Acne and sebaceous gland function." *Clin Dermatol* **22**(5): 360-366.
- Zouboulis, C. C., M. Picardo, Q. Ju, I. Kurokawa, D. Torocsik, T. Biro and M. R. Schneider (2016). "Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function." *Rev Endocr Metab Disord* **17**(3): 319-334.
- Zwanenburg, P. R., S. F. M. Backer, M. C. Obdeijn, O. Lapid, S. L. Gans and M. A. Boermeester (2019). "A Systematic Review and Meta-analysis of the Pressure-induced Vasodilation Phenomenon and its Role in the Pathophysiology of Ulcers'." *Plast Reconstr Surg* [**Epub ahead of print**].
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius and E. D. Hogestatt (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* **400**(6743): 452-457.

ANNEXES

Annexe 1. Chapitre de livre publié

Remoué, N., et al., Chapter 12 - Animal models in chronic wound healing research: for innovations and emerging technologies in wound care, in *Innovations and Emerging Technologies in Wound Care*, A. Gefen, Editor. 2020, Academic Press. p. 197-224.

Innovations and Emerging Technologies in Wound Care

Edited by
Amit Gefen



ACADEMIC PRESS

An imprint of Elsevier

Academic Press is an imprint of Elsevier
125 London Wall, London EC2Y 5AS, United Kingdom
525 B Street, Suite 1650, San Diego, CA 92101, United States
50 Hampshire Street, 5th Floor, Cambridge, MA 02139, United States
The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, United Kingdom

Copyright © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Details on how to seek permission, further information about the Publisher's permissions policies and our arrangements with organizations such as the Copyright Clearance Center and the Copyright Licensing Agency, can be found at our website: www.elsevier.com/permissions.

This book and the individual contributions contained in it are protected under copyright by the Publisher (other than as may be noted herein).

Notices

Knowledge and best practice in this field are constantly changing. As new research and experience broaden our understanding, changes in research methods, professional practices, or medical treatment may become necessary.

Practitioners and researchers must always rely on their own experience and knowledge in evaluating and using any information, methods, compounds, or experiments described herein. In using such information or methods they should be mindful of their own safety and the safety of others, including parties for whom they have a professional responsibility.

To the fullest extent of the law, neither the Publisher nor the authors, contributors, or editors, assume any liability for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions, or ideas contained in the material herein.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

A catalog record for this book is available from the Library of Congress

British Library Cataloguing-in-Publication Data

A catalogue record for this book is available from the British Library

ISBN: 978-0-12-815028-3

For information on all Academic Press publications visit our website
at <https://www.elsevier.com/books-and-journals>

Publisher: Mara Conner

Acquisition Editor: Fiona Geraghty

Editorial Project Manager: Joshua Mearns

Production Project Manager: R.Vijay Bharath

Cover Designer: Matthew Limbert

Typeset by TNQ Technologies



Animal models in chronic wound healing research: for innovations and emerging technologies in wound care

Noelle Remoué, Christelle Bonod, Bérengère Fromy, Dominique Sigaudou-Roussel

Laboratory of Tissue Biologie and Therapeutic Engineering, UMR 5305, CNRS, University of Lyon 1, Lyon, France

Chapter Outline

- 1. Introduction 198**
- 2. From acute to chronic wound healing process 198**
- 3. Animal models 202**
 - 3.1 Porcine 203
 - 3.2 Rodents 204
 - 3.3 Rabbits 204
 - 3.4 Diseased animals 204
- 4. Chronic wound methods to study the healing process 206**
 - 4.1 Excisional wounds 206
 - 4.2 Pressure wounds 206
 - 4.3 Friction 209
 - 4.4 Deep tissue injury 210
 - 4.5 Temperature 211
 - 4.6 Ischemic wounds 212
 - 4.7 Burn 213
 - 4.8 Infected wounds: biofilm 214
 - 4.9 Innovation 214
 - 4.10 Molecular target 215
 - 4.11 Living cell advanced therapy 215
 - 4.12 MicroRNAs 215
 - 4.13 Exosomes 216
 - 4.14 Dressings 216
- 5. Conclusions 217**
- References 218**

Innovations and Emerging Technologies in Wound Care. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815028-3.00012-2>
Copyright © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Wound healing is an important physiological process for the integrity of the skin after different trauma. The normal wound healing process involves four overlapping events: hemostasis, inflammation, cellular proliferation, and extracellular matrix (ECM) remodeling [1] to restore tissues and maintain skin integrity [2].

When wound healing is compromised resulting in wound healing delay or no healing at all, it is called a chronic wound, and it puts at risk the body to infection and further health complications. Aging and pathological conditions such as diabetes are the main cause of chronic wounds. Chronic wounds are a major concern, not only for elderly but also for patients with diabetes mellitus. A diabetic foot infection remains one of the major causes of lower extremity amputation and thus constitutes a major burden for patients and clinicians [2].

In addition, as a result of the global increase in chronic diseases due to population aging, it is foreseeable that there will be a concomitant increase in the number of people with wounds secondary to chronic disease [3,4]. Therefore, with a rising prevalence of chronic wounds bearing notable effects on patient morbidity including amputations, appropriate and effective intervention to treat these debilitating wounds can make a significant clinical impact.

Until now, efficient and targeted treatments for chronic wounds are still lacking, which, in part, is due to our limited understanding of the biological mechanisms underlying these diseases [5]. Therefore, the understanding of the possible mechanisms that would promote skin regeneration and function restoration is crucial to develop effective therapeutics for the treatment of impaired wound healings [6].

Consequently, the development of drugs to improve wound-healing process is of great therapeutic interest, and additional knowledge about the molecular mechanism underlying the healing process is needed [2]. Several biological models have been used to comprehend skin healing process from *in vitro*, *ex vivo*, and *in silico* to *in vivo* studies [7,8]. Each of these models provides valuable information about one or more components/factors involved in the pathological healing process. However, none of them reproduce all the characteristics of the pathological human skin regarding the mechanical environment, biophysics, and structure.

The objective of this chapter is to focus on experimental chronic wound healing in animal models and the resulting progress in potential innovative therapeutics.

2. From acute to chronic wound healing process

There are numerous etiologies for wounds from the most common such as traumatic, surgical, infectious, skin tears to pressure ulcers (PUs), thermal injuries, vascular ulcers, and wounds also systemic and chronic disease. Wounds are either acute or chronic.

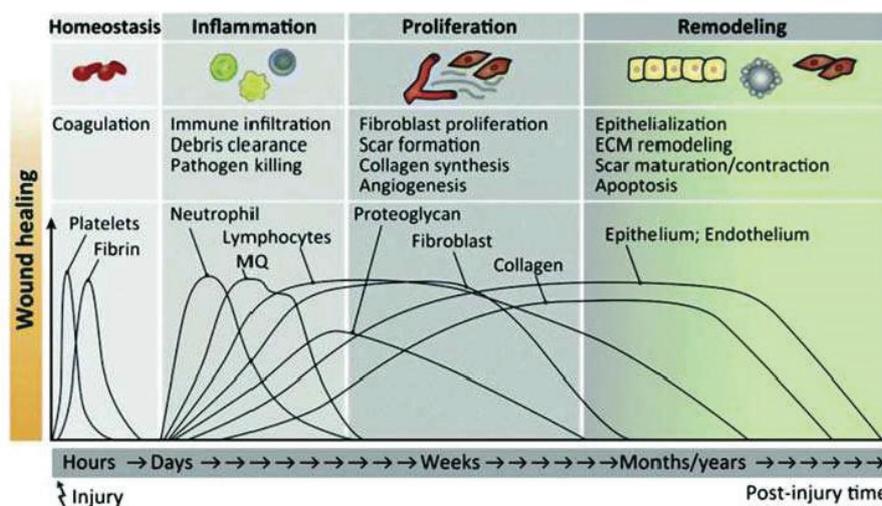


Figure 12.1

Timeline of normal wound healing process. From Mele E. *Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings*. *J Mater Chem B* 2016;4:4801–4812.

Acute wounds are typically due to some form of trauma that could be blunt or penetrating such as incision, excision, and burn. The tissue damage then stimulates a coordinated physiological response described into overlapping stages: (1) the hemostatic phase to quickly cover the site of injury and prevent infection; (2) inflammation phase with immune cells infiltration to clean cell debris; (3) proliferation phase with tissue regeneration to replace the lost cells; and finally (4) remodeling phase with wound resolution to restore the diverse functions of the skin and remodel the new matrix [9].(Fig. 12.1).

After skin injury occurs, the hemostatic phase takes place with platelets that are activated and recruited at the site of injury to promote clot formation to stop blood loss. The beginning of the inflammatory phase starts also with the activation of the platelets that attract immune cells from the blood flow into the wound due to vascular permeability. Neutrophils are first to arrive to clean the wound by producing high levels of reactive oxygen species (ROS), proteases, and proinflammatory cytokines that kill bacteria. Then monocytes differentiate into macrophages [11] to help in further cleaning debris by releasing matrix metalloproteinase and bacterial phagocytosis [12,13]. During the proliferative phase fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes proliferate and migrate to regenerate the lost tissue [14,15]. The ECM, called the granulation tissue, is laid down, and keratinocytes migrate on it to close the wound. Reepithelialization is a critical phase and begins within hours after injury and lasts until complete healing [16,17]. Then occurs the final phase of wound healing, the remodeling of the granulation tissue, where fibroblasts produce ECM and allows ECM network to mature [17] and increase its

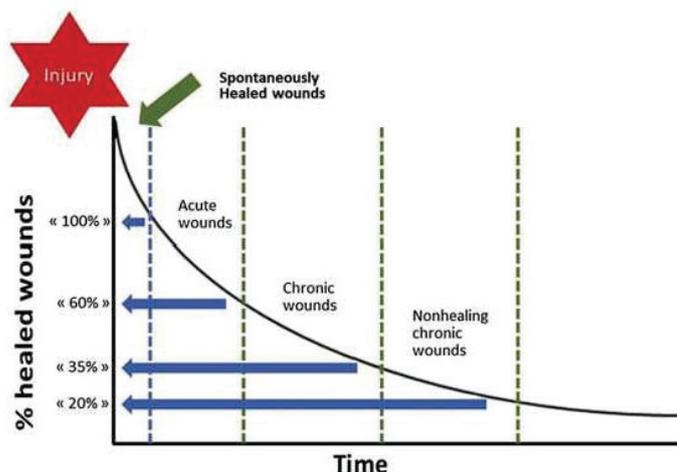


Figure 12.2

Regression curve showing the % of healed wounds over time. From Bosanquet DC, Harding KG. *Wound duration and healing rates: cause or effect? Wound Repair Regen* 2014;22(2):143–150.

mechanical strength [18]. Wound healing is complete following apoptosis of myofibroblasts, vascular cells, and macrophages, leaving an acellular matrix rich in collagen and elastin [12,15,19].

Therefore, acute wound is considered to go through each wound healing stages within the expected period. However, comorbid conditions, chronicity, and confounding factors can impair the velocity and the mechanisms with which repair should occur.

Chronic wounds are typically wounds that demonstrate delayed healing 12 weeks after the initial insult often caused by pathological conditions such as diabetes or because of aging processes (Fig. 12.2).

There are numerous data supporting the hypothesis that chronic wounds display excessive inflammation with a greater number of inflammatory cells, such as neutrophils, lymphocytes, and macrophages [20]. In chronic wounds, the early impairment of the macrophage switch from proinflammatory to antiinflammatory phenotypes is believed to contribute to the impairment in tissue repair [19,21]. The resultant inflammatory environment contains high levels of inflammatory cytokines, proteases, and ROS [22,23] and low levels of protease inhibitors, such as metalloproteinases inhibitors (TIMPs) [12,24], and growth factors such as Vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor [25]. The consequence is an excessive degradation of the ECM and absence of both proliferative and remodeling phase [12,19], resulting in failure of progression of wound healing [20]. (Fig. 12.3).

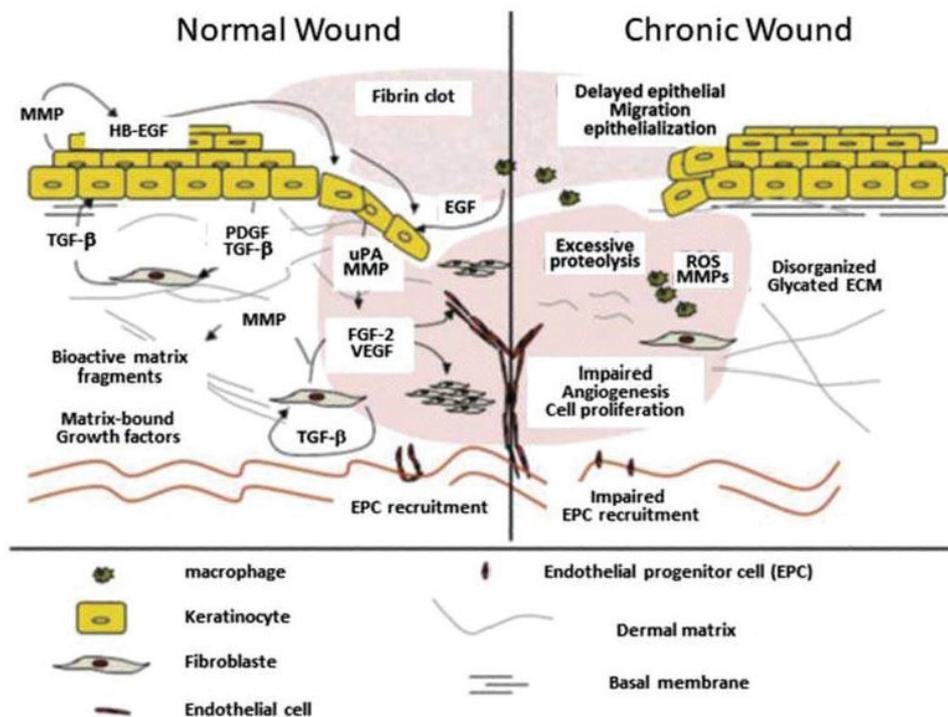


Figure 12.3

Comparison of the microenvironment in the epidermis and the dermis between a normal wound and a chronic wound. From Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. *Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. Adv Skin Wound Care* 2012;25(8):349–370.

Therefore, in pathological conditions, any wound can become chronic resulting in the disorder of the original tissue structure and homeostasis.

Regardless the etiology of the wound, the main repair processes are common, but there could be some difference in duration of wound healing and in cellular mechanism depending on the following:

- The size and the depth of the lesion as well as the extend of any necrotic tissue to be cleaned. In addition, the wound depth has to be taken into consideration regarding epithelialization time [13,27].
- The type of injury. Indeed, for incisional repair the majeure healing process is a reintegration of the separated tissue sections. In contrast, excisional wound repair is a regeneration of tissue mass to replace the lost tissue to heal the wound. Thus, the granulation



Figure 12.4

Clinical presentation of various chronic wound pathologies. From Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014;6(265):265sr6.

tissue response that marks excisional repair is largely absent during incisional repair [8,9].

Among the chronic wounds etiology, there are specific chronic wounds, which include venous leg ulcers (VLUs), diabetic foot ulcers (DFUs), arterial insufficiency, and PUs. The main causes of human chronic wounds are vascular compromise and repeated trauma [28]. However, several other factors are also involved in human chronic wounds such as the following:

- Diabetes and aging through the pathological changes occurring such as damages to the peripheral nervous system decreasing, vascular function, and skin homeostasis;
- Sedentarity by increasing the duration of tissue compression and friction;
- Polymicrobial wound infection with an ensuing biofilm further contributes to the development of chronic wounds and impaired wound healing.

In addition, the other big issues of chronic wounds, after having first struggled to manage to heal the wound, are the reulceration of healed wounds. In excisional healing, rapid reepithelialization could cause premature transition to the resolution phase [29,30] resulting in a thin and weaker dermis that would predispose to reulceration [9]. Aberration of wound healing such as hypertrophic scar and keloid will not be discussed in this chapter (Fig. 12.4).

3. Animal models

In vivo animal studies require good practice with ethical agreements and by promoting the 3R guidelines to replace the use of animal with alternative techniques, reduce the number

Animal models in chronic wound healing research 203

of animals used to a minimum, and refine the way experiments are carried out to improve animal welfare. Therefore, procedures for the maintenance and use of the experimental animals are carried out in accordance with the principles of each country's directive and have to be approved by an ethic committee for animal experiments and validated by the administration in charge.

Animal model has to be chosen appropriately depending on the studies as none of the animal skin exhibits all the human skin properties. As very well discussed by Wells and colleagues [9], human skin presents an infrequently used architecture that is shared only with other primates and pigs.

There are also differences in life span, size, and genetics in all the animal models, differences in chronic disease pathophysiological manifestations, and aging process compared to human [9]. However, various animal wound healing models have been successfully developed to better understand the basic mechanisms of chronic wound healing process and its pathophysiology. Mouse, rat, porcine, and rabbit are the main animal models assessed for wound healing studies, but porcine skin has major similarities with human skin.

Furthermore, in efforts to induce a wound healing delay, a pathological chronic wound environment is reproduced by submitting animal models to several pathological conditions such as diabetes, ischemia, ischemia–reperfusion (IR), wound biofilm, or mechanical pressure [31].

3.1 Porcine

Porcine models have emerged as promising models to study wound healing as pigs have anatomically and physiologically similar skin to humans and have been used to study many other diseases as reviewed by Seaton [13]. Similar to humans, pigs have a thick epidermis, dense elastic fibers in the dermis [32], similar immune cells, and biochemical structure of collagen to human skin [33]. Nevertheless, there are some differences with human skin, and among them, we can notice a reduction in microvascular density in the dermis as well as apocrine sweat glands as compared to eccrine sweat glands in human skin, which are major reservoirs of keratinocytes during wound epithelialization [34].

Nonetheless, pig wound models appear to be an appropriate model to comprehend cutaneous wound healing in humans as reported by Sullivan et al. [35], showing that pig models were 78% concordant with human studies regarding wound therapies.

Although pig models have been developed to study several chronic wound healing pathologies, they are expensive to purchase and feed, difficult to manage, difficult to render transgenic, and difficult to supply antibodies and PCR probes compared with other animal species [13].

204 Chapter 12

3.2 Rodents

Mice are commonly used animal models for wound healing studies; nevertheless, there are some differences with human skin [36].

Contraction is one of the main mechanisms involved in murine skin healing in contrast to reepithelialization that occurs in human to close the wound. However, recently, it has been reported that both contraction and reepithelialization were involved in skin healing [37]. In addition, by applying a silicone splint around the cutaneous wound in rodents, it facilitates “humanized” less contracted wound healing through the processes of granulation and reepithelialization [38].

Mice have more densely packed hair follicles and thinner epidermal and dermal layers compared to human skin [139] with substantial differences in immune systems compared to humans (Mestas and Hughes 2004). Mice lacking either hair follicles or hair follicle stem cells show delayed wound healing [39,40]. Mice have been used to study most of the chronic wound healing pathologies. Rats have also loose skin because of their skin elasticity and lack of adherence to the underlying structures as mice but not human skin [41]. Particularly, in wound healing studies, it is important to note that rodents have the ability to synthesize vitamin C that plays a key role in collagen synthesis [42].

In a recent review, Isakson et al. [38] reported that rodent models were used in 78% of the papers assessed, with incisional, excisional, and burn wounds used to assess healing (see figure). Rodents are mainly used as animal models for preclinical wound healing studies because of high availability, low cost, and ease of handling [38]. Nevertheless, they clearly cannot be considered a gold standard for preclinical studies, which is why pig test is a preferred preclinical test before translation to human studies [38] (Fig. 12.5).

3.3 Rabbits

Rabbits are large animals with easily accessible ear lobes, which makes logistics of skin as well as the vascular system easier than in smaller animals. They have a thicker skin and a lack of sebaceous glands compared to human skin. The wound does not heal by contraction but heals from the wound edge [43]. Finally, animals with minimal genome variations as well as with specific genetic differences are commercially available [44].

3.4 Diseased animals

To be able to study chronic wound healing or at least delayed wound healing, we need to perform experiments on models that exhibit those conditions. Aging or diabetes is the well-known factors promoting wound healing delay and conditions suffering from chronic nonhealing wound.

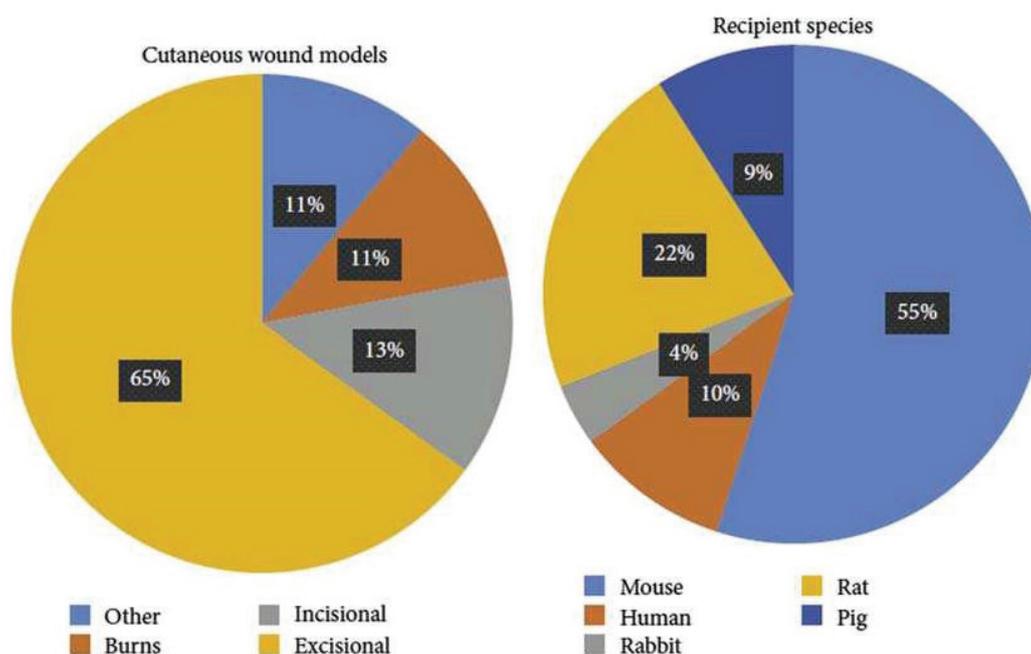


Figure 12.5

Cutaneous wound models studied and animal models used for cutaneous wound healing studies.

From Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJ. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. Stem Cell Int 2015;2015:831095.

Diabetic mice are either generated by genetic mutation that results in a diabetes-like phenotype (db/db, NOD mice), induced by chemical injection with streptozocin [45] and/or by using diverse hypercaloric diet [46]. Rats, rabbits, and pigs can also be rendered diabetic using either streptozotocin or alloxan [43,47,48]. Not all the diabetic human complications are present or similar in diabetic model animals. Indeed, arteriosclerosis observed in the human diabetic pathology is not present in diabetic rodent models, and although hyperglycemia and advanced glycosylated end products are present, they are more expressed than in the human pathology [9,12].

Nonetheless, diabetic mice wounds share several characteristics in common with chronic wounds in diabetic patients such as nerve density, angiogenesis, granulation tissue formation, and collagen content [49]. However, although diabetic mice exhibit a wound healing delay than wild-type mice, they do finally heal without any additional treatment in contrast to human diabetic chronic nonhealing wound. Therefore, diabetic mice are not an ideal model for chronic wound studies, but since they do share some similarities with human diabetic pathology that makes them as widely accepted model in current wound healing research [12,50]. Indeed, delayed healing process is observed in the presence of

206 Chapter 12

peripheral neuropathy using Streptozotocin (STZ) in the context of diabetes as well as selective damages affecting C and A δ fibers due to resiniferatoxin-mediated small fiber neuropathy that delayed granulation tissue remodeling after burn in rats [51-53].

In comparison to diabetic mice only few murine studies have examined the effect of age on healing outcomes [54,55]. Age-related wound healing impairment seems to be caused by a reduction in oestrogen levels in both males and females that have an impact on all phases of wound healing [56] and specially on inflammation [57]. In addition, social isolation related to ageing is associated to wound healing delay through a reduction of growth factors required for skin cell function such as proliferation [58,59].

4. Chronic wound methods to study the healing process

Experimental chronic wound methods have been developed through the years from the most simple ones (incision, excision) to the most complex ones (burn, PU, and VLU) to better understand the pathophysiology of delayed wound healing to improve the treatment. In this field, the skin is the main organ assessed, but some studies also focused on skeletal muscle that can be impaired in a severe form of PU (deep tissue injury) without any visible damage on the skin [60]. In addition, we will also review numerous models that have been employed in animals using friction, temperature, biofilm, and muscle damage, which are associated to chronic wound (Fig. 12.6).

4.1 Excisional wounds

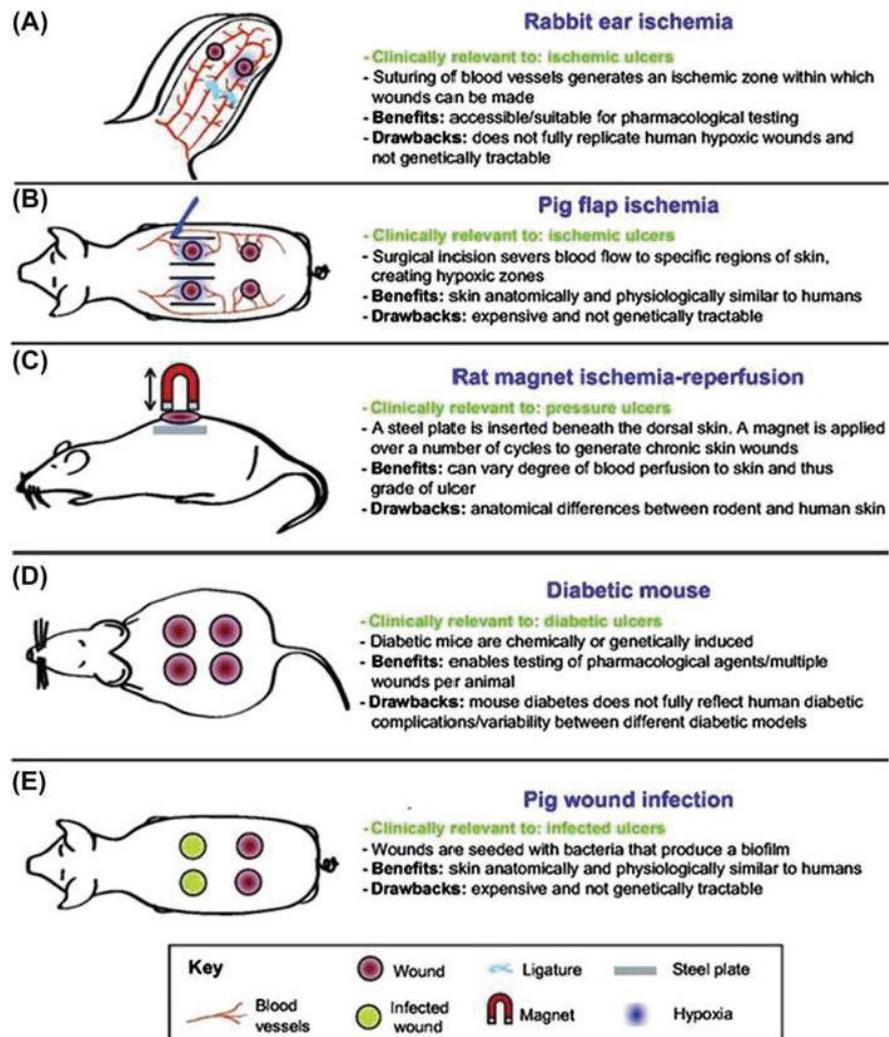
The most commonly employed method model used to study wound healing is the excisional wound model that can be superficial, partial thickness, or full thickness [13]. Many studies have been performed in healthy and diseased rats, mice, rabbits, and pigs using this method to better understand chronic wound healing [58]. The wound is mainly created on the dorsum of the animal and can extend through the panniculus carnosus for the rodents, except in rabbits, where the wounds are mainly performed on ears. In mice, rats, and rabbits, the size of excision can vary from 6 to 12 mm of diameter, whereas in pigs from 2 to 5 cm of diameter.

Wound closure is then photographed regularly and calculated based on wound size relative to the original wound dimensions [58]. To limit the wound contraction observed in rodents, the addition of a silicone ring onto the cutaneous wound in rodents has allowed for an accurate, reproducible model of wound healing with less contraction [38].

4.2 Pressure wounds

PUs can start superficially or deep within the tissues. Superficial ulcers form within the skin and may progress downward, whereas deep ulcers arise in muscle layers covering bony prominences and are mainly caused by sustained compression of the tissues [61,62].

Animal models in chronic wound healing research 207



Dis Model Mech. 2014 Nov; 7(11): 1205–1213.

Figure 12.6

Different animal models and methods to study chronic-skin-wound. From Nunan R, Harding KG, Martin P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech* 2014;7(11):1205–1213

Several methods have been developed to induce and explore PU in animals to identify specific aspects of wound development, quantify the extent of lesions, assess wound healing mechanism, and assess outcomes for extrapolation to clinical relevance [63].

Prolonged mechanical loading will lead to capillary occlusion, resulting in tissue ischemia with associated localized hypoxia, and associated-lymphatic occlusion will lead to

208 Chapter 12

accumulation of toxic metabolites leading to local cell death and local breakdown of soft tissues [64–66].

Although the fundamental mechanisms responsible for healing in PUs are not fully understood, skin injury models provide valuable clues. Several methods have been developed to apply skin pressure and study either the incidence of PU or the healing process [58,63,67,68]. Models based on single or cyclical magnetic compression [58] allowed researchers to examine wound inflammation, apoptosis, and reactive oxygen-mediated signaling following injury. When the skin is at risk, a single pressure application is able to induce a skin lesion due to ischemia and hypoxia [69].

The use of a metal plate underneath the skin requires a surgery from 2 days to 1 week before applying a magnet on the skin. However, this method does not allow following up the healing process as the injured skin tends to stick to the metal plate inducing some confounding effects. The method used to both induce a pressure injury and follow up the healing process requires two magnets on both sides of a fold of skin on the back of the animals under short isoflurane anesthesia. This leads to the induction of two PUs.

Protocols used either a single or cyclic magnet application. Cyclic magnet application provides more severe skin injury than single application, but it all depends on the pressure applied, which can vary from 50 mmHg to 500 mmH. Some extreme pressures such as 800–2000 mmHg have been used in some studies [70,71]. The duration can also vary from 2 to 15h. The interest of the magnet method is to calibrate the pressure/duration in function of the question to answer. Those protocols are mostly performed in rodents but, in rabbit magnet with attached string loop, can be placed on the left ear ventral surface and a second identical magnet attached to the dorsal side to complete a magnetic seal. The magnets (49 mmHg/cm^2) can be kept on the right ear for 90 min before being removed [44].

The pathogenesis of PUs and diabetic foot is thought to be mediated through injurious cycles of IR. IR injury is a major factor in the pathogenesis of chronic skin wounds. IR is due to positional changes and/or mechanical loading and unloading of the affected areas, which leads to repetitive IR with a major impact on cutaneous blood flow, and can be related to venous stasis ulcers, diabetic ulcers, and PUs. Studies suggest that repeated cycles of IR, impairing blood and lymph flow locally, lead to cell necrosis in the epidermis, dermis, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues from Refs. [50,72] together with the molecular derangements induced by local tissue hypoxia, cellular senescence, and bacterial colonization [72].

Proinflammatory cytokine expression seems to be cycle responsive and correlates in some reports with the influx of inflammatory cells that, in turn, mediate tissue destruction

Animal models in chronic wound healing research 209

[72,73]. The loss of necrotic tissue is essential to the closure of PUs. In PUs, the delay in the keratinocyte migration compromises reepithelialization impairing necrotic skin loss and subsequent phases of wound healing [74,75]. However, when dermal adipose tissue is increased, repeated IR cycle induced major skin compared to single pressure application [76,77].

Reactive hyperemia is an important physiological mechanism in response to the release of mechanical loading of the skin resulting in increased cutaneous blood flow that can be measured noninvasively by a laser Doppler flowmeter, laser Doppler perfusion imaging, and dynamic laser speckle imaging techniques [64,69,78,79].

To improve the pressure model and to avoid the problem of mice skin, recently, Bujan's group was able to check the stability of dermal scaffold in a mouse long-term transplanted human skin and its retained capacity to react after a PU. The fibrillar microfibrillar proteins of the human dermis act as a scaffold, and their redistribution close to the dermoepidermal junction guarantees the stability of the epidermis. This novel model will facilitate the development of new clinically relevant therapeutic strategies that can be tested directly on human skin [80,81].

Beside diabetes induction or aging studies, other animal models can be assessed under additional contributing factors to PU development. For example, cigarette smoke is also reported to be a risk factor for PUs through endothelial dysfunction and atherosclerosis [82]. Five IR cycles, with 2 h of ischemia and 30 min of reperfusion, were performed in rats that received intraperitoneal nicotine injections. The results suggest that the increased risk of PUs due to cigarette smoking is mediated, in part, by nicotine. They also indicated that the effect of nicotine is not mediated by a change in blood pressure, but it is more likely elicited via an increase of inflammatory mediators [82].

For many years, it has been suggested that floor type is the key factor for the occurrence of footpad injuries in rabbits, and alternatives to wire mesh flooring were developed several years. However, footpad injuries are commonly observed [83,84] and could represent an alternative model to study pressure injury incidence that occurs at the the foot level like in diabetic patients for example. Indeed, wire grates rapidly induce hindpaw tactile hyperesthesia and plantar neuropathy in rats [85].

4.3 Friction

In contrast to pressure that represents the normal force per unit area acting on the skin, shear forces are forces acting parallel to the skin at the interface with a support surface [64]. Emerging evidence has demonstrated the clinical significance of shear to foot ulceration [86,87].

210 Chapter 12

For a long time, friction/shear stress research work suffered from a lack of robust measurement techniques [64,88], but new apparatus have resolved this major point [64]. The presence of shear forces in association with pressure can lead to an increasing rate of cell death caused by enhanced tissue distortion and enhanced occlusion of blood vessels [89]. Indeed, shear forces when added to pressure application cause ulcers for low level pressures in a swine model [64,90]. This enhanced internal deformations in the presence of shear at the skin surface were also observed in a computational model [64,89].

New apparatus were specifically designed to apply a combination of pressure and shear on the skin surface of not only animal models but also in humans. Ohura developed an experimental model consisting of porcine skin and a Predia sensor capable of measuring pressure and shear force simultaneously. External force was applied to the skin model using a 1 kg weight consisting of metal beads. The purpose of this study was to measure the impact of external shear force and pressure on a superficial layer of skin and subcutaneous layer with an underlying bony prominence and also to verify how the influence of these external forces can be reduced after dressings are applied [88].

When shear force is added to pressure, the cutaneous blood flow decreases and showed a significant decrease in cutoff pressure of the microvascular blood supply of the skin in humans [91]. Concentrating pressure and shear stress in deep tissues, while minimizing pressure and shear stress in the overlying skin, produced an effective rat model of deep tissue injury deterioration [92].

4.4 Deep tissue injury

Deep tissue injury (DTI) is a severe form of PU where tissue damage starts in deep tissues, such as skeletal muscle, underneath intact skin rendering it often not detected until it has reached the skin surface. DTI is a recently categorized type of PU and is considered to originate from deep tissue damage that expands outwards to the overlying skin (bottom-up theory), whereas conventional PUs originate in superficial tissues and extend to deeper structures [93].

The etiology of DTI involves several factors, such as ischemia due to tissue compression [71,94] and local tissue deformations [66,95,96], especially during short-duration loading periods when ischemia is not expected to cause any significant skeletal muscle damage [97,98].

Previous studies also showed that muscle tissue is more susceptible to mechanical loading than skin [61]. To date, no study has shown the exact mechanisms of DTI deterioration. In animal experiments of Refs. [99,100], the effect of mechanical loading on the development of muscle damage was investigated by compressing the tibialis anterior muscle of rats with an indenter for 2 h. This revealed large differences in the amount and locations of muscle

damage between the animals, partly due to the inability to reproduce the loading conditions between experiments. Another method was described with a full-thickness skin/muscle PU model using a metal disk implanted beneath the mouse gluteal muscle and cyclical pressure applied with an external magnet [97,101].

In another study, tangent elastic moduli and strain energy densities of rat gracilis muscles were exposed to apply pressure in vivo (11.5, 35, or 70 kPa for 2, 4, or 6 h) [102]. Histological evaluation showed that muscle stiffening under strain accompanied extensive necrotic damage and thus information on internal muscle stresses was required to establish new criteria for pressure sore prevention. A rat model was also used to distinguish between the different factors that contribute to muscle tissue damage related to deep PUs that develop after compressive loading [98]. MRI and histology were performed before and after tissue compression and ischemic loading. Uniaxial loading was applied to the tibialis anterior by means of an indenter, and ischemic loading was accomplished with an inflatable tourniquet. The separate and combined effects of ischemia and deformation were studied and revealed that large deformation with ischemia was responsible for irreversible muscle damage [98]. However, it has been reported in a muscle mechanical loading study that animal and finite element model results suggest that acute ischemia does not develop in skeletal muscles under physiological load levels within a time frame of 40 min [89]. As there is evidence that DTI develops within a shorter time, ischemia is unlikely to be the only factor causing DTI.

Severe pressure loading on flank skin induced early increases in muscle damage associated to elevated expression and activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF1) in skeletal muscles [103]. Apoptotic and/or proteolytic roles of HIF1 might be a part of the mechanism of DTI deterioration [92,104].

In addition, MRI readouts and histological analyses of the damaged muscle tissue revealed that damage occurred at some distance from the deformation and lasted up to 14 days after a single indentation period [105].

However, all those studies have been performed in healthy animals, and further experiments have to be done to understand the behavior of diseased skeletal muscle under compression (Fig. 12.7).

4.5 Temperature

Temperature and humidity can affect the structure of the skin, and under pressure, they can exacerbate the risk of wound occurrence [106]. However, because of several differences in sebaceous glands and thermoregulation in animal skin compared to the human skin, there are only few studies interested in the temperature effect. One study developed an apparatus and procedure to simultaneously apply 12 metal discs (each with a

212 Chapter 12

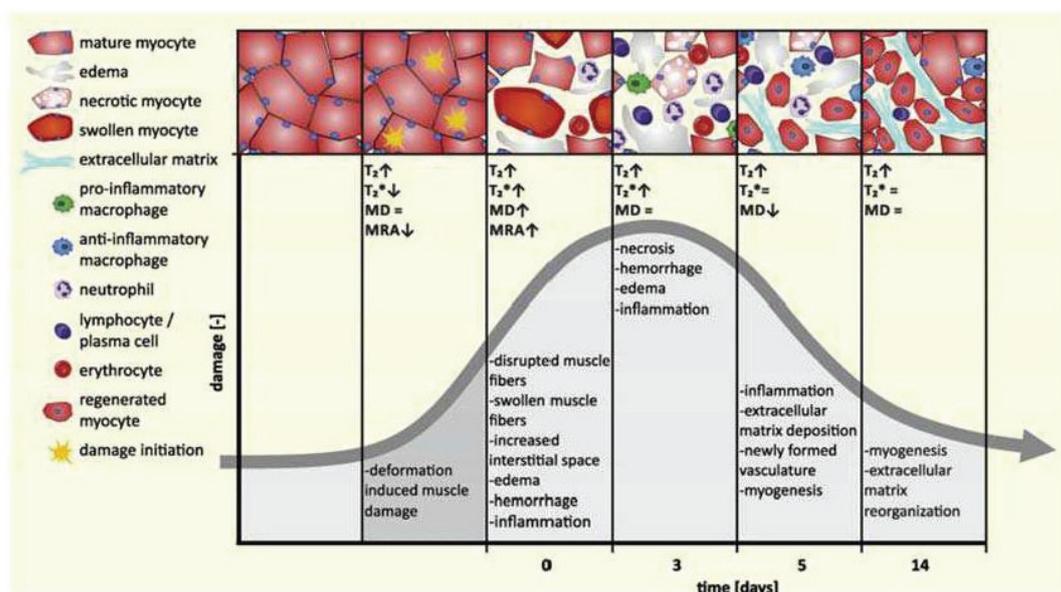


Figure 12.7

Time course of tissue damage and remodeling in the rat model of deep tissue injury. From Nelissen JL, Traa WA, de Boer HH, de Graaf L, Mazzoli V, Savci-Heijink CD, et al. An advanced magnetic resonance imaging perspective on the etiology of deep tissue injury. *J Appl Physiol* (1985). 2018;124(6):1580–1596.

diameter of 51 mm) on the dorsal aspect of the swine, all at an equal pressure of 100 mmHg, for a 5-h period, while servocontrolling disc temperatures at 25, 35, 40, or 45°C. This reliable porcine model was developed to facilitate investigations of PU formation, healing, and prevention. The severity of the resultant tissue injuries correlated with an increase in applied temperature [107].

4.6 Ischemic wounds

The rabbit ear ischemic model was created using a minimally invasive surgical technique [108]. On one ear, three small skin incisions were made on the vascular pedicles about 1 cm from the base of the ear. The central and cranial arteries were ligated and divided along with their accompanying nerves. A circumferential subcutaneous tunnel is made through the incisions to cut subcutaneous tissues, muscles, nerves, and small vessels [109]. Thus, it creates a full-thickness wound that lacks a vascular base and has very little lateral vascular supply [50,108].

Previous models used an H- or U-shaped cutaneous flap on the back of mice or rats, which is usually used as a simple ischemic skin wound model. However, the degree of ischemia to each flap varies with the size and dimension of the flap, new vascular

channels develop quickly within few days, and blood perfusion returns to normal within about 2 weeks. There also exist natural cranio-caudal differences in granular tissue formation in small animals such as mice or rats, which adds to the complexity in comparison [109].

The ischemic ulcer model is reproducible and quantifiable and is potentially a useful model for examining agents to improve ulcer healing where blood flow is decreased [108]. Previously, it has been established in the rabbit ear ischemia model that the impact of age and ischemia is additive and together produce a profound impairment in wound healing sufficient to produce a chronic wound and a lack of response to transforming growth factor (TGF)- β 1. The rabbit ear ulcer does not heal by skin contraction. This is advantageous over cutaneous wounds in rodents, which heal by contraction [43]. Several adaptations of the ear ischemic model have been done as the development of a reversible IR clamp and the effects of cyclic IR injury [72]).

Ischemic models are also performed on the back of rat skin more than mice due to the size [110]. A novel addition to this ischemic skin flap model is the placement of a silicone sheet beneath the flap that functions as a barrier and a splint to prevent revascularization and reduce contraction as the wounds heal [50].

4.7 Burn

Burns are a global public health problem with an estimation of 180,000 deaths every year in the world. Although burn wound management has been largely improved by using epithelial cells and sheets, there is still a need to better understand the healing process. A number of animal models have been described to assess the impact of burns on healing after injury [111]. The animal model has to be reproducible and as close as possible to burn lesions occurring in humans, taking into account the different structural properties of the skin between different animal species and humans. Most of the animal models described so far were set up many years ago and are still currently used [111].

Seaton et al. published a very thorough review on the different techniques to use to study burn wounds [13]. A contact burn can be made by applying a heated metal bar or container filled with hot water directly to the skin. Alternatively, scalding and flame burn mechanisms have been reported. Reproducibility of burn depth is lower than excisional or pressure models. However, the specificity of burn model is to evaluate processes that convert ischemic zones to hyperemic or coagulated zones [13]. One of the limitations reported in using mice in burn wound models is that they cannot tolerate more than 30% total body surface area burns, and those burn injuries do not provoke the hypermetabolic response seen after large human burns [41,112].

214 Chapter 12

4.8 Infected wounds: biofilm

The importance of biofilms on chronic wounds has only recently gained attention. About 60%–90% of chronic wounds have a biofilm versus only 6% of acute wounds [113]. Microbial biofilms are complex communities of microorganisms that attach to surfaces and secrete extracellular polymeric substances (EPS). The secretion of EPS acts as a biochemical barrier, protecting the biofilm from both mechanical and shear forces, and more importantly, the penetration of antimicrobial substances [114].

Bacterial species found to reside in chronic wounds biofilm are mainly *Staphylococcus aureus* followed by *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* [115–118]. Therefore, novel cutaneous infected wound models were developed by inoculating one or mixed bacterial species such as *S. aureus*, *S. epidermidis*, or *P. aeruginosa* in mice or pigs [119,120].

Older mice excision wound model inoculated with *S. aureus* failed to clear the infection and showed less immune cells infiltration and increased bacterial colonization [121,122] with delayed reepithelialization than the young mice [119]. Similar results have been observed in diabetic mice with *P. aeruginosa*–infected chronic wounds displaying impaired bacterial clearing and wound closure in comparison with their nondiabetic littermates [123]. It is suggested that biofilm bacteria secretion could also inhibit cell proliferation and migration delaying even further the wound healing process.

In contrast to mice observations, in porcine burn wounds infected with biofilms, closure rates were normal, but they did exhibit failure in barrier function with epidermal water loss resulting from malfunctioning tight junction through biofilm-inducible microRNAs (miRNAs) that specifically silence tight junction proteins [120]. Therefore, biofilms could lead to postclosure complications, including infections and the recurrence of skin breakdown contributing to the chronicity of the wound [50,120].

4.9 Innovation

From all those animal models and chronic wound studies, many results arose, providing better comprehension of the pathological process and several new paths to improve the healing process. Therapeutic strategies that emerged are either based on physical or biological stimulations. Physical therapy approaches have been designed using different protocols of either electrical, ultrasound, or light stimulations [124]. Biological therapies are based on molecular stimulation and target cell replacement, and both need delivery technologies such as dressings or nanocarriers and alternatively onboard cutaneous preventive system.

4.10 Molecular target

Several molecules have been administrated to the wound area to improve the healing process, and for many years, growth factor–based therapies have been assessed. Several growth factors including platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, TGF, and epidermal growth factor (EGF) have been introduced as potential adjunctive therapies to promote ulcer healing [125]. Recently, a first multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial showed the efficacy and safety of a recombinant human EGF spray by decreasing the healing duration of DFUs [52].

4.11 Living cell advanced therapy

Interest in the use of stem cells has grown in the last decade by using them to regenerate the skin during chronic wound. Stem cells can be distinguished in epithelial and mesenchymal cells. Epithelial stem cells are adult tissue–resident stem cells such as interfollicular epidermal stem cells and hair follicle stem cells, while mesenchymal stem cells come from bone marrow’s adipose tissue and umbilical blood cord [126]. Several experimental studies and some clinical studies have proved the efficacy of transplanted cultured epithelial cells or epithelial allografts to treat chronic wounds. Further clinical trials will be necessary to determine the safety from isolation to administration and efficacy of such cell treatments [126].

Very recently, it has been showed that it was also possible to reprogram wound-resident mesenchymal cells that enable all regions of the wound to reepithelialize and lead to a regenerative functional response in the endogenous skin. Before clinical applications of this potentially transformative, nonsurgical technology can be realized, further improvements must be made [127].

Major improvement enhances cell survival following transplantation through improving the delivery system, e.g., 3D printing or environment, e.g., biomimetic scaffold delivery system [38].

4.12 MicroRNAs

miRNAs are noncoding RNAs that act as posttranscriptional regulators of multiple proteins and associated pathways. Thus, identification of the appropriate miRNA involved in the different phases of wound healing could reveal an effective genetic therapy in chronic wound care. Several miRNAs have been shown to be upregulated or downregulated during the wound healing process, and many studies have suggested that some miRNAs may be dysregulated in different phase of diabetic wound healing contributing to diabetic foot wound [6,128].

216 Chapter 12

In addition, it has been highlighted that wound biofilm could induce some miRNAs (miR-146a and miR-106b) [120]. The observation that wound biofilm may induce host skin miRNAs is novel and particularly significant because these miRNAs target the same tight junction proteins of the ZO family, which are known to be critically required for skin barrier function [120].

4.13 Exosomes

Microparticles and nanocarriers have also been developed, allowing spatial control and enhanced biodistribution of the pharmaceutical agents to the affected areas [2,129,130].

Exosomes are nanovesicles secreted by a variety of cells and have emerged as a new intercellular communication system for transporting proteins and RNAs. Exosomes secreted by human adipose stem cells are easily obtained and can be effectively used in research and clinical treatment. Exosomes can optimize the characteristics of fibroblasts, such as promoting the migration, proliferation, and collagen synthesis of fibroblasts, thereby accelerating wound healing of soft tissue. It has been shown that exosomes secreted by adipose stem cells may represent a novel therapeutic tool in soft tissue wound healing [131]. The cell action of exosomes is going through its molecular content that can vary depending on its cell origin. Important components of the exosomal cargo secreted by fibroblasts can be heat shock protein 90a, total and activated signal transducer and activator of transcription 3, proangiogenic (miR-126, miR-130a, miR-132) and antiinflammatory (miR124a, miR- 125b) miRNAs, and miRNA regulating collagen deposition (miR-21), which have shown to have beneficial effect on wound healing [132].

Further studies are under way to perform a complete analysis of the exosome cargo and to develop a manufacturing process for the production of exosomes in the quantity and quality required for testability in clinical trials [132].

4.14 Dressings

Therapeutic strategies for chronic wound healing, such as polymeric matrices loaded with drugs, have been designed, aiming to target the whole cascade more specifically [2,129,130,133,134]. These wound dressings encompass a wide range of products containing synthetic matrix scaffolds, animal-derived matrices, and human tissue [9].

Smart dressings can also monitor physical and chemical parameters important in wound healing such as some biomarkers such as PH, infection using specific sensors, and technology to avoid removal of the dressing several times and reduce pain and discomfort [135,136]. New ideas and technologies have emerged such as the graphene electronic tattoo sensors to measure several in vivo parameters from skin temperature and hydration to electrocardiogram, electromyogram, and electroencephalogram [137]. Further development could inform on more specific wound healing parameters.

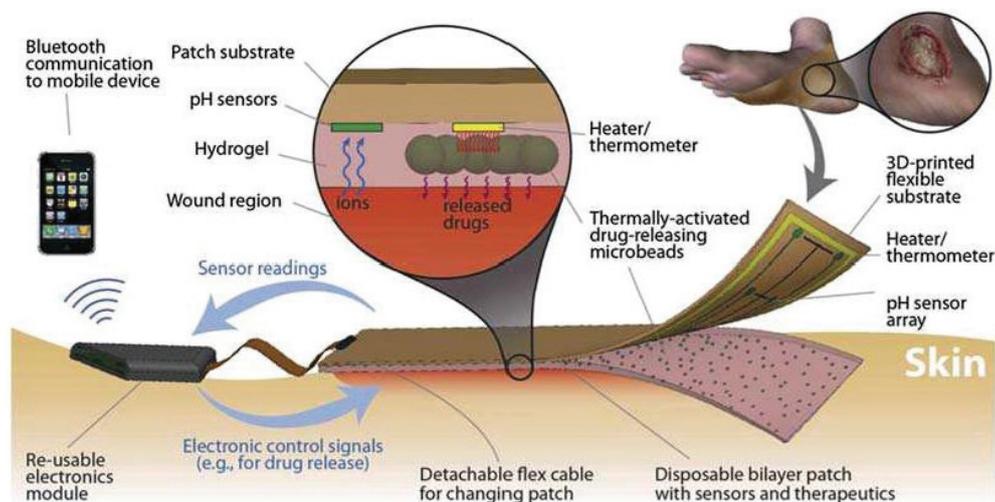


Figure 12.8

A smart bandage with wound-covering component (right), containing sensors and a drug carrier, and a microprocessor (left) that interprets sensor input and triggers drug delivery. *Credits: Tufts University.*

Effective smart bandages should be mechanically flexible, breathable, easy to apply, and capable of reporting quantitative information about the wound status in real time to guide.

3D cell imprinted substrates and nanoscale-architected surfaces have emerged with beneficial properties and features [138]. The addition of exosomes, miRNA, and the biotechnology-related advances such as powerful gene-editing techniques including CRISPR-Cas-based systems will create a milestone in the therapy of various diseases, particularly with major effects on treatment of chronic wound healing [138] (Fig. 12.8).

5. Conclusions

The challenge is now to improve the delivery of effective factors at a specific time/phase of the wound healing that could be performed in cascade with multiple time release. There is also a requirement to consider different needs related to specific chronic wounds/individuals.

Many research groups are working very hard on nanotechnologies and applications to nanomedicine, which should lead to new and innovative approaches to the treatment of chronic wounds. Prevention should not be forgotten, and indeed smart sensors could be very useful not only for monitoring the wound healing process but also to inform on cutaneous pressure wound risk.

218 Chapter 12

References

- [1] Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 18):3209–13.
- [2] Kaplani K, Koutsi S, Armenis V, Skondra FG, Karantzelis N, Champeris Tsaniras S, et al. Wound healing related agents: ongoing research and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;129:242–53.
- [3] Choi EP, Chin WY, Wan EY, Lam CL. Evaluation of the internal and external responsiveness of the Pressure Ulcer Scale for Healing (PUSH) tool for assessing acute and chronic wounds. *J Adv Nurs* 2016;72(5):1134–43.
- [4] Sgonc R, Gruber J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. *Gerontology* 2013;59(2):159–64.
- [5] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014;6(265):265sr6.
- [6] Meng Z, Zhou D, Gao Y, Zeng M, Wang W. miRNA delivery for skin wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;129:308–18.
- [7] Ud-Din S, Bayat A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: in silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair Regen* 2017;25(2):164–76.
- [8] Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* 1998;290(Suppl):S1–11.
- [9] Wells A, Nuschke A, Yates CC. Skin tissue repair: matrix microenvironmental influences. *Matrix Biol* 2016;49:25–36.
- [10] Mele E. Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings. *J Mater Chem B* 2016;4:4801–12.
- [11] Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. Disclosure of the culprits: macrophages-versatile regulators of wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2(7):357–68.
- [12] Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol* 2018;9:419.
- [13] Seaton M, Hocking A, Gibran NS. Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR J* 2015;56(1):127–38.
- [14] Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005;31(6):674–86. Discussion 86.
- [15] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453(7193):314–21.
- [16] Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 2018 Jul 5. pii: S0169-409X(18)30158-3.
- [17] Rousselle P, Montmasson M, Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biol* 2018.
- [18] Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005;366(9498):1736–43.
- [19] Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci* 2016;17(12).
- [20] Bosanquet DC, Harding KG. Wound duration and healing rates: cause or effect? *Wound Repair Regen* 2014;22(2):143–50.
- [21] Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int J Mol Sci* 2017;18(7).
- [22] Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther* 2006;13(1):211–20.
- [23] Schafer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res* 2008;58(2):165–71.
- [24] Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4(9):560–82.

Animal models in chronic wound healing research 219

- [25] Jiang LP, Tu Q, Wang Y, Zhang E. Ischemia-reperfusion injury-induced histological changes affecting early stage pressure ulcer development in a rat model. *Ostomy Wound Manage* 2011;57(2):55–60.
- [26] Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care* 2012;25(8):349–70.
- [27] Singer AJ, McClain SA. Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med* 2003;10(10):1029–33.
- [28] Mustoe TA, O’Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(7 Suppl):35S–41S.
- [29] Clark RA. Epithelial-mesenchymal networks in wounds: a hierarchical view. *J Investig Dermatol* 2003;120(6):ix–xi.
- [30] Gallant-Behm CL, Du P, Lin SM, Marucha PT, DiPietro LA, Mustoe TA. Epithelial regulation of mesenchymal tissue behavior. *J Investig Dermatol* 2011;131(4):892–9.
- [31] Pastar I, Wong LL, Egger AN, Tomic-Canic M. Descriptive vs mechanistic scientific approach to study wound healing and its inhibition: is there a value of translational research involving human subjects? *Exp Dermatol* 2018;27(5):551–62.
- [32] Lindblad WJ. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008;19(8):1087–96.
- [33] Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol* 2015;66(1):14–21.
- [34] Rittie L, Sachs DL, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ. Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelialization of human wounds. *Am J Pathol* 2013;182(1):163–71.
- [35] Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* 2001;9(2):66–76.
- [36] Murray PJ. Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol* 2017;79:541–66.
- [37] Chen L, Mirza R, Kwon Y, DiPietro LA, Koh TJ. The murine excisional wound model: contraction revisited. *Wound Repair Regen* 2015;23(6):874–7.
- [38] Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJ. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. *Stem Cell Int* 2015;2015:831095.
- [39] Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* 2014;20(8):847–56.
- [40] Langton AK, Herrick SE, Headon DJ. An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *J Investig Dermatol* 2008;128(5):1311–8.
- [41] Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(17). 3241–3255.
- [42] Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991;54(6 Suppl):1135S–40S.
- [43] O’Loughlin A, Kulkarni M, Vaughan EE, Creane M, Liew A, Dockery P, et al. Autologous circulating angiogenic cells treated with osteopontin and delivered via a collagen scaffold enhance wound healing in the alloxan-induced diabetic rabbit ear ulcer model. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(6):158.
- [44] Schivo M, Aksenov AA, Pasamontes A, Cumeras R, Weisker S, Oberbauer AM, et al. A rabbit model for assessment of volatile metabolite changes observed from skin: a pressure ulcer case study. *J Breath Res* 2017;11(1):016007.
- [45] Sigauco-Roussel D, Demiot C, Fromy B, Koitka A, Leftheriotis G, Abraham P, et al. Early endothelial dysfunction severely impairs skin blood flow response to local pressure application in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2004;53(6):1564–9.
- [46] Heydemann A. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2016;2016:2902351.

220 Chapter 12

- [47] Abadir P, Hosseini S, Faghhih M, Ansari A, Lay F, Smith B, et al. Topical reformulation of valsartan for treatment of chronic diabetic wounds. *J Investig Dermatol* 2018;138(2):434–43.
- [48] Hsieh J, Longuet C, Maida A, Bahrami J, Xu E, Baker CL, et al. Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36. *Gastroenterology* 2009;137(3):997–1005. e1–4.
- [49] Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2006;23(6):594–608.
- [50] Nunan R, Harding KG, Martin P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech* 2014;7(11):1205–13.
- [51] Strong AL, Bowles AC, MacCrimmon CP, Frazier TP, Lee SJ, Wu X, et al. Adipose stromal cells repair pressure ulcers in both young and elderly mice: potential role of adipogenesis in skin repair. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(6):632–42.
- [52] Park KH, Han SH, Hong JP, Han SK, Lee DH, Kim BS, et al. Topical epidermal growth factor spray for the treatment of chronic diabetic foot ulcers: a phase III multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;142:335–44.
- [53] Thornton MJ. Estrogens and aging skin. *Dermatoendocrinol* 2013;5(2):264–70.
- [54] Wilkinson HN, Hardman MJ. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. *Maturitas* 2017;103:60–4.
- [55] Pyter LM, Yang L, da Rocha JM, Engeland CG. The effects of social isolation on wound healing mechanisms in female mice. *Physiol Behav* 2014;127:64–70.
- [56] Keyes BE, Liu S, Asare A, Naik S, Levorse J, Polak L, et al. Impaired epidermal to dendritic T cell signaling slows wound repair in aged skin. *Cell* 2016;167(5):1323–1338 e14.
- [57] Fang RC, Mustoe TA. Animal models of wound healing: utility in transgenic mice. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008;19(8):989–1005.
- [58] Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:969618.
- [59] Laverdet B, Girard D, Bayout A, Bordeau N, Demiot C, Desmouliere A. Effects of small-fiber neuropathy induced by resiniferatoxin on skin healing and axonal regrowth after burn. *Burns* 2017;43(3):562–72.
- [60] Kim DJ, Mustoe T, Clark RA. Cutaneous wound healing in aging small mammals: a systematic review. *Wound Repair Regen* 2015;23(3):318–39.
- [61] Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, Bader DL. The etiology of pressure ulcers: skin deep or muscle bound? *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84(4):616–9.
- [62] Stekelenburg A, Oomens CW, Strijkers GJ, Nicolay K, Bader DL. Compression-induced deep tissue injury examined with magnetic resonance imaging and histology. *J Appl Physiol* (1985) 2006;100(6):1946–54.
- [63] Salcido R, Popescu A, Ahn C. Animal models in pressure ulcer research. *J Spinal Cord Med* 2007;30(2):107–16.
- [64] de Wert LA, Bader DL, Oomens CW, Schoonhoven L, Poeze M, Bouvy ND. A new method to evaluate the effects of shear on the skin. *Wound Repair Regen* 2015;23(6):885–90.
- [65] Oomens CW, Bader DL, Loerakker S, Baaijens F. Pressure induced deep tissue injury explained. *Ann Biomed Eng* 2015;43(2):297–305.
- [66] Gawlitta D, Oomens CW, Bader DL, Baaijens FP, Bouten CV. Temporal differences in the influence of ischemic factors and deformation on the metabolism of engineered skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2007;103(2):464–73.
- [67] Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen* 2000;8(1):68–76.
- [68] Reid RR, Sull AC, Mogford JE, Roy N, Mustoe TA. A novel murine model of cyclical cutaneous ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2004;116(1):172–80.

Animal models in chronic wound healing research 221

- [69] Fromy B, Lingueglia E, Sigauco-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med* 2012;18:1205–7.
- [70] Danigo A, Magy L, Richard L, Desmouliere A, Bourthoumieu S, Funalot B, et al. Neuroprotective effect of erythropoietin against pressure ulcer in a mouse model of small fiber neuropathy. *PLoS One* 2014;9(11):e113454.
- [71] Daniel RK, Priest DL, Wheatley DC. Etiologic factors in pressure sores: an experimental model. *Arch Phys Med Rehabil* 1981;62(10):492–8.
- [72] Steinberg JP, Gurjala AN, Jia S, Hong SJ, Galiano RD, Mustoe TA. Evaluating the effects of subclinical, cyclic ischemia-reperfusion injury on wound healing using a novel device in the rabbit ear. *Ann Plast Surg* 2014;72(6):698–705.
- [73] Saito Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Horikawa M, Takenaka M, et al. The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J Invest Dermatol* 2008;128(7):1838–51.
- [74] Donato-Trancoso A, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. *J Dermatol Sci* 2016;83(1):60–9.
- [75] Romana-Souza B, Santos JS, Bandeira LG, Monte-Alto-Costa A. Selective inhibition of COX-2 improves cutaneous wound healing of pressure ulcers in mice through reduction of iNOS expression. *Life Sci* 2016;153:82–92.
- [76] Gust MJ, Hong SJ, Fang RC, Lanier ST, Buck 2nd DW, Nunez JM, et al. Adipose tissue drives response to ischemia-reperfusion injury in a murine pressure sore model. *Plast Reconstr Surg* 2017;139(5):1128e–38e.
- [77] Nguyen-Tu MS, Begey AL, Decorps J, Boizot J, Sommer P, Fromy B, et al. Skin microvascular response to pressure load in obese mice. *Microvasc Res* 2013;90:138–43.
- [78] Nixon J, Cranny G, Bond S. Pathology, diagnosis, and classification of pressure ulcers: comparing clinical and imaging techniques. *Wound Repair Regen* 2005;13(4):365–72.
- [79] Bergstrand S, Kallman U, Ek AC, Lindberg LG, Engstrom M, Sjoberg F, et al. Pressure-induced vasodilation and reactive hyperemia at different depths in sacral tissue under clinically relevant conditions. *Microcirculation* 2014;21(8):761–71.
- [80] Cristobal L, Ortega MA, Asunsolo A, Romero B, Alvarez-Mon M, Bujan J, et al. Human skin model for mimic dermal studies in pathology with a clinical implication in pressure ulcers. *Histol Histopathol* 2018;11990.
- [81] Maldonado AA, Cristobal L, Martin-Lopez J, Mallen M, Garcia-Honduvilla N, Bujan J. A novel model of human skin pressure ulcers in mice. *PLoS One* 2014;9(10):e109003.
- [82] Tsutakawa S, Kobayashi D, Kusama M, Moriya T, Nakahata N. Nicotine enhances skin necrosis and expression of inflammatory mediators in a rat pressure ulcer model. *Br J Dermatol* 2009;161(5):1020–7.
- [83] Buijs S, Hermans K, Maertens L, Van Caelenberg A, Tuytens FA. Effects of semi-group housing and floor type on pododermatitis, spinal deformation and bone quality in rabbit does. *Animal* 2014;8(10):1728–34.
- [84] Rommers JM, de Jong IC. Technical note: plastic mats prevent footpad injuries in rabbit does. *World Rabbit Science* 2011;19:233–7.
- [85] Mizisin AP, Kalichman MW, Garrett RS, Dines KC. Tactile hyperesthesia, altered epidermal innervation and plantar nerve injury in the hindfeet of rats housed on wire grates. *Brain Res* 1998;788(1–2):13–9.
- [86] Yavuz M, Ersen A, Hartos J, Schwarz B, Garrett AG, Lavery LA, et al. Plantar shear stress in individuals with a history of diabetic foot ulcer: an emerging predictive marker for foot ulceration. *Diabetes Care* 2017;40(2):e14–5.
- [87] Delbridge L, Ctercteko G, Fowler C, Reeve TS, Le Quesne LP. The aetiology of diabetic neuropathic ulceration of the foot. *Br J Surg* 1985;72(1):1–6.

222 Chapter 12

- [88] Ohura T, Takahashi M, Ohura Jr N. Influence of external forces (pressure and shear force) on superficial layer and subcutis of porcine skin and effects of dressing materials: are dressing materials beneficial for reducing pressure and shear force in tissues? *Wound Repair Regen* 2008;16(1):102–7.
- [89] Linder-Ganz E, Gefen A. The effects of pressure and shear on capillary closure in the microstructure of skeletal muscles. *Ann Biomed Eng* 2007;35(12):2095–107.
- [90] Goldstein B, Sanders J. Skin response to repetitive mechanical stress: a new experimental model in pig. *Arch Phys Med Rehabil* 1998;79(3):265–72.
- [91] Goossens RH, Zegers R, Hoek van Dijke GA, Snijders CJ. Influence of shear on skin oxygen tension. *Clin Physiol* 1994;14(1):111–8.
- [92] Sari Y, Minematsu T, Huang L, Noguchi H, Mori T, Nakagami G, et al. Establishment of a novel rat model for deep tissue injury deterioration. *Int Wound J* 2015;12(2):202–9.
- [93] Gefen A. Deep tissue injury from a bioengineering point of view. *Ostomy Wound Manage* 2009;55(4):26–36.
- [94] Kosiak M. Etiology and pathology of ischemic ulcers. *Arch Phys Med Rehabil* 1959;40(2):62–9.
- [95] Ceelen KK, Stekelenburg A, Loerakker S, Strijkers GJ, Bader DL, Nicolay K, et al. Compression-induced damage and internal tissue strains are related. *J Biomech* 2008;41(16):3399–404.
- [96] Linder-Ganz E, Shabshin N, Itzhak Y, Yizhar Z, Siev-Ner I, Gefen A. Strains and stresses in subdermal tissues of the buttocks are greater in paraplegics than in healthy during sitting. *J Biomech* 2008;41(3):567–80.
- [97] Loerakker S, Bader DL, Baaijens FP, Oomens CW. Which factors influence the ability of a computational model to predict the in vivo deformation behaviour of skeletal muscle? *Comput Methods Biomech Biomed Eng* 2013;16(3):338–45.
- [98] Stekelenburg A, Strijkers GJ, Parusel H, Bader DL, Nicolay K, Oomens CW. Role of ischemia and deformation in the onset of compression-induced deep tissue injury: MRI-based studies in a rat model. *J Appl Physiol* (1985) 2007;102(5):2002–11.
- [99] Bosboom EM, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, Nicolay K. Quantifying pressure sore-related muscle damage using high-resolution MRI. *J Appl Physiol* (1985) 2003;95(6):2235–40.
- [100] Oomens CW, Bressers OF, Bosboom EM, Bouten CV, Blader DL. Can loaded interface characteristics influence strain distributions in muscle adjacent to bony prominences? *Comput Methods Biomech Biomed Eng* 2003;6(3):171–80.
- [101] Wassermann E, van Griensven M, Gestaltner K, Oehlinger W, Schrei K, Redl H. A chronic pressure ulcer model in the nude mouse. *Wound Repair Regen* 2009;17(4):480–4.
- [102] Linder-Ganz E, Gefen A. Mechanical compression-induced pressure sores in rat hindlimb: muscle stiffness, histology, and computational models. *J Appl Physiol* (1985) 2004;96(6):2034–49.
- [103] Minematsu T, Nakagami G, Sari Y, Akase T, Sugama J, Nagase T, et al. Candidate biomarkers for deep tissue damage from molecular biological and biochemical aspects. *J Tissue Viability* 2010;19(2):77–83.
- [104] Sari Y, Nagase T, Minematsu T, Akase T, Nakagami G, Sanada H, et al. Hypoxia is involved in deep tissue injury formation in a rat model. *Wounds* 2010;22(2):44–51.
- [105] Nelissen JL, Traa WA, de Boer HH, de Graaf L, Mazzoli V, Savci-Heijink CD, et al. An advanced magnetic resonance imaging perspective on the etiology of deep tissue injury. *J Appl Physiol* (1985) 2018;124(6):1580–96.
- [106] Kottner J, Black J, Call E, Gefen A, Santamaria N. Microclimate: a critical review in the context of pressure ulcer prevention. *Clin Biomech* (Bristol, Avon) 2018;59:62–70.
- [107] Kokate JY, Leland KJ, Held AM, Hansen GL, Kveen GL, Johnson BA, et al. Temperature-modulated pressure ulcers: a porcine model. *Arch Phys Med Rehabil* 1995;76(7):666–73.
- [108] Ahn ST, Mustoe TA. Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear. *Ann Plast Surg* 1990;24(1):17–23.
- [109] Chien S. Ischemic rabbit ear model created by minimally invasive surgery. *Wound Repair Regen* 2007;15(6):928–35.

Animal models in chronic wound healing research 223

- [110] Trujillo AN, Kesl SL, Sherwood J, Wu M, Gould LJ. Demonstration of the rat ischemic skin wound model. *J Vis Exp* 2015;98:e52637.
- [111] Domergue S, Jorgensen C, Noel D. Advances in research in animal models of burn-related hypertrophic scarring. *J Burn Care Res* 2015;36(5):e259–66.
- [112] Pereira CT, Herndon DN. The pharmacologic modulation of the hypermetabolic response to burns. *Adv Surg* 2005;39:245–61.
- [113] Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, Koenig LD, Phillips CD, Wolcott RA, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen* 2016;24(1):163–74.
- [114] Suleman L, Percival SL. Biofilm-infected pressure ulcers: current knowledge and emerging treatment strategies. *Adv Exp Med Biol* 2015;831:29–43.
- [115] Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I. Matrix metalloproteinases: the sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta* 2017;1864(11 Pt B):2220–7.
- [116] James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008;16(1):37–44.
- [117] Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008;46(8):2717–22.
- [118] Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J* 2015;12(1):47–52.
- [119] Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen* 2009;17(3):354–9.
- [120] Roy S, Elgharably H, Sinha M, Ganesh K, Chaney S, Mann E, et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. *J Pathol* 2014;233(4):331–43.
- [121] Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. *J Immunol* 2013;190(4):1746–57.
- [122] Gould L, Abadir P, Brem H, Carter M, Conner-Kerr T, Davidson J, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *J Am Geriatr Soc* 2015;63(3):427–38.
- [123] Watters C, DeLeon K, Trivedi U, Griswold JA, Lyte M, Hampel KJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med Microbiol Immunol* 2013;202(2):131–41.
- [124] Zarrintaj P, Moghaddam AS, Manouchehri S, Atoufi Z, Amiri A, Amirkhani MA, et al. Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine (Lond)* 2017;12(19):2403–22.
- [125] Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2014;22(5):569–78.
- [126] Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents. *Clin Plast Surg* 2017;44(3):635–50.
- [127] Kurita M, Araoka T, Hishida T, O'Keefe DD, Takahashi Y, Sakamoto A, et al. In vivo reprogramming of wound-resident cells generates skin epithelial tissue. *Nature* 2018;561(7722):243–7.
- [128] Mulholland EJ, Dunne N, McCarthy HO. MicroRNA as therapeutic targets for chronic wound healing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;8:46–55.
- [129] Ranjan S, Fontana F, Ullah H, Hirvonen J, Santos HA. Microparticles to enhance delivery of drugs and growth factors into wound sites. *Ther Deliv* 2016;7(10):711–32.
- [130] Gagliardi M. Novel biodegradable nanocarriers for enhanced drug delivery. *Ther Deliv* 2016;7(12):809–26.
- [131] Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep* 2016;6:32993.

224 Chapter 12

- [132] Geiger A, Walker A, Nissen E. Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;467(2):303–9.
- [133] Gagliardi M, Bertero A, Bardi G, Bifone A. A poly(ether-ester) copolymer for the preparation of nanocarriers with improved degradation and drug delivery kinetics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016;59:488–99.
- [134] Anish S. Skin substitutes in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2015;81(2):175–8.
- [135] Jankowska DA, Bannwarth MB, Schulenburg C, Faccio G, Maniura-Weber K, Rossi RM, et al. Simultaneous detection of pH value and glucose concentrations for wound monitoring applications. *Biosens Bioelectron* 2017;87:312–9.
- [136] Mostafalu P, Tamayol A, Rahimi R, Ochoa M, Khalilpour A, Kiaee G, et al. Smart bandage for monitoring and treatment of chronic wounds. *Small* 2018:e1703509.
- [137] Kabiri Ameri S, Ho R, Jang H, Tao L, Wang Y, Wang L, et al. Graphene electronic tattoo sensors. *ACS Nano* 2017;11(8):7634–41.
- [138] Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref AR, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: preventing infection and facilitating wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;123:33–64.
- [139] Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2014;14:5 289–301.

Annexe 2. Normalisation des résultats de western-blot

Bien que la quantité de protéine déposée par puits en western-blot soit similaire entre les échantillons (30 μ g), en raison des différentes étapes (migration, transfert, incubation des anticorps, réaction enzymatique pour la révélation) il peut y avoir des variations de la quantité finale de protéines présentes et détectées sur la membrane. Afin de faire abstraction de ces variations, les résultats de western-blot présentés en graphiques ont été normalisés avec le signal obtenu par Rouge Ponceau, qui est plus représentatif de la quantité de protéine sur la membrane pour chaque groupe. En effet on constate que l'actine (protéine fréquemment utilisée en western-blot) est proportionnellement plus présente dans le lysat protéique obtenu après lésion que dans le tissu non lésé à J0, quel que soit le groupe (Figure 55).

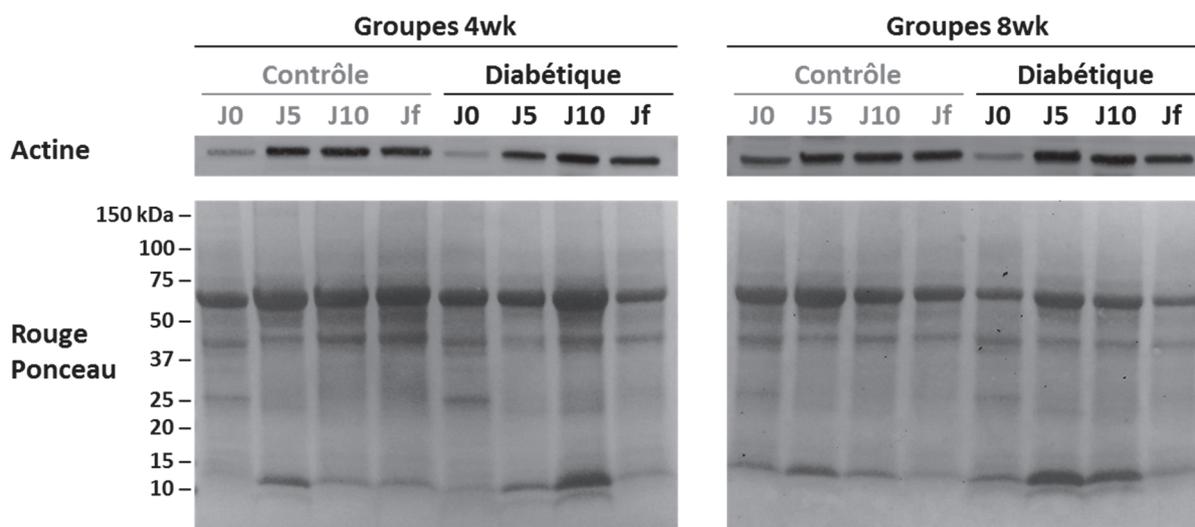


Figure 55. Photos représentatives de western-blot avec un anticorps anti-actine et du signal des protéines totales en coloration Rouge ponceau dans la peau non lésée et lésée chez les souris contrôles et diabétiques 4wk et 8wk.

Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C4wk et C8wk, J23 pour les D4wk, et J27 pour les D8wk. Anticorps anti-actine Abcam Ref ab8227 au 1/5000^e.

Annexe 3. Brevet déposé sur le modèle d'induction d'un ulcère de pression chez la souris



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Accusé de réception

Par la présente, nous accusons réception de votre demande de traitement d'une demande internationale au titre du Traité de coopération en matière de brevets, comme suit:

Numéro de soumission	1000492909	
Numéro de demande PCT	PCT/FR2019/051398	
Date de réception	11 juin 2019	
Office récepteur	Institut National de la Propriété Industrielle	
Votre référence	BCT190203 QT	
Demandeur	URGO RECHERCHE INNOVATION ET DEVELOPPEMENT	
Nombre de demandeurs	3	
Pays	FR	
Titre	MODELE POUR L'EVALUATION DE TRAITEMENTS POUR LA CICATRISATION DES ULCERES DE PRESSION	
Documents produits	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-vlog.xml eolf-abst.txt	eolf-requ.xml eolf-fees.xml eolf-othd-000001.pdf (15 p.) eolf-appb-P000001.pdf (2 p.)
Effectué par	EMAIL=wajs@plass.com,CN=Nathalie WAJS,O=CABINET PLASSERAUD,C=FR	
Méthode de soumission	En ligne	
Date et heure de réception	11 juin 2019, 14:58:46 (CEST)	
Digest	BD:E9:BB:17:22:B0:8A:C1:69:51:D0:CE:17:01:82:FD:46:10:41:3A	

/INPI, section dépôt/

BCT190203 QT

1/4

REQUÊTE PCT

(original sous forme électronique)

0	Réservé à l'office récepteur	
0-1	Demande internationale n°	
0-2	Date du dépôt international	
0-3	Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	
0-4	Formulaire PCT/RO/101 - Requête PCT	
0-4-1	Préparée avec	PCT Online Filing Version 3.51.000.263e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-5	Pétition	
	Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets	
0-6	Office récepteur (choisi par le déposant)	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)
0-7	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	BCT190203 QT
I	Titre de l'invention	MODELE POUR L'EVALUATION DE TRAITEMENTS POUR LA CICATRISATION DES ULCERES DE PRESSION
II	Déposant	
II-1	Cette personne est :	Déposant seulement
II-2	Déposant pour :	Tous les Etats désignés
II-4	Nom :	URGO RECHERCHE INNOVATION ET DEVELOPPEMENT
II-5	Adresse :	42 rue de Longvic 21300 CHENOVE France
II-6	Nationalité (nom de l'État) :	FR
II-7	Domicile (nom de l'État) :	FR
III-1	Déposant et/ou inventeur	
III-1-1	Cette personne est :	Déposant seulement
III-1-2	Déposant pour :	Tous les Etats désignés
III-1-4	Nom :	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS -
III-1-5	Adresse :	3, rue Michel Ange 75016 PARIS France
III-1-6	Nationalité (nom de l'État) :	FR
III-1-7	Domicile (nom de l'État) :	FR

BCT190203 QT

2/4

REQUÊTE PCT

(original sous forme électronique)

III-2	Déposant et/ou inventeur	
III-2-1	Cette personne est :	Déposant seulement
III-2-2	Déposant pour :	Tous les Etats désignés
III-2-4	Nom :	UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
III-2-5	Adresse :	43 Boulevard du 11 novembre 1918 69100 VILLEURBANNE France
III-2-6	Nationalité (nom de l'État) :	FR
III-2-7	Domicile (nom de l'État) :	FR
III-3	Déposant et/ou inventeur	
III-3-1	Cette personne est :	Inventeur seulement
III-3-3	Inventeur pour :	Tous les Etats désignés
III-3-4	Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) :	REMOUE, Noëlle
III-3-5	Adresse :	9 rue Galland 69007 LYON France
III-4	Déposant et/ou inventeur	
III-4-1	Cette personne est :	Inventeur seulement
III-4-3	Inventeur pour :	Tous les Etats désignés
III-4-4	Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) :	SIGAUDO-ROUSSEL, Dominique Béatrice Jeanne
III-4-5	Adresse :	35 avenue Lacassagne 69003 LYON France
IV-1	Mandataire ou représentant commun; ou adresse pour la correspondance La personne nommée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme	Mandataire
IV-1-1	Nom :	CABINET PLASSERAUD
IV-1-2	Adresse :	66 rue de la Chaussée d'Antin 75440 PARIS CEDEX 09 France
IV-1-3	n° de téléphone :	00 33 1 40 16 70 00
IV-1-4	n° de télécopieur :	00 33 1 42 80 01 59
IV-1-5	Courrier électronique :	info@plass.com
IV-1-5(a))	Autorisation de recourir au courrier électronique L'office récepteur, l'administration chargée de la recherche internationale, le Bureau international et l'administration chargée de l'examen préliminaire international sont autorisés à utiliser cette adresse électronique, si l'office ou l'administration le souhaite, pour envoyer les notifications établies en relation avec la présente demande internationale :	exclusivement sous forme électronique (aucune notification sur papier ne sera envoyée)

BCT190203 QT

3/4

REQUÊTE PCT

(original sous forme électronique)

V	DÉSIGNATIONS	
V-1	Le dépôt de la présente requête vaut, selon la règle 4.9.a), désignation de tous les États contractants liés par le PCT à la date du dépôt international, aux fins de la délivrance de tout titre de protection disponible et, le cas échéant, aux fins de la délivrance à la fois de brevets régionaux et nationaux.	
VI-1	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-1-1	Date de dépôt	12 juin 2018 (12.06.2018)
VI-1-2	Numéro	1855141
VI-1-3	Pays ou membre de l'OMC	FR
VI-2	Demande de document de priorité L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures mentionnées ci-dessus sous la/les rubriques :	VI-1
VI-3	Incorporation par renvoi : lorsqu'un élément de la demande internationale visé à l'article 11.1)iii) d) ou e) ou une partie de la description, des revendications ou des dessins visée à la règle 20.5.a) n'est pas contenu ailleurs dans cette demande internationale mais est intégralement contenu dans une demande antérieure dont la priorité est revendiquée à la date à laquelle un ou plusieurs des éléments visés à l'article 11.1)iii) ont été initialement reçus par l'office récepteur, cet élément ou cette partie est, sous réserve de la confirmation selon la règle 20.6, incorporé par renvoi dans cette demande internationale aux fins de la règle 20.6.	
VII-1	Administration chargée de la recherche internationale choisie	Office européen des brevets (OEB) (ISA/EP)
VII-2	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; référence à cette recherche	
VII-2-1	Date de dépôt	12 juin 2018 (12.06.2018)
VII-2-2	Numéro de dépôt	1855141
VII-2-3	Pays (ou office régional)	FR
VII-2-5	Les documents sont à la disposition de l'administration chargée de la recherche internationale sous une forme et d'une manière qu'elle accepte et, en conséquence, le déposant n'a pas à les fournir à l'office récepteur ou à l'administration chargée de la recherche internationale (règles 12bis.1.c) et d) et 12bis.2.b)) :	Une copie des résultats de la recherche antérieure Une copie de la demande antérieure Une copie de tout document cité dans les résultats de la recherche antérieure
VIII	Déclarations	Nombre de déclarations
VIII-1	Déclaration relative à l'identité de l'inventeur	—
VIII-2	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet	—
VIII-3	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité de la demande antérieure	—
VIII-4	Déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique)	—
VIII-5	Déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté	—

BCT190203 QT

4/4

REQUÊTE PCT

(original sous forme électronique)

IX	Bordereau	Nombre de feuilles	Fichier(s) électronique(s) joint(s)
IX-1	Requête (y compris les feuilles pour déclaration)	4	✓
IX-2	Description	12	✓
IX-3	Revendications	2	✓
IX-4	Abrégé	1	✓
IX-5	Dessins	2	✓
IX-7	TOTAL	21	
Eléments joints		Document(s) papier joint(s)	Fichier(s) électronique(s) joint(s)
IX-8	Feuille de calcul des taxes	-	✓
IX-20	Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé		
IX-21	Langue de dépôt de la demande internationale	français	
X-1	Signature du déposant, du mandataire ou du représentant commun	(PKCS7 Signature Digital)	
X-1-1	Nom :	CABINET PLASSERAUD	
X-1-2	Nom du signataire	FR, CABINET PLASSERAUD, Nathalie WAJS	
X-1-3	Qualité (si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête)	(Mandataire)	

RÉSERVÉ À L'OFFICE RÉCEPTEUR

10-1	Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale	
10-2	Dessins :	
10-2-1	Reçus	
10-2-2	Non reçus	
10-3	Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
10-4	Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT	
10-5	Administration chargée de la recherche internationale	ISA/EP
10-6	Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche	

RÉSERVÉ AU BUREAU INTERNATIONAL

11-1	Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international	
------	--	--

BCT190203 QT

1/2

PCT (ANNEXE - FEUILLE DE CALCUL DES TAXES)

(original sous forme électronique)

(Cette feuille ne fait pas partie de la demande internationale ni ne compte comme une feuille de celle-ci)

0	Réservé à l'office récepteur			
0-1	Demande internationale n°			
0-2	Timbre à date de l'office récepteur			
0-4	Formulaire PCT/RO/101 (Annexe) Feuille de calcul des taxes PCT			
0-4-1	Préparée avec	PCT Online Filing Version 3.51.000.263e MT/FOP 20141031/0.20.5.20		
0-9	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	BCT190203 QT		
2	Déposant	URGO RECHERCHE INNOVATION ET DEVELOPPEMENT		
12	Calcul des taxes prescrites	Montant de la taxe/ multiplicateur	Montant total (EUR)	
12-1	Taxe de transmission T	€	62	
12-2-1	Taxe de recherche S	€	1775	
12-2-2	Recherche internationale à effectuer par	EP		
12-3	Taxe internationale de dépôt (30 premières feuilles) i1	1169		
12-4	Feuilles suivantes	0		
12-5	Montant additionnel (X)	0		
12-6	Montant total additionnel i2	0		
12-7	i1 + i2 =	1169		
12-12	Réduction dépôt électronique (images) R	-176		
12-13	Montant total de la taxe internationale de dépôt (i+R) I	€	993	
12-14	Taxe afférente au document de priorité Nombre de documents de priorité demandés :	1		
12-15	Taxe par document (X)	15		
12-16	Montant total de la taxe afférente au document de priorité P	€	15	
12-17	Taxe afférente à la restauration du droit de priorité RP Nombre de requêtes en restauration du droit de priorité	0		
	Montant total de la taxe afférente à la restauration du droit de priorité			
12-19	TOTAL DES TAXES DUES (T+S+I+P+RP)	€	2845	
12-21	Mode de paiement	Autorisation de débiter un compte de dépôt ou un compte courant		

BCT190203 QT

2/2

PCT (ANNEXE - FEUILLE DE CALCUL DES TAXES)

(original sous forme électronique)

(Cette feuille ne fait pas partie de la demande internationale ni ne compte comme une feuille de celle-ci)

12-22	Instructions concernant le compte de dépôt ou le compte courant L'office récepteur :	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)
12-22-1	Autorisation de débiter le total des taxes indiqué ci-dessus	✓
12-22-2	Autorisation de débiter tout montant manquant - ou de créditer tout excédent - dans le paiement du total des taxes indiqué ci-dessus	✓
12-22-3	Autorisation de débiter le montant de la taxe afférente à l'établissement du document de priorité	✓
12-23	Numéro du compte de dépôt ou du compte courant	3200
12-24	Date	11 juin 2019 (11.06.2019)
12-25	Nom et signature	NATHALIE WAJS, /Nathalie WAJS/

MODELE POUR L'EVALUATION DE TRAITEMENTS POUR LA CICATRISATION DES ULCERES DE PRESSION

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte à une méthode d'évaluation d'un traitement(s) pour la cicatrisation des ulcères de pression. De préférence, cette évaluation permet un suivi de la cicatrisation des ulcères de pression chez les sujets présentant un diabète, en particulier chez les sujets présentant un diabète neuropathique ou neuro-ischémique.

Cette évaluation permet de suivre des paramètres de cicatrisation tels que l'inflammation, la granulation, l'épithélialisation. La présente invention se rapporte également à un modèle animal d'évaluation d'ulcère de pression.

ARRIERE PLAN

L'ulcère de pression ou escarre est considéré comme un problème clinique majeur. Son développement est plus fréquent chez les patients diabétiques, les sujets avec perte de mobilité, dont les patients âgés hospitalisés et alités, ainsi que les patients avec l'altération de la moelle épinière (Allman 1989; Amlung, Miller et al. 2001). L'incidence de développement d'escarres est estimée à 15% des patients diabétiques (Reiber, Vileikyte et al. 1999) et 84% d'entre eux subiront une amputation des extrémités inférieures (Reiber, McDonell et al. 1995).

L'ulcère de pression se définit par un ensemble de lésions de la peau et/ou des tissus mous sous-jacents habituellement localisés sur une proéminence osseuse. Les zones de proéminences osseuses estimées comme zones à risque sont le sacrum, le talon, la tubérosité ischiatique et le coude (Amlung, Miller et al. 2001; Bansal, Scott et al. 2005).

En clinique, la sévérité des escarres est définie du stade I au stade IV. Le stade I définit une peau intacte qui apparaît rouge dont un érythème qui ne disparaît pas à la levée de la pression. Le stade II est caractérisé par des lésions impliquant l'épiderme et en partie le derme et se présente comme une ulcération superficielle. Le stade III est une lésion du tissu sous-cutané avec décollement. Le stade IV inclut les lésions s'étendant de la peau et des muscles sur les proéminences osseuses.

Il a été établi que la réponse hyperémique aux fortes pressions indiquait que la peau ne pouvait résister à l'application répétitive de fortes pressions, pendant la marche notamment

(Newrick, Cochrane et al. 1988). Même si l'application de la pression prolongée est considérée comme le facteur principal des ulcères de pression, la pathologie de l'ulcération n'est pas entièrement explorée (Bouten, Oomens et al. 2003).

Il existe plusieurs hypothèses pour désigner les facteurs de risque d'apparition de lésions liées à la pression (Mak, Zhang et al. 2010; Boulton 2013). Cependant, l'apparition des blessures pourrait être liée à la concordance de plusieurs événements néfastes au cours du diabète. Ainsi, on peut définir la tolérance du tissu à résister à la pression comme la capacité du tissu à répondre à la pression sans développer d'ulcère de pression (Bergstrom, Horn et al. 2005).

Les neuropathies périphériques sensorielles (Reiber, Vileikyte et al. 1999; Boulton 2004) et les neuropathies du système nerveux moteur (Bus, Yang et al. 2002) peuvent inhiber la perception de la douleur et la sensation de toucher. Les changements précoces de la microcirculation cutanée et du métabolisme musculaire (Greenman, Panasyuk et al. 2005) peuvent induire une ischémie locale et l'hypoxie tissulaire résultant de l'occlusion du flux sanguin, ainsi que des changements structurels au niveau du tissu cutané, par exemple une diminution de la flexibilité du réseau de collagène initiée par la glycation des protéines observée au cours de l'hyperglycémie (Paul and Bailey 1996). L'accumulation de substances toxiques au niveau tissulaire est liée à un défaut du transport lymphatique au cours de la réduction de la perfusion, révélant l'importance de l'environnement pour la survie tissulaire. La nécrose tissulaire qui en résulte provoque l'ulcération (Bouten, Oomens et al. 2003).

Les changements structurels sont un facteur important pour le développement d'ulcères de pression. Il a été montré qu'au cours du vieillissement la diminution de l'élasticité et du tissu adipeux de la peau sèche, associée à la diminution de l'épaisseur de l'épiderme et derme contribuaient à l'apparition de lésions (Witkowski and Parish 2000; Garcia and Thomas 2006).

Les facteurs extrinsèques sont les infections, un traumatisme mineur, une déformation de la peau induisant une formation calleuse (Robertson, Mueller et al. 2002), un stress mécanique répétitif (la marche) ou continu (la position allongée sur le lit) (Ulbrecht, Cavanagh et al. 2004), une hygiène faible du pied causant des ulcères à répétition (Connor and Mahdi 2004).

Le développement d'ulcères de pression dépend de la force externe exercée sur la peau et de sa région anatomique. En effet, de nombreux paramètres peuvent varier tels que la géométrie du tissu, les propriétés biomécaniques, la gravité ou l'orientation du corps. On peut distinguer

différentes interfaces au niveau desquelles les ulcères peuvent se former. La zone du fessier est composée de l'os pelvique, des muscles glutéaux et de la couche de tissu adipeux sous-cutané. L'épaisseur des tissus joue un rôle important dans le transfert des charges en position assise. Seules trente minutes suffisent à une compression de 35kPa au niveau du muscle chez le rat pour induire des plaies nécrotiques (Gefen, Gefen et al. 2005). Le support sur lequel le patient est assis a aussi son importance et peut influencer la répartition des forces exercées sur cette zone (Pipkin and Sprigle 2008). La position allongée sur un lit d'hôpital induit des pressions de la peau sur le lit de l'ordre de 55-95 mmHg. Cependant, de faibles pressions sont suffisantes pour générer une occlusion, une hypoxie et une ischémie (Smith 1995). Les propriétés du tissu plantaire dépendent de la posture, de la contraction musculaire et de la zone du pied. Chez des sujets diabétiques, la zone plantaire a été observée plus rigide et plus fine que la normale, surtout au niveau de la tête du premier métatarse (Zheng, Choi et al. 2000; Gefen, Megido-Ravid et al. 2001).

Plusieurs études ont été mises en œuvre afin de proposer des modèles non-humains d'ulcère de pression.

Parmi ces études on peut citer, à titre d'exemple, des modèles non-humains d'ulcère de pression invasifs tels que ceux décrits dans Peirce, S. M., T. C. Skalak, et al. (2000). "*Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat.*" *Wound Repair Regen* 8(1): 68-76. Dans ce modèle, une plaque d'acier est insérée sous la peau, puis des cycles de compression à l'aide d'un aimant (4 cm de longueur, 2,25 cm de largeur, 1 cm d'épaisseur présentant une pression de 50 mm Hg) permettent d'obtenir une plaie. L'inconvénient de ce type de modèle est qu'il est invasif : il nécessite une incision pour mettre en place la plaque d'acier sous la peau. Il provoque ainsi une inflammation et un processus de cicatrisation au niveau de la zone incisée pouvant interférer avec les phénomènes de cicatrisation de la zone étudiée. Aussi, il isole la peau des tissus sous-jacents. La zone de la plaie à étudier ne bénéficie pas de la chaleur sous-jacente ni de la circulation sanguine.

Un autre modèle non-humain d'ulcère de pression invasif est également décrit dans Reid, R. R., A. C. Sull, et al. (2004), "*A novel murine model of cyclical cutaneous ischemia-reperfusion injury.*" *J Surg Res* 116(1): 172-180. Dans ce modèle, un anneau magnétique est implanté sous la peau et des cycles de compression à l'aide d'un aimant sur la peau permettent d'obtenir un ulcère de pression. Ce modèle permet d'étudier l'ulcération liée à l'absence de flux sanguin sans compression du tissu au niveau du centre des aimants.

- On peut également citer des modèles non-humains d'ulcère de pression non-invasifs, tels que celui décrit dans Saito, Y., M. Hasegawa, et al. (2008). "The Loss of MCP-1 Attenuates Cutaneous Ischemia–Reperfusion Injury in a Mouse Model of Pressure Ulcer." *Journal of Investigative Dermatology* 128(7): 1838-1851. Dans ce modèle, des cycles de compression à l'aide d'aimants présentant un diamètre de 12 mm, une épaisseur de 5 mm et une pression de 50 mmHg ont été réalisés sur des souris qui ne présentaient pas de diabète. Or, la Demanderesse s'est rendue que le fait d'effectuer des cycles de compression avec une telle pression chez une souris diabétique, ne permettait pas l'obtention d'ulcères de pression.
- 5
- 10 Demiot, C., V. Sarrazy, et al. (2011), dans "Erythropoietin Restores C-Fiber Function and Prevents Pressure Ulcer Formation in Diabetic Mice." *Journal of Investigative Dermatology* 131(11): 2316-2322, décrit un modèle d'ulcère de pression chez une souris diabétique neuropathique dans lequel des cycles de compression sont administrés à l'aide d'aimants présentant un diamètre de 10 mm, une épaisseur d'1 mm et une pression de 2000mmHg. Cette
- 15 force de pression est très importante et peut induire une plaie allant au-delà d'une plaie obtenue de manière physiologique lors de la formation d'un ulcère de pression. A titre d'exemple, la position allongée, pour l'Homme, sur un lit d'hôpital induit des pressions de la peau sur le lit de l'ordre de 55-95 mmHg, elle est de l'ordre de 150 à 500 mmHg sur les ischio en position assise, ce qui est bien en deçà des valeurs de pression appliquées dans ce modèle.
- 20 Ainsi, il n'est pas à exclure que dans ce type de modèle, la peau du sujet ne soit altérée au-delà de l'ulcère de pression et que d'autres facteurs physiologiques que ceux inhérents à l'ulcère de pression n'entrent en jeu.
- Des pressions similaires sont appliquées à des souris par Danigo, A., L. Magy, et al. (2014). "Neuroprotective Effect of Erythropoietin against Pressure Ulcer in a Mouse Model of Small
- 25 *Fiber Neuropathy*." *PLoS ONE* 9(11): e113454. Dans cette publication, les souris présentent une neuropathie périphérique légère, mais sans diabète.
- A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle non-humain d'ulcère de pression induit expérimentalement qui soit reproductible, non invasif et qui permette d'évaluer un traitement sur l'ulcère de pression, pour les sujets diabétiques, en particulier, ceux présentant une
- 30 neuropathie périphérique.

Ainsi, la présente invention permet d'obtenir des ulcères de pression chez le sujet sain, comme chez le sujet diabétique, en particulier le sujet diabétique présentant une neuropathie périphérique, de manière induite (c'est-à-dire qui se développe après plusieurs jours contrairement à une excision ou une compression forte et prolongée générant l'apparition

5 immédiate d'une plaie), non-invasive (afin de ne pas créer de phénomène d'inflammation qui pourrait interférer avec le processus de cicatrisation de l'ulcère) reproductible, dans un délai court, sur un animal de petite taille (comme la souris) et donc à un moindre coût. Selon un mode préféré de réalisation, la présente invention permet d'obtenir des ulcères de pression chez le sujet sain et chez le sujet diabétique de type I. Ce modèle permet d'obtenir des ulcères

10 de pression de grade 3 (toutes les couches de la peau sont atteintes : hypoderme, derme et épiderme).

Le diabète de type I se caractérise également par une perte de poids importante, ce qui diminue l'épaisseur de la peau et notamment de l'hypoderme. Au contraire, un sujet atteint de diabète de type II est obèse, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'épaisseur de la peau et

15 de l'hypoderme du sujet. Il en résulte qu'il est plus facile d'induire des ulcères, en particulier des ulcères de grade 3 chez un sujet diabétique de type II par rapport à un sujet diabétique de type I.

Ce modèle permet également d'obtenir des ulcères de pression sur le sujet non-diabétique, ce qui permet de comparer les paramètres physiologiques du sujet sain versus sujet diabétique.

20 Ce modèle permet un suivi du processus de cicatrisation et peut être utilisé pour tester des méthodes de traitement, des pansements ou des substances actives afin d'évaluer leur efficacité.

La présente invention porte donc sur un modèle d'ulcère de pression sur un mammifère sur lequel les étapes suivantes sont mises en œuvre :

- 25 a) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau dudit mammifère à l'aide de deux aimants de part et d'autre d'un pli de peau dudit mammifère
- b) le retrait des aimants
- c) la pose d'un pansement à l'endroit des aimants suivi d'une friction à l'endroit
- 30 des aimants

- d) l'application d'une seconde compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide de deux aimants de part et d'autre d'un pli de peau dudit mammifère
- e) le retrait des aimants suivi d'une friction à l'endroit des aimants
- 5 f) la répétition des étapes d) et e) au moins une fois, de préférence au moins deux fois
- g) le retrait du pansement.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel modèle d'ulcère de pression pour l'évaluation de l'efficacité d'une substance active et/ou d'un dispositif pour la cicatrisation de
10 plaies sur lesquelles une substance active a été administrée et/ou un dispositif a été apposé.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention a également pour objet un procédé d'évaluation d'un traitement de cicatrisation d'une plaie chez un sujet sain ou diabétique, induite au moyen d'un modèle tel que décrit précédemment, comprenant :

- a) l'application d'au moins une substance active et/ou dispositif sur ladite plaie; et
- 15 b) la caractérisation de l'effet du traitement sur la cicatrisation de ladite plaie.

Enfin, selon un autre mode de réalisation, la présente invention a également pour objet un procédé d'évaluation d'un traitement de cicatrisation d'une plaie chez un sujet sain ou diabétique, induite au moyen d'un modèle tel que défini précédemment sur laquelle une substance active a été administrée et/ou un dispositif a été apposé, comprenant :

- 20 a) la caractérisation de l'effet du traitement sur la cicatrisation de ladite plaie.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a aussi pour objet un procédé d'évaluation d'un traitement de cicatrisation d'ulcères de pression chez un sujet diabétique comprenant :

- a) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau
25 d'un mammifère à l'aide de deux aimants de part et d'autre d'un pli de peau d'un mammifère
- b) le retrait des aimants
- c) la pose d'un pansement à l'endroit des aimants suivi d'une friction à l'endroit des aimants

- d) l'application d'une seconde compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide de deux aimants de part et d'autre d'un pli de peau dudit mammifère
- e) le retrait des aimants suivi d'une friction à l'endroit des aimants
- f) la répétition des étapes d) et e) au moins une fois, de préférence au moins deux fois
- 5 g) le retrait du pansement
- h) l'application d'au moins une substance active et/ou dispositif sur la plaie induite par la mise en œuvre des étapes a) à f) ; et
- i) la caractérisation de l'effet du traitement sur la cicatrisation de ladite plaie.

Le mammifère utilisé dans le cadre de la présente invention est de préférence un animal, en particulier un rongeur, tel qu'une souris ou un rat, de préférence une souris, et encore plus
10 préférentiellement une souris de laboratoire.

Les rongeurs sont classiquement préférés en laboratoire pour leur prix plus abordables et leur nombre plus importants. Le cochon peut aussi être utilisé, cependant la peau du cochon est bien plus épaisse que celle de la souris (1500µm versus 200µm) [Wei et al, 2017], il est donc
15 généralement difficile de transposer un protocole effectué sur une souris sur un cochon et inversement.

Les aimants utilisés dans le cadre de la présente invention présentent de préférence une pression de 50 à 700mmHg, de préférence 200 à 600, préférentiellement entre 400 et 550 mmHg. La taille des aimants est choisie de sorte à laisser un espace d'au moins 5 mm de peau
20 non compressée entre les aimants. Par exemple, dans le cadre de la présente invention, lorsque le mammifère est une souris, l'aimant présente un diamètre de 6 à 8 mm.

La friction mise en œuvre à l'étape c) est, de préférence une friction appuyée, pouvant être réalisée à l'aide de tout ustensile permettant d'exercer une friction, de préférence, à l'aide du doigt ou d'un bâtonnet ouaté. Cette friction, de manière optimale, consiste en au moins une
25 friction appuyée, de préférence au moins 1 aller et 1 retour de haut en bas puis 1 aller et 1 retour de gauche à droite des zones où les aimants sont appliqués. Cette friction se fait sur le pansement mis en place à l'étape c).

La friction mise en œuvre à l'étape c) peut aussi être caractérisée par une valeur de pression appliquée sur les zones où les aimants sont appliqués comprise entre 49 et 147 millimètre de
30 mercure (mm Hg), de préférence comprise entre 73 et 123 mm Hg.

Le pansement est, de préférence, composé d'un film mince adhésif. A titre d'exemple, on peut citer un film de polyuréthane adhésif tel que le produit Optiskin Film® commercialisé par les Laboratoires URGO.

Les inventeurs ont découvert de façon surprenante que l'application d'un pansement selon
5 l'invention permet avantageusement d'obtenir un modèle d'ulcère de pression viable et reproductible que le sujet soit diabétique, en particulier présentant un diabète de type I, ou sain. En effet, il est apparu que l'application d'un pansement favorisait la macération de la plaie et permettait une reproduction plus fiable d'un ulcère de pression. De manière
10 préférentielle, si nécessaire, la peau du mammifère sera rasée ou dépilée avant l'étape a), de préférence dépilée.

En particulier, la durée d'application des aimants à l'étape a) et d) est d'au moins 2 heures, de préférence au moins 3 heures. Dans un mode préférentiel de l'invention cette durée d'application ne dépassera pas 8 heures, de préférence 6 heures.

De préférence, l'étape g) de retrait du pansement est réalisée au moins 8 heures après la fin de
15 l'étape e) de retrait des aimants suivi d'une friction appuyée.

L'étape f) de répétition des étapes d) et e) est espacée d'au moins 15 heures, de préférence d'au moins 18 heures, c'est-à-dire qu'entre chaque répétition de l'étape e), on laisse la peau dudit mammifère au repos pendant au moins 15 heures, de préférence au moins 18 heures.

Ces différentes étapes mises en œuvre pour réaliser le modèle selon l'invention permettent
20 d'aboutir au développement progressif d'un ulcère cutané de grade III, et ce quel que soit le statut sain ou diabétique (neuropathique ou neuro ischémique) de l'animal étudié.

La présente invention a également pour objet un procédé d'évaluation d'un traitement de cicatrisation d'ulcères de pression chez un sujet diabétique, induits au moyen d'un modèle tel que décrit précédemment, comprenant :

- 25 a) l'application d'au moins une substance active et/ou dispositif sur une plaie présente sur ledit modèle; et
b) la caractérisation de l'effet du traitement sur la cicatrisation de ladite plaie.

Dans le cadre de ce procédé, la plaie a été induite sur le modèle d'ulcère de pression précédemment décrit. En particulier, la plaie a été induite sur les zones où les aimants ont été
30 apposés

La figure 1 est une photographie d'ulcère de pression obtenu selon l'invention chez la souris contrôle et chez la souris diabétique, ainsi qu'une analyse histologique de la peau montrant une atteinte de toutes les couches de la peau.

- 5 La figure 2 est une analyse histologique de l'hypoderme, derme et épiderme de la souris contrôle et la souris diabétique lorsque la souris n'est soumise ni à une friction appuyée (, ni à la pose d'un pansement après la compression magnétique (mises en œuvre au cours de l'étape c) selon l'invention), ni au retrait dudit pansement (étape g) selon l'invention), illustrée à l'exemple 2 comparatif.
- 10 La figure 3 est une photographie des lésions induites après la compression de la peau entre aimants avec pose d'un pansement, et avec friction sur la zone de droite (cercle en trait continu) mais pas la zone de gauche (cercle en trait discontinu), illustrée à l'exemple 3 comparatif. La lésion de type ulcère n'apparaît que lorsqu'il y a compression + pansement + friction.

15 **Exemples :**

Des souris C57Bl6 (Janvier, Saint Genest Saint Isle, France) pesant environ 23g sont divisées en deux groupes : un groupe contrôle et un groupe diabétique. Un diabète est induit chez la souris en faisant une seule injection de streptozotocine à 180 mg/kg par voie intra-péritonéale. Le streptozotocine est préalablement dilué dans du tampon citrate. L'injection est faite sous anesthésie isoflurane. La glycémie des souris est alors mesurée tous les jours pendant 4 jours afin de vérifier si le diabète a bien été induit.

20 **Exemple 1 de modèle selon l'invention :**

66 souris diabétiques et 58 souris contrôles ont été dépilées avec une crème dépilatoire Veet® (Reckitt Benckisser), puis soumises à des cycles de pression selon l'invention :

- 25 a) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide de deux aimants présentant un diamètre de 8 mm et une pression de 418 mmHg de part et d'autre d'un pli de peau pendant 3 heures
- b) le retrait des aimants

- c) la pose d'un pansement Optiskin Film® des Laboratoires URGO à l'endroit des aimants suivie d'une friction appuyée à l'aide un bâtonnet ouaté (5 allers et 5 retours de haut en bas puis 5 allers et 5 retours de gauche à droite) à l'endroit des aimants
- 5 d) l'application d'une seconde compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide des deux mêmes aimants de part et d'autre du pli de peau 21 heures après le retrait des aimants de l'étape b) pendant 3 heures
- e) le retrait des aimants suivi d'une friction appuyée à l'aide un bâtonnet ouaté (5 allers et 5 retours de haut en bas puis 5 allers et 5 retours de gauche à droite) à l'endroit des aimants
- 10 f) l'application d'une troisième compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide des deux mêmes aimants de part et d'autre du pli de peau 21 heures après le retrait des aimants de l'étape b) pendant 3 heures
- g) le retrait des aimants suivi d'une friction appuyée à l'aide un bâtonnet ouaté (5 allers et 5 retours de haut en bas puis 5 allers et 5 retours de gauche à droite) à l'endroit des aimants
- 15 h) le retrait du pansement

L'étape c) de friction a été réalisée par différentes personnes afin de vérifier si le geste n'était pas personne-dépendant.

- 20 24 heures après le retrait du pansement, la lésion est maximale. On observe alors un ulcère de pression de stade III chez la souris contrôle et chez la souris diabétique illustrée à la figure 1.

Exemple 2 de modèle comparatif :

13 souris diabétiques et 13 souris contrôles ont été dépilées avec une crème dépilatoire Veet® (Reckitt Benckisser), puis soumises à des cycles de pression:

- 25 a) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide de deux aimants présentant un diamètre de 8 mm et une pression de 418 mmHg de part et d'autre d'un pli de peau pendant 3 heures
- b) le retrait des aimants
- c) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide des deux mêmes aimants de part et d'autre du pli de peau 21 heures après le retrait des aimants de l'étape b) pendant 3 heures
- 30 d) le retrait des aimants

- e) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide des deux mêmes aimants de part et d'autre du pli de peau 21 heures après le retrait des aimants de l'étape b) pendant 3 heures
 - f) le retrait des aimants
- 5 Comme illustrée à la figure 2, sans frottements ni pansements, seules les souris contrôles développaient des ulcères visibles à l'œil nu avec (d'après l'analyse histologique) atteinte des 3 couches de la peau (hypoderme, derme et épiderme). Les souris diabétiques neuropathiques n'avaient pas d'atteinte visible à l'œil nu et l'histologie a montré une atteinte uniquement sur l'hypoderme et le derme profond (pas l'épiderme).
- 10 **Exemple 3 de modèle comparatif :**
- 5 souris diabétiques et 10 souris contrôles ont été dépilées avec une crème dépilatoire Veet® (Reckitt Benckisser), puis soumises à des cycles de pression:
- a) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide de deux aimants présentant un diamètre de 8 mm et une pression de 418 mmHg de part et d'autre d'un pli de peau pendant 3 heures
 - 15 b) le retrait des aimants
 - c) la pose d'un pansement Optiskin Film® des Laboratoires URGO à l'endroit des aimants
 - d) l'application à l'endroit de l'aimant de droite, d'une friction appuyée à l'aide un bâtonnet ouaté (5 allers et 5 retours de haut en bas puis 5 allers et 5 retours de gauche à droite) ; et aucune friction à l'endroit de l'aimant de gauche
 - 20 e) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide des deux mêmes aimants de part et d'autre du pli de peau 21 heures après le retrait des aimants de l'étape b) pendant 3 heures
 - 25 f) le retrait des aimants
 - g) l'application à l'endroit de l'aimant de droite, d'une friction appuyée à l'aide d'un bâtonnet ouaté (5 allers et 5 retours de haut en bas puis 5 allers et 5 retours de gauche à droite) ; et aucune friction à l'endroit de l'aimant de gauche
 - h) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide des deux mêmes aimants de part et d'autre du pli de peau 21 heures après le
 - 30 retrait des aimants de l'étape f) pendant 3 heures
 - i) le retrait des aimants

- j) l'application à l'endroit de l'aimant de droite, d'une friction appuyée à l'aide un bâtonnet ouaté (5 allers et 5 retours de haut en bas puis 5 allers et 5 retours de gauche à droite) ; et aucune friction à l'endroit de l'aimant de gauche
 - k) le retrait du pansement
- 5 Comme illustrée à la figure 3, sans frottements mais avec application d'un pansement (zone de gauche sur l'animal), ni les souris contrôles, ni les souris diabétiques neuropathiques n'ont développé d'ulcère de grade III. Un érythème léger sur certains animaux a pu être observé. L'histologie a montré une atteinte sur l'hypoderme et le derme profond chez la souris contrôle et la souris diabétique neuropathique.
- 10 Le pansement permet donc une aggravation de la plaie mais dans un degré moindre que le frottement seul, et de manière non reproductible entre animaux.

Revendications

1. Modèle d'ulcère de pression sur un mammifère sur lequel les étapes suivantes sont mises en œuvre :
 - 5 a) l'application d'une compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau dudit mammifère à l'aide de deux aimants de part et d'autre d'un pli de peau dudit mammifère
 - b) le retrait des aimants
 - c) la pose d'un pansement à l'endroit des aimants suivi d'une friction à l'endroit des aimants
 - 10 d) l'application d'une seconde compression magnétique perpendiculaire à la surface de la peau à l'aide de deux aimants de part et d'autre d'un pli de peau dudit mammifère
 - e) le retrait des aimants suivi d'une friction à l'endroit des aimants
 - f) la répétition des étapes d) et e) au moins une fois, de préférence au moins deux
 - 15 g) le retrait du pansement,ledit mammifère étant un rongeur.

2. Modèle selon la revendication 1, dans lequel le mammifère est une souris.
- 20 3. Modèle selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le mammifère est un sujet sain ou diabétique, de préférence diabétique de type I.

4. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les
- 25 aimants utilisés présentent de préférence une pression de 50 à 700mmHg, de préférence 200 à 600, préférentiellement entre 400 et 550 mmHg.

5. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la
- 30 friction opérée à l'étape c) est une friction appuyée, par exemple réalisée à l'aide d'un bâtonnet ouaté.

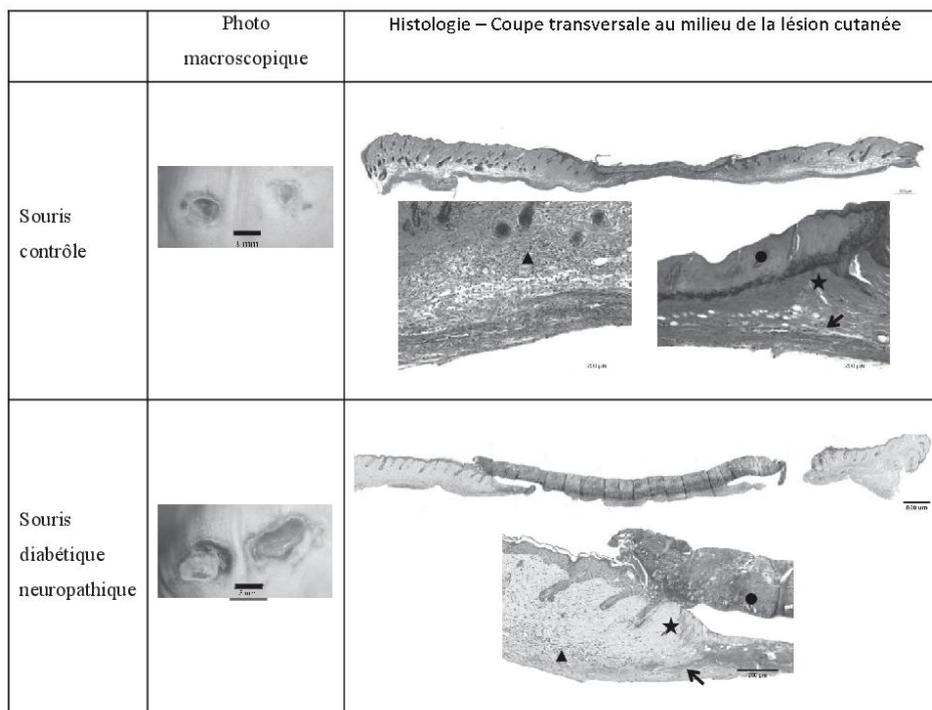
6. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le pansement est un film mince adhésivé.
- 5 7. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la peau dudit mammifère est rasée ou dépilée avant l'étape a), de préférence dépilée.
8. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la durée d'application des aimants à l'étape a) et d) est d'au moins 2 heures, de préférence au moins 3 heures.
- 10 9. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la durée d'application des aimants à l'étape a) et d) ne dépasse pas 8 heures, de préférence 6 heures.
- 15 10. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le retrait du pansement à l'étape g) est réalisé au moins 8 heures après la fin de l'étape e) de retrait des aimants suivi d'une friction appuyée.
- 20 11. Modèle selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape f) de répétition des étapes d) et e) est espacée d'au moins 15 heures, de préférence d'au moins 18 heures.
- 25 12. Utilisation d'un modèle d'ulcère de pression selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour l'évaluation de l'efficacité d'une substance active et/ou d'un dispositif pour la cicatrisation de plaies sur lesquelles ladite substance active a été administrée et/ou ledit dispositif a été apposé.
- 30 13. Procédé d'évaluation d'un traitement de cicatrisation d'une plaie chez un sujet sain ou diabétique, de préférence diabétique de type I, induite au moyen d'un modèle selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, sur laquelle une substance active a été administrée et/ou un dispositif a été apposé, comprenant la caractérisation de l'effet du traitement sur la cicatrisation de ladite plaie.
14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le mammifère est une souris.

ABREGE**MODELE POUR L'EVALUATION DE TRAITEMENTS POUR LA
CICATRISATION DES ULCERES DE PRESSION**

La présente invention se rapporte à une évaluation de traitement(s) pour la cicatrisation des
5 ulcères de pression. De préférence, cette évaluation permet un suivi de la cicatrisation des
ulcères de pression chez les sujets présentant un diabète, en particulier chez les sujets
présentant un diabète neuropathique ou neuro-ischémique.

Cette évaluation permet de suivre des paramètres de cicatrisation tels que l'inflammation, la
granulation, l'épithélialisation. La présente invention se rapporte également à un modèle
10 animal d'évaluation d'ulcère de pression.

1/2

**Figure 1**

Légende : Atteinte de l'épiderme (rond ●), dégradation du collagène (étoile ★), infiltration leucocytaire en profondeur (triangle ▲), muscle cutané endommagé (flèche →).

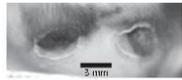
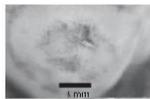
	Photo macroscopique	Histologie – Coupe transversale au milieu de la lésion cutanée	
Souris contrôle			
Souris diabétique neuropathique		 Aucune atteinte de l'épiderme	

Figure 2

Légende : Atteinte de l'épiderme (rond ●), dégradation du collagène (étoile ★), infiltration leucocytaire en profondeur (triangle ▲), muscle cutané endommagé (flèche →).

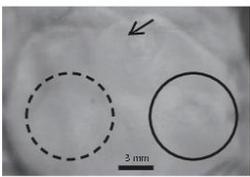
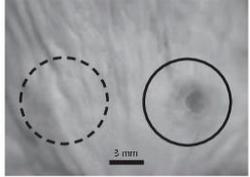
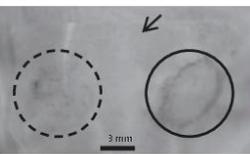
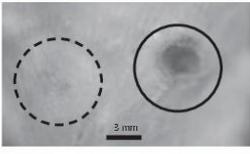
	Photographie juste avant le retrait du pansement (après l'étape j)	24h après le retrait du pansement
Souris contrôle		
Souris diabétique neuropathique		

Figure 3

Annexe 4. Expression des marqueurs biologiques au cours de la cicatrisation de l'ulcère de pression chez les souris 8 semaines

Les échantillons de peau « J0 non lésé » ont été prélevés sur peau dite « non lésée » à 4 et 8 semaines dans tous les groupes. En raison de l'agressivité croissante des C57Bl6 contrôles avec l'âge, en particulier à 16 semaines d'âge [Puglisi-Allegra *et al.* 1985], la peau dite « non lésée » des C8wk (qui sont âgées de 16 semaines) comportait systématiquement des cicatrices de morsures (Figure 56). Les résultats obtenus pour certains marqueurs protéiques (RAMP1, SP, NK1R) semblent donc directement impactés, et souvent augmenté à J0, comparativement au J0 des C4wk. Il est donc difficile de pouvoir discerner l'effet de l'âge ou de la sévérité de la neuropathie dans les groupes 8wk. Les résultats présentés ici n'ont donc pas été pris en compte, mais permettent tout de même d'observer des tendances similaires aux groupes 4wk.

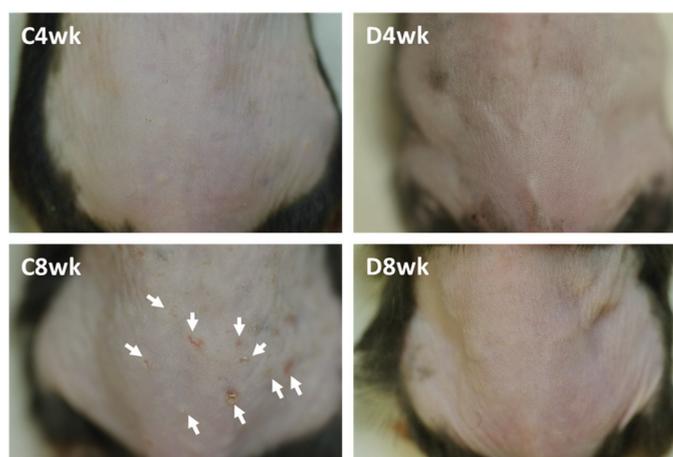


Figure 56. Photos représentatives de la peau des souris juste avant l'induction des lésions de pression. On observe des cicatrices de morsures (flèches blanches) sur la peau des C8wk, non présentes pour les autres groupes.

1. Cinétique d'expression du CGRP et de son récepteur RAMP1-CLR-RCP à 8 semaines

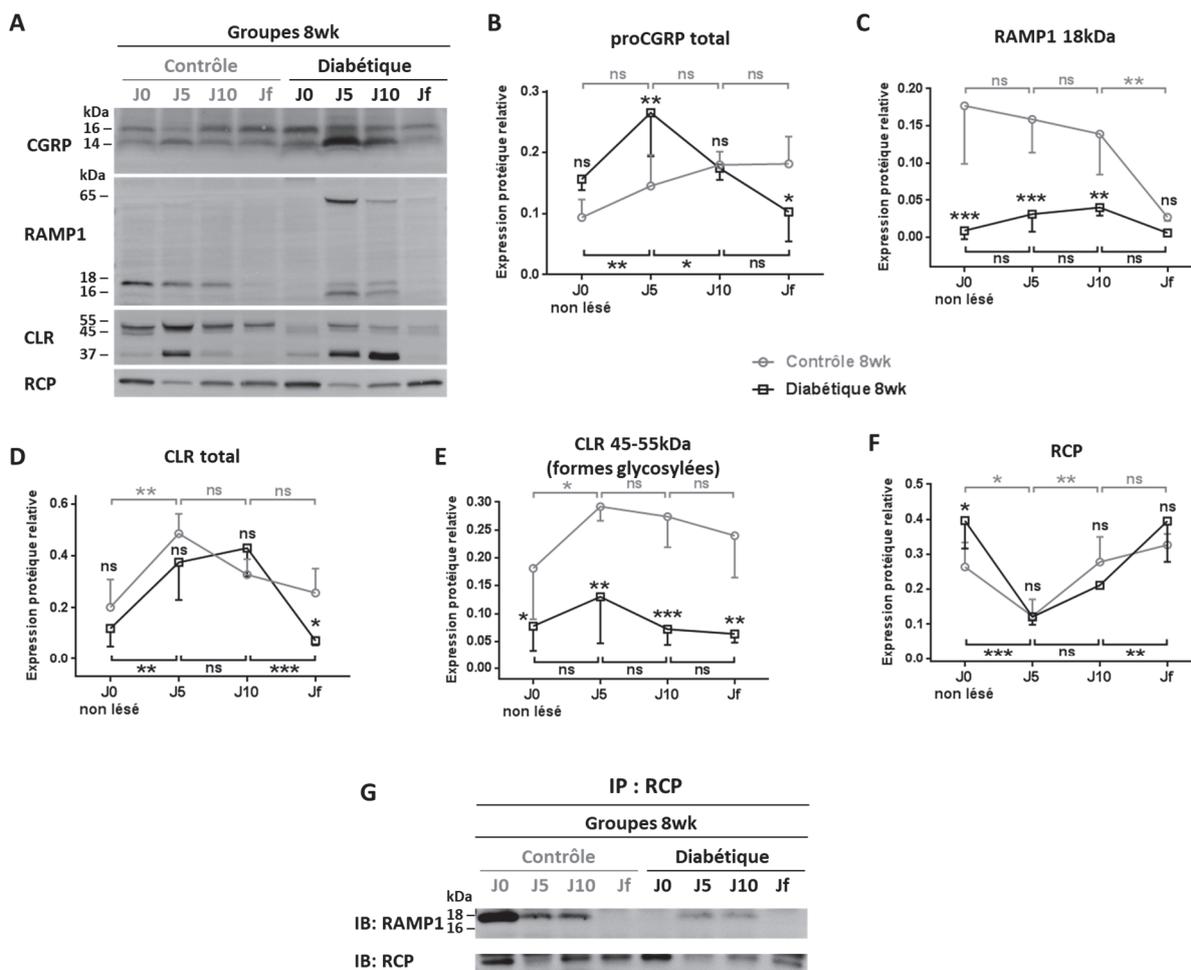


Figure 57. Expression protéique du CGRP, de RAMP1, CLR et RCP et immunoprécipitation de RCP dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques 8wk. A/ Western-blots représentatifs d'extraits protéiques de peau totale avec anticorps anti-CGRP, RAMP1, CLR et RCP. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C8wk et J27 pour les D8wk. B à F/ Expression relative des signaux en western-blot du proCGRP total (14 + 16kDa), RAMP1 à 18kDa, CLR total, CLR glycosylé et RCP normalisés par la quantité protéique totale estimée par Rouge Ponceau. n = 3 souris par condition. Moyenne ± écart-type. ANOVA à 2 facteurs. La comparaison entre les points de cinétique du groupe contrôle est représentée par les accolades du haut, celle du groupe diabétique par les accolades du bas. Les étoiles près des courbes représentent la comparaison entre C8wk et D8wk à chaque point de cinétique. G/ Immunoprécipitation de RCP et immunodétection de RCP et RAMP1.

2. Cinétique d'expression de SP, NK1R, NEP, NGF, p75NTR, TrkA et périostine à 8 semaines

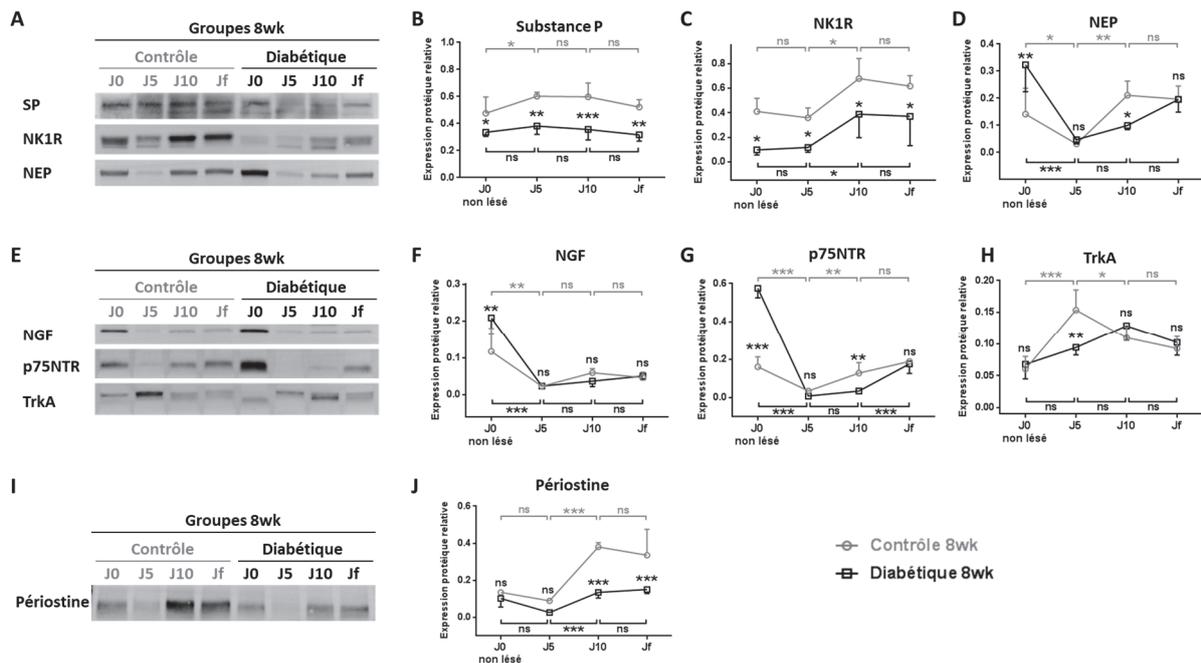


Figure 58. Expression protéique de SP, NK1R, NEP, NGF, p75NTR, TrkA et périostine dans la peau non lésée et durant la cicatrisation de l'ulcère de pression induit chez les souris contrôles et diabétiques 8wk.

A, E, I/ Western-blots représentatifs d'extraits protéiques de peau totale avec anticorps anti- SP, NK1R, NEP, NGF, p75NTR, TrkA et périostine. Jf correspond au jour de « fermeture » de la lésion, soit J19 pour les C8wk et J27 pour les D8wk. B, C, D, F, G, H, J/ Expression relative des signaux en western-blot normalisés par la quantité protéique totale estimée par Rouge Ponceau. n= 3 souris par condition. Moyenne \pm écart-type. ANOVA à 2 facteurs. La comparaison entre les points de cinétique du groupe contrôle est représentée par les accolades du haut, celle du groupe diabétique par les accolades du bas. Les étoiles près des courbes représentent la comparaison entre C8wk et D8wk à chaque point de cinétique.

Annexe 5. Article rédigé sur l'expression du CGRP et de son récepteur pendant la cicatrisation de l'ulcère de pression avec le diabète.

CGRP RECEPTORS SUBUNITS RAMP1 AND CLR EXPRESSION IS IMPAIRED DURING SKIN PRESSURE ULCER HEALING IN DIABETIC MICE

Noëlle Remoué^{1,2}, Marielle Bouschbacher², Dominique Sigaud-Roussel¹

¹CNRS UMR 5305- LBTI, Lyon, France

²Urgo Research Innovation and Development, Chenôve, France.

Key words: Diabetes, neuropathy, skin, wound healing, pressure ulcer, CGRP, RAMP1, CLR

Abbreviations: CGRP, calcitonin gene-related peptide; CLR, calcitonin receptor-like receptor; IENF, intra epidermal nerve fiber; MNCV, motor nerve conduction velocity; PU, pressure ulcer; RAMP1, receptor activity modifying protein 1; RCP, CGRP-receptor component protein; STZ, streptozotocine; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1.

ABSTRACT

Diabetes is one of the most worsening factors for skin ulcer healing. CGRP is implicated in several processes of skin wound healing and its lack in diabetic neuropathic unwounded skin is assumed to be partly responsible of the subsequent delayed wound closure. However, its expression and the one of its receptor complex, i.e. RAMP1-CLR-RCP, have never been studied during healing *in vivo*.

Pressure ulcer was induced on the dorsal skin using magnets on streptozotocine-induced neuropathic diabetic mice and control mice. Healing was followed by skin imaging and histology. CGRP, RAMP1, CLR and RCP expression kinetics were analyzed by immunofluorescence, western blot and/or immunoprecipitation.

Results showed decreased neoepidermis thickness and delayed wound closure despite no differences in proCGRP surexpression during healing process in diabetic group compared to control group. RAMP1 and CLR were predominantly expressed in epidermis during healing, and both proteins are reduced in diabetic compared to control mice skin, with a delay in functional CGRP receptor complex formation in diabetic mice.

Thus, this study suggests that the CGRP receptor complex, but not the CGRP precursor, is impaired during healing in diabetic mice and could be implicated in delaying pressure ulcer closure.

INTRODUCTION

Pressure ulcer (PU) and associated impaired wound healing is a major cause of disability and mortality risks in patients with diabetes, particularly when associated with peripheral neuropathy [1]. Wound healing is one of the most complex biological processes that involves sequential and overlapping phases including coagulation, inflammation, migration-proliferation, and remodeling [2]. Still, time-dependent mechanisms that delay wound skin healing in diabetes are not well understood [3].

Calcitonin gene-related peptide (CGRP), which is essentially contained in nerves [4], is one of the most abundant neuropeptides in healthy skin [5]. CGRP has various biological actions in skin including neurogenic inflammation through its vasodilator potential [4], angiogenesis [6, 7], epidermis proliferation [8, 9], fibroblasts adhesion and proliferation and fibroblasts-to-myofibroblasts differentiation [10]. CGRP is known to be reduced in unwounded skin with diabetic peripheral neuropathy [11], nonetheless the expression of CGRP and its receptor have never been studied during healing *in vivo*.

CGRP exists in two isoforms, α - and β -CGRP, sharing similar biological activities [12]. CGRP is released after TRPV1 or TRPA1 activation [12] and binds to a three components-receptor complex. The first component is a seven-transmembrane protein, the calcitonin receptor-like receptor (CLR), which forms the ligand binding site for CGRP [13]. The second component is the receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), a single transmembrane flanking protein. It is involved in CLR glycosylation and trafficking [14], and converts CLR into a high-affinity receptor for CGRP rather than for adrenomedullin [15]. The third component is the intracellular CGRP receptor component protein (RCP) which is essential for coupling the receptor effectively to the intracellular signal pathway [16]. Then, to downstream activity, the CGRP complex receptor needs to undergo β -arrestin/clathrin-dependent endocytosis [17].

Taken together this makes CGRP a potential crucial actor for wound healing. Indeed, knockout mice for CGRP or its receptor subunit RAMP1 demonstrated delayed excision closure [7, 18], but authors of these studies particularly focused on angiogenesis and lymphangiogenesis modulation during wound healing.

Thus, using a control and type 1 diabetic mice model, the current study aimed to explore the protein expression kinetic of CGRP and its receptor complex (RAMP1, CLR, RCP) during PU healing process and until wound closure.

To this end, we first characterized peripheral neuropathy and skin structure of diabetic mice compared to age-matched control mice. Then, we examined PU induction and healing process together with expression of CGRP and localization within the skin of its receptor complex. This revealed that with small fiber diabetic neuropathy,

the CGRP receptor complex, but not the CGRP precursor, is impaired during healing and could be implicated in delaying PU closure.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals

All experiments procedures were carried out in accordance with the guidelines for ethical care of experimental animals of the European Community and approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of Lyon. Male C57Bl/6JRj mice (Janvier Labs, Saint-Berthevin, France) aged of 7 weeks were allowed to adapt to their environment for a period of 7 days before the experiment. Animals were housed in plastic cages and maintained on a 12-hour-light/12-hour-dark cycle at 22°C with food and water *ad libitum*. Mice were caged individually after wounding.

Treatment of mice

Mice received a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (Zanosar® from Keocyt, Montrouge, France) at 180mg/kg and only mice with glucose level ≥ 400 mg/dL 48h after the injection and throughout the study were considered diabetic and included in the study. Mice injected with citrate buffer alone were used as control.

Neuropathy assessment

Thermal nociceptive response was evaluated on conscious mouse maintained in a restrainer (with 15min of acclimation) and placed on the tail-flick analgesia meter (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). Then, radiant heat was applied from a halogen lamp focused on the tail surface, and latency before tail movement was automatically recorded. For each mouse, five determinations were carried out.

Motor nerve conduction velocity (MNCV) was assessed after general anesthesia (thiopental 65 mg/kg intraperitoneal (Panpharma, Luitré, France), by stimulating at the exposed sciatic notch and heel while recording the M-wave (compound muscle action potential) from the dorsal interossei foot muscles. During recording, the temperature of the site surrounding the nerve was kept constant at 37°C.

Intra epidermal nerve fiber (IENF) density was analyzed on dorsal skin following indications from Lauria *et al.* [19]. Briefly, IENF density was expressed as the number of PGP9.5 positive nerve fiber touching the dermoepidermal junction divided by the length of epidermis.

Pressure-induced ulcer in mice

Protocol for induction of pressure ulcer was inspired from Stadler *et al.* [20]. Briefly, four weeks after induction of hyperglycemia by streptozotocin or buffer injection for control group, the mice were anesthetized and their backs were shaved and cleaned. 24 hours later, a lower dorsal skin fold was placed between two round neodymium magnetic plates (Magzy, Fryšták, Czech Republic, #20109) for a 3 hour-compression, then compressed skin areas were gently rubbed with a cotton swab according to our patent ref. PCT/FR2019/051398. The compression/friction steps were carried out on three consecutive days (days 0, 1 and 2), inducing two skin pressure ulcers per mouse. The wounds were photographed every 2-3 days until closure. Gross wound surface was quantified with ImageJ for each mouse and expressed as the percentage of average area per group at day 5. After mice euthanasia, unwounded skin at day 0 and skin lesion areas at day 5, 10 and closure day were harvested. For each mouse, one of the two lesion areas was recovered for gene expression analysis, and the other one was cut in two equal parts that were used for protein and histology analyses.

Histology & immunofluorescence

Skin samples were fixed in Alcool-Formol-Acetic acid liquid (Carbo Erba Reactifs, Val-de-Reuil, France) and embedded in paraffin. 5µm sections were used in this study, excepted for IENF quantification with 30µm sections.

Hematoxylin Eosin Safranin staining (HES) was used for histological analyses. Pictures were taken with Leica DM2000 optical microscope with LAS software. ImageJ was used to measure i/ unwounded skin layers' thicknesses with average of 30 measures per section in 2 sections per mouse, and ii/ maximal neopeidermis thickness in wounded skin for each mouse at each time point.

For immunodetection, sections deparaffining was followed by 0.1% triton permeabilization, heat-induced antigen retrieval with pH6 citrate buffer, and BSA/goat serum blocking step. Anti-CLR antibody (Abcam, Paris, France, #ab140761) was preliminary conjugated to Cyanin5 with Cy5 Fast conjugation Kit (Abcam, Paris). Rabbit primary antibodies were incubated overnight at 4°C (PGP9.5, Abcam #ab108986, 1/300; RAMP1-Alexa 594, #ab241335, 1/100; CLR-Cy5, 1/100). Goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to Alexa 647 (Abcam #ab150079, 1/500) was used to localize PGP9.5 immunoreactive fibers. Nucleuses were counterstained with DAPI. Pictures were taken with Nikon ECLIPSE Ti-E microscope and NIS-Element software.

Western Blot and immunoprecipitation

Skin samples were lysed in RIPA solution supplemented with proteases- and phosphatases-inhibitors, and centrifuged to recover protein lysate supernatant. Total protein concentration was measured by the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Illkirch, France, #23225).

For western blot, 30 µg of protein per sample were denatured and reduced with buffer containing 2 % SDS and 15 mM DTT at 95°C during 5 min. Proteins from samples were separated on 4–15 % precast polyacrylamide gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France, #4561086). After transfer, PVDF membranes were stained with Ponceau Red and picture were acquired. Membranes were blocked in 5% non-fat dried milk. Rabbit primary antibodies (CGRP, Cell signaling #14959, 1/500; RAMP1, Abcam #ab156575, 1/1000; CLR, Abcam #ab173562, 1/100; RCP, Abcam #ab139264, 1/1000) were incubated in 2% non-fat dried milk overnight at 4°C under agitation. Membranes were then incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Bio-Rad #1706515, 1/10000). Protein were detected using an enhanced chemiluminescence system (Thermo Scientific, #34580) and the signal was recorded by Fusion Fx system (Vilber Lourmat, Collégien, France). Protein signals was normalized by total Ponceau red staining for each sample, evaluated using the Gelanalyzer software (version 2010a).

For immunoprecipitation, 30 µg of protein per sample were incubated with anti-RCP antibody (Abcam #ab139264, 1/50) overnight at 4°C under agitation. Rabbit IgG (Abcam #ab172730) and an input sample made with mixed control and diabetic skin mice extracts were used to confirm immunoprecipitation validity. IgG were precipitated with ChiPgrade Protein A/G magnetic beads (Thermo Scientific, #26162), and washed with proteases- and phosphatases-inhibitors supplemented RIPA. Immunoprecipitated proteins were denatured and reduced with buffer containing 4 % SDS and 100mM DTT at 95°C during 5 min. Samples were then treated as for western blot protocol, with specific secondary antibody (Abcam #ab131366, 1/500).

Statistical Analysis

Results are expressed as means ± SD, with at least n=3 for each condition. Statistical tests were performed using GraphPad Prism 6.01 (San Diego, USA). Unpaired parametric t-test was used to compare the means of two groups. Multiple t-test was used to compare two groups at each time point independently. Two-way ANOVA with multiple comparison and Fisher's LSD posthoc-test were for inter- and intra-group comparisons. Significance was defined at $p < 0.05$.

RESULTS

4-week diabetic mice exhibit peripheral neuropathy and thin epidermis

Four weeks after STZ injection, body weight was decreased in diabetic mice compared to control mice (Table 1), as generally occurring with type I diabetes. Diabetic mice exhibited a significant decreased tail flick latency indicating thermal hyperalgesia with a reduction in IENF density (Fig. 1) and no change in MNCV compared to control mice (Table 1), these findings highlighting a small fiber peripheral neuropathy without large nerve fiber dysfunction [21].

Skin histological analysis from diabetic mice showed no statistical change in full skin and dermis thicknesses compared to control mice, despite seemingly fewer skin appendages and finer hypodermis (Fig. 2). However, the epidermis was thinner with irregular alignment of epidermis basal cells (Fig. 2) compared to control mice.

PU healing is delayed in diabetic mice

After skin compression, the maximal skin lesion area was reached at day 5 in both groups (Fig. 3A) but was 1.8 fold larger in diabetic than in control mice ($66.5 \text{ mm}^2 \pm 7.0$, and $37.1 \text{ mm}^2 \pm 6.2$, respectively, $p < 0.001$). To better compare lesion evolution until closure between groups, gross wound areas were expressed in percentage of day 5 (Fig. 3B), highlighting that skin wound healing was delayed in diabetic mice (day 23) compared to control mice (day 19).

For both groups the skin lesion area resulted in damaged epidermis, dermis and *panniculus carnosus* (Fig. 3D), defined as a stage 3 PU [22].

In control mice at day 5, the necrotic tissue was scarcely peeled from the skin. At the edge of the lesion, a thickened epidermis was observed, preceded by a keratinocyte tongue migrating under the necrotic tissue. At day 10 there is a total re-epithelialization that occurs under the residual necrotic tissue with a thick not organized neo-epidermis layer.

In diabetic mice at day 5, necrotic tissue was also observed, delimited in HES stained skin section by a purple colored band, but was not peeled off the skin unlike in control mice. The epidermis at the edge of the necrotic tissue was only slightly thickened. At day 10 the re-epithelialization was initiated with a barely thicker epidermis and a keratinocyte tongue underneath partially peeled necrotic tissue (Fig. 3D).

At day 5 and 10, the maximal thickness reached by neoepidermis was significantly lower in diabetic than in control mice (Fig. 3C). At day 10, the tissue underlying epidermis appeared thinner in diabetic than in control mice (Fig. 3D).

Upregulation of proCGRP during PU healing is not impaired in diabetic mice skin

To examine whether CGRP is involved in PU healing process, we analyzed the protein expression of the full thickness skin lesion area at different time point until wound closure (Fig. 4A). CGRP mature forms are labile proteins (expected around 5 kDa) and only the two precursor protein isoforms (proCGRP) were detectable at 16 and 14 kDa [23, 24]. Unwounded diabetic skin expressed significantly less total proCGRP compared to unwounded control skin (Fig. 4B). In wound tissue at day 5 proCGRP protein expression was significantly increased compared to unwound tissue and decreased at day 10 compared to day 5 in both groups. There was no statistical difference in proCGRP protein expression between day 10 and closure day.

Since the proCGRP protein expression pattern in response to skin compression was not different between diabetic and control mice we focused our study on the protein expression of CGRP receptor subunits, i.e. RAMP1 and CLR in skin.

CGRP receptor subunits RAMP1 and CLR are upregulated during PU healing in epidermis in both control and diabetic mice, but are present in granulation tissue of control mice only

Immunostaining of RAMP1 and CLR at the unwounded site of the skin was weakly present in the epidermis, and largely present in hair follicle bulbs and skin muscle *Panniculus carnosus* in both groups (Fig. 5A).

At day 5 of wound healing, both RAMP1 and CLR staining were well detected in the epidermis of control mice (Fig. 5B zoom 1 and 2) compared to diabetic mice (Fig. 5B zoom 5). At day 10 in control mice, RAMP1 and CLR were detected in the neo-epidermis and in (myo)fibroblasts just underlying the epidermis in the middle of the wound (Fig. 5A and B zoom 3). At the same time in diabetic mice skin, CLR was well expressed in the neo-epidermis whereas RAMP1 was only partially immunodetected (Fig. 5A and B zoom 7) compared to wound edges (Fig. 5A and B zoom 6). At the closure day in both groups, RAMP1 and CLR staining were observed in the neo-epidermis (Fig. 5A and B zoom 4 and 8).

In both groups, RAMP1 and CLR exhibited a cytoplasmic and membrane staining at the edges of the wound (Fig. 5B zoom 1 and 6) and at the site of total re-epithelialization (Fig. 5B zoom 4 and 8). Conversely, RAMP1 and CLR were delocalized from the cell membrane to the cytoplasm only in the thickened epidermis during healing in control mice (Fig. 5B zoom 2 and 3) but it was not so obvious in diabetic mice epidermis (Fig. 5B zoom 7).

Diabetic mice exhibit delayed RAMP1 and CLR expressions and lack of CLR glycosylation during PU healing

In both control and diabetic unwounded skin, RAMP1 protein at the expected 18 kDa molecular weight was not detectable (Fig. 6A and C). Nevertheless, in the control group, during PU healing at day 5 and 10, 18 kDa-RAMP1 expression was increased compared to unwounded skin and then its expression decreased at the closure day. In contrast, in diabetic mice the peak of 18 kDa-RAMP1 expression was delayed and observed at day 10 followed by a similar decrease to control skin at closure day. Furthermore, greater levels of additional RAMP1-immunopositive bands were detected solely for diabetic mice at day 5 and 10, at higher (65 kDa) and lower molecular weight (16 kDa) (Fig. 6A).

Equally in control and diabetic unwounded skin, CLR protein was detected at 37 and 45-55kDa (Fig. 6A). According to Nikitenko *et al.* [25], the CLR positive band observed at 37 kDa corresponded to its unglycosylated form, the 45 kDa-CLR band to core glycosylated form, and the 55 kDa-CLR band to terminally glycosylated form. In our study, the two bands corresponding to glycosylated forms were not well distinguishable therefore we took into account total glycosylated forms (45-55kDa).

During healing in control mice, a parallel increase in total and glycosylated CLR proteins was observed with a peak at day 5, followed by a decrease until closure day (Fig. 6D and E). At the opposite, in diabetic mice total CLR only increased at day 10 and was not accompanied by glycosylated forms rise; then total CLR returned to basal level at closure day (Fig. 6D and E).

RCP protein level decreased at day 5 in control group and then increased gradually up to closure day (Fig. 6A and B). In unwounded diabetic skin, RCP was slightly more expressed than in unwounded control skin. Then, RCP level decreased at day 5 similarly to control mice skin but remained significantly low at day 10 and increased at closure day to control group expression level.

CGRP receptor complex formation is delayed in diabetic mice during PU healing

To assess whether functional CGRP receptor, i.e. RAMP1-CLR-RCP complex, was formed during PU healing, we performed an immunoprecipitation against RCP to look at its partners.

Immunoprecipitated RCP protein level pattern during healing (Fig. 7) followed the ones observed in western-blot for control and diabetic mice (Fig. 6A and B).

Despite technical optimization, CLR was not distinguishable from IgG heavy chains (data not shown), however Hilaret *et al.* [26, 27] demonstrated that RAMP1 is co-immunoprecipitated with CLR. Since we found that

RAMP1 was co-immunoprecipitated with RCP and that, to date, RCP has been found to interact only with CLR [28], we assumed that RAMP1 and RCP were linked by CLR.

For both diabetic and control mice unwounded skin, co-immunoprecipitated RAMP1 was undetectable (Fig. 7). During healing in control mice, 18 kDa-RAMP1 was well detected at day 5 and 10, and then a lower signal was observed at closure day. On the contrary for diabetic mice, 18 kDa-RAMP1 was detected only at day 10.

DISCUSSION

Chronic PU is one of the major complications for diabetic patients [1] and delay is often explained by lack in CGRP positive nerve fiber observed in unwounded skin with diabetic peripheral neuropathy [11]. Indeed, it was shown that CGRP KO mice exhibited delayed excision healing [7]. However, our study is the first that monitors the expression of CGRP ligand and its high-affinity receptor all along PU healing in control and diabetic neuropathic mice. We demonstrated that, surprisingly, CGRP expression seemed well upregulated during wound healing in diabetic mice, but the formation and maturation of its receptor complex seemed impaired, which could contribute to delay skin healing.

In our study, unwounded skin of diabetic mice with moderate peripheral neuropathy [21] exhibited irregular alignment of basal keratinocytes and a thinner epidermis than control mice, as already described in diabetic mice [29-31], together with lower proCGRP skin content. The epidermis thinning could be explained by previously observed decreased keratinocyte proliferation with diabetes [30, 31], partly caused by hyperglycemia [32] and CGRP lack [9]. This thinner epidermis could contribute to lower skin resistance to pressure, already reported by others [33, 34], leading to larger ulcer that developed later in mice. Conversely, no epidermis morphological or proliferative capacity change was observed in non-neuropathic diabetic patients [35], which could highlight the importance of neuropathy factor in these impairments.

After PU induction, proCGRP unexpectedly increased to same level in both mice groups suggesting that diabetic skin keeps the ability to increase its expression when the homeostasis is disturbed. CGRP is mainly produced by nerves in skin [4], but it has been also identified in keratinocytes, adipocytes, endothelial and immune cells [12], that could participate in proCGRP rise observed in skin during diabetic skin healing.

Wound healing consist in two major phases which are contraction and regeneration [36]. Keratinocytes proliferation and migration are phenomena required for epidermis regeneration, and CGRP clearly stimulate keratinocytes proliferation, as shown by numerous *in vitro* studies [8, 9]. According to recent studies on excision-reepidermization dynamics, two areas can be distinguished on epidermis during healing, i.e. the keratinocyte tongue with migrating cells followed by a thicker epidermis area with proliferating cells [37, 38]. In our study on PU healing, we observed these two apparent areas on control mice whereas the second area was not well noticeable in diabetic mice. This observation seems in contrast to the hyperproliferative epidermis of ulcer margins from chronic wounds of diabetic patients [39]. This discrepancy commonly observed between human and diabetic mice wound healing could be caused by differences in glycaemia regulation, neuropathic impairment, bacterial infection or vascular complications, together with the duration of healing since diabetic mice do not exhibit chronic wound but only delayed healing.

Since CGRP synthesis seemed not impaired during healing in diabetic mice in our study, and to better identify in which skin compartment and cells it can act during PU healing, we studied the localization of its receptor subunits RAMP1 and CLR by immunofluorescence, which, to our knowledge, has never been done before, and quantified their protein expression by western-blot. This revealed that both RAMP1 and CLR were well upregulated from day 5 in control mice during PU healing, especially in keratinocytes, which is consistent with RAMP1 gene expression transitory increase observed in *in vitro* epidermis formation [23], with an intracellular localization in keratinocytes of the thick epidermis area. In the opposite, receptor subunits increase was delayed to day 10 in diabetic mice which did not exhibit clearly purely intracellular localization in neo-epidermis. Since it has been demonstrated that both receptor subunits delocalized from membrane to cytoplasm after *in vitro* activation by CGRP [40], our observations suggest that RAMP1 and CLR may not be well activated during healing in diabetic mice.

RAMP1 and CLR are two proteins that can each complex to other proteins to link other ligand than CGRP, i.e. RAMP1-CTR (CTR, calcitonin receptor) forms amylin receptor and RAMP2,3-CLR forms adrenomedullin receptor [41]. Moreover, RAMP1-CLR must interact directly to RCP at the membrane to allow intracellular signaling [28]. Thus, we verified the correct formation of CGRP receptor, i.e. RAMP1-CLR-RCP, by immunoprecipitation. RAMP1 was co-immunoprecipitated mainly at day 5 and 10 in control mice while only at day 10 in diabetic mice skin. RAMP1 and CLR have to be expressed simultaneously to form the complex [42], and the delay in CLR upregulation seen by western-blot for diabetic group could explain the delay in complex formation observed by immunoprecipitation. We can also hypothesize that RAMP1 immuno-positive proteins observed in western-blot (at 16 and 65 kDa) could complex to CLR but not allowing its effective cytoplasmic

membrane translocation and RCP interaction, leading to lower level of proper complex. Peculiar RAMP1 bands observed lonely in diabetic healing skin were also observed in unreduced and higher reducing conditions (Supplementary Fig. 2). This suggests that the lower band could be a shorter form of RAMP1; and the upper band could be a RAMP1 aggregate as observed and hypothesized in another study [27].

RAMP1 acts as a chaperone protein for CLR and allows its glycosylation without which CGRP can not bind the receptor [26]. Although CGRP receptor complex seemed to form at day 10 in diabetic mice, the glycosylated CLR level did not increase like in control mice. It suggests that maturation of CLR subunit could be impaired by diabetes, as reported for other proteins post-translational modifications [43].

Our results depicted an impaired CGRP receptor complex expression in diabetic mice skin that could contribute to reduce keratinocyte proliferation already observed elsewhere [44], as showed by apparent thinner neo-epidermis. According Park *et al.* [38], epidermis deprived from proliferation will compensate by increasing migrating cell to close the wound. Here we observed a higher and prolonged gene expression of MMP-9,-10 and -13 (Supplementary Fig. 3), all proteases being involved in keratinocyte migration [37, 45], highlighting a pronounced migrating phenotype. Indeed, MMP-10 was reported to be more present in chronic wound epidermis edges of diabetic patients [46].

In addition to epidermis importance for wound closure, it has been showed that CGRP could increase fibroblasts-to-myofibroblasts differentiation [10]. Here, we observed positive immunostaining for both RAMP1 and CLR in control mice granulation tissue, unlike in diabetic mice during skin healing. In absence of receptor expression, change in fibroblasts phenotype might not happen in diabetic skin, leading to lack of contraction and larger surface to regenerate than control skin.

Taken together our results appeared to show that CGRP pathway deficiency during skin PU healing was not due to neuropeptide lack but rather to receptor formation and maturation impairment. Similarly, a previous study on heart of STZ-induced diabetic rat demonstrated that CGRP is well expressed but accumulated in nerve fibers, together with decrease in CLR gene expression [47].

In conclusion, our study in mice is a first insight that expands our knowledge of the implication of RAMP1 and CLR in skin PU healing and with diabetes. Undoubtedly, many additional factors than CGRP pathway can contribute to impair healing of diabetic PUs, but we observed a delay in reepithelialization and wound closure that coincided with delayed RAMP1 and CLR expression. These findings show that impaired CGRP receptor complex could participate in delaying wound healing; thus, therapeutic strategies aimed at modulating receptor expression and maturation should be tested to improve the outcome of diabetic PU.

REFERENCES

1. Armstrong, D.G., A.J.M. Boulton, and S.A. Bus, *Diabetic Foot Ulcers, And Their Recurrence*. N Engl J Med, 2017. **376**(24): p. 2367-2375.
2. Gurtner, G.C., S. Werner, Y. Barrandon, *et al.*, *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
3. Brem, H. and M. Tomic-Canic, *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1219-22.
4. Steinhoff, M., S. Stander, S. Seeliger, *et al.*, *Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation*. Arch Dermatol, 2003. **139**(11): p. 1479-88.
5. Cheret, J., N. Lebonvallet, J.L. Carre, *et al.*, *Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing*. Wound Repair Regen, 2013. **21**(6): p. 772-88.
6. Haegerstrand, A., C.J. Dalsgaard, B. Jonzon, *et al.*, *Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9): p. 3299-303.
7. Toda, M., T. Suzuki, K. Hosono, *et al.*, *Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(6): p. 352-9.
8. Shi, X., L. Wang, J.D. Clark, *et al.*, *Keratinocytes express cytokines and nerve growth factor in response to neuropeptide activation of the ERK1/2 and JNK MAPK transcription pathways*. Regulatory Peptides, 2013. **186**: p. 92-103.
9. Roggenkamp, D., S. Kopnick, F. Stab, *et al.*, *Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(6): p. 1620-8.
10. Cheret, J., N. Lebonvallet, V. Buhe, *et al.*, *Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process*. J Dermatol Sci, 2014. **74**(3): p. 193-203.
11. Lindberger, M., H.D. Schroder, M. Schultzberg, *et al.*, *Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus*. J Neurol Sci, 1989. **93**(2-3): p. 289-96.

12. Russell, F.A., R. King, S.J. Smillie, *et al.*, *Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(4): p. 1099-142.
13. Banerjee, S., J. Evanson, E. Harris, *et al.*, *Identification of specific calcitonin-like receptor residues important for calcitonin gene-related peptide high affinity binding*. *BMC Pharmacol*, 2006. **6**(9): p. 1471-2210.
14. McLatchie, L.M., N.J. Fraser, M.J. Main, *et al.*, *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor*. *Nature*, 1998. **393**(6683): p. 333-9.
15. Hay, D.L., C.S. Walker, J.J. Gingell, *et al.*, *Receptor activity-modifying proteins; multifunctional G protein-coupled receptor accessory proteins*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(2): p. 568-73.
16. Evans, B.N., M.I. Rosenblatt, L.O. Mnayer, *et al.*, *CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 31438-43.
17. Padilla, B.E., G.S. Cottrell, D. Roosterman, *et al.*, *Endothelin-converting enzyme-1 regulates endosomal sorting of calcitonin receptor-like receptor and beta-arrestins*. *J Cell Biol*, 2007. **179**(5): p. 981-97.
18. Kurashige, C., K. Hosono, H. Matsuda, *et al.*, *Roles of receptor activity-modifying protein 1 in angiogenesis and lymphangiogenesis during skin wound healing in mice*. *Faseb J*, 2014. **28**(3): p. 1237-47.
19. Lauria, G., D.R. Cornblath, O. Johansson, *et al.*, *EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy*. *Eur J Neurol*, 2005. **12**(10): p. 747-58.
20. Stadler, I., R.-Y. Zhang, P. Oskoui, *et al.*, *Development of a Simple, Noninvasive, Clinically Relevant Model of Pressure Ulcers in the Mouse*. *Journal of Investigative Surgery*, 2004. **17**(4): p. 221-227.
21. Biessels, G.J., V. Bril, N.A. Calcutt, *et al.*, *Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab)*. *J Peripher Nerv Syst*, 2014. **19**(2): p. 77-87.
22. Edsberg, L.E., J.M. Black, M. Goldberg, *et al.*, *Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System: Revised Pressure Injury Staging System*. *J Wound Ostomy Continence Nurs*, 2016. **43**(6): p. 585-597.
23. Hou, Q., T. Barr, L. Gee, *et al.*, *Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide beta: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms*. *Pain*, 2011. **152**(9): p. 2036-51.
24. Uniprot -CALCA. *UniProtKB - Q99JA0 (CALCA_MOUSE)*. 08 May 2019; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99JA0>.
25. Nikitenko, L.L., N. Blucher, S.B. Fox, *et al.*, *Adrenomedullin and CGRP interact with endogenous calcitonin-receptor-like receptor in endothelial cells and induce its desensitisation by different mechanisms*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 5): p. 910-22.
26. Hilairet, S., S.M. Foord, F.H. Marshall, *et al.*, *Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 29575-81.
27. Hilairet, S., C. Belanger, J. Bertrand, *et al.*, *Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(45): p. 42182-90.
28. Egea, S.C. and I.M. Dickerson, *Direct interactions between calcitonin-like receptor (CLR) and CGRP-receptor component protein (RCP) regulate CGRP receptor signaling*. *Endocrinology*, 2012. **153**(4): p. 1850-60.
29. Taylor, K.R., A.E. Costanzo, and J.M. Jameson, *Dysfunctional gammadelta T cells contribute to impaired keratinocyte homeostasis in mouse models of obesity*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(12): p. 2409-18.
30. Okano, J., H. Kojima, M. Katagi, *et al.*, *Hyperglycemia Induces Skin Barrier Dysfunctions with Impairment of Epidermal Integrity in Non-Wounded Skin of Type 1 Diabetic Mice*. *PLoS ONE*, 2016. **11**(11).
31. Sakai, S., Y. Endo, N. Ozawa, *et al.*, *Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(1): p. 79-85.
32. Spravchikov, N., G. Sizyakov, M. Gartsbein, *et al.*, *Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications*. *Diabetes*, 2001. **50**(7): p. 1627-35.
33. Danigo, A., L. Magy, L. Richard, *et al.*, *Neuroprotective Effect of Erythropoietin against Pressure Ulcer in a Mouse Model of Small Fiber Neuropathy*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(11): p. e113454.
34. Demiot, C., V. Sarrazy, J. Javellaud, *et al.*, *Erythropoietin Restores C-Fiber Function and Prevents Pressure Ulcer Formation in Diabetic Mice*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011. **131**(11): p. 2316-2322.
35. Ramirez, H.A., L. Liang, I. Pastar, *et al.*, *Comparative Genomic, MicroRNA, and Tissue Analyses Reveal Subtle Differences between Non-Diabetic and Diabetic Foot Skin*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0137133.
36. Yannas, I.V., D.S. Tzeranis, and P.T.C. So, *Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation*. *Wound Repair Regen*, 2017. **25**(2): p. 177-191.
37. Aragona, M., S. Dekoninck, S. Rulands, *et al.*, *Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis*. *Nat Commun*, 2017. **8**(14684).

38. Park, S., D.G. Gonzalez, B. Guirao, *et al.*, *Tissue-scale coordination of cellular behaviour promotes epidermal wound repair in live mice*. *Nat Cell Biol*, 2017. **19**(2): p. 155-163.
39. Usui, M.L., J.N. Mansbridge, W.G. Carter, *et al.*, *Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds*. *J Histochem Cytochem*, 2008. **56**(7): p. 687-96.
40. Cottrell, G.S., B. Padilla, S. Pikiros, *et al.*, *Post-endocytic sorting of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 1*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(16): p. 12260-71.
41. Hay, D.L., D.R. Poyner, and P.M. Sexton, *GPCR modulation by RAMPs*. *Pharmacol Ther*, 2006. **109**(1-2): p. 173-97.
42. Kuwasako, K., Y. Shimekake, M. Masuda, *et al.*, *Visualization of the calcitonin receptor-like receptor and its receptor activity-modifying proteins during internalization and recycling*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(38): p. 29602-9.
43. Mellor, K.M., M.A. Brimble, and L.M. Delbridge, *Glucose as an agent of post-translational modification in diabetes--New cardiac epigenetic insights*. *Life Sci*, 2015. **129**: p. 48-53.
44. Goren, I., A. Linke, E. Muller, *et al.*, *The suppressor of cytokine signaling-3 is upregulated in impaired skin repair: implications for keratinocyte proliferation*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(2): p. 477-85.
45. Saarialho-Kere, U.K., A.P. Pentland, H. Birkedal-Hansen, *et al.*, *Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(1): p. 79-88.
46. Rechartd, O., O. Elomaa, M. Vaalamo, *et al.*, *Stromelysin-2 is upregulated during normal wound repair and is induced by cytokines*. *J Invest Dermatol*, 2000. **115**(5): p. 778-87.
47. Chotťová Dvůráková, M., J. Kuncová, U. Pfeil, *et al.*, *Cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetes involves intra-axonal accumulation of calcitonin gene-related peptide and altered expression of its receptor in rats*. *Neuroscience*, 2005. **134**(1): p. 51-8.

TABLES

Table 1. Characterization of 4-week diabetic mice and age-matched control mice

	Control	Diabetic
Body weight (g)	25.5 ± 1.3	19.7 ± 1.2 ***
Glycaemia (mg/dl)	208 ± 29	> 600 ***
Tail flick latency (sec)	5.5 ± 0.9	3.6 ± 0.8 ***
MNCV (m/sec)	41.0 ± 2.2	39.9 ± 2.2 ns

n = 20 in each group for body weight and glycaemia; n = 10 in each group for tail flick test; n = 8-10 in each group for MNCV (motor nerve conduction velocity). Mean ± SD. Unpaired parametric t-test. *** p < 0.001, ns non-significant, diabetic versus control group.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Intra epidermal nerve fiber density in diabetic and control mice skin

A/ Immunostaining of PGP9.5 positive nerve fibers in unwounded skin from 4-week diabetic and age-matched control mice. Arrows indicate nerve fibers in epidermis. B/ Intra-epidermal nerve fibers (IENF) density for 4-week diabetic and age-matched control mice, corresponding to ratio of IENF divided by epidermis length. Mean ± SD of n = 3 per group. Unpaired parametric T test, diabetic versus control group. * p < 0.05.

Figure 2. Skin histology of diabetic and age-matched control mice

A/ HES staining of histological section of unwounded skin from control mice and diabetic mice, with a zoomed showing the alignment of basal cells. B/ Quantification of full skin (viable epidermis, dermis and hypodermis), dermis and viable epidermis thicknesses' in control (circle) and diabetic (square) mice groups. Mean ± SD of n = 3 to 5 per group. Unpaired parametric t-test of diabetic versus age-matched control mice. ***p < 0.001; ns, non-significant.

Figure 3. Macroscopic and histologic evolution of PU lesion during healing

A/ Macroscopic picture of pressure-ulcers at day 5, 10, 15 and 19 after de beginning of the compression protocol with magnets. B/ Macroscopic lesion area evolution during PU healing expressed in percentage of day 5 lesion

area and for diabetic (square, dotted line) and age-matched control (circle) groups. Mean \pm SD of 6 to 35 mice per group and time point. C/ Maximal neopeidermis thickness measured on histological section at day 5, day 10 and closure day for diabetic (square) and age-matched control (circle) groups, i.e. day 23 and day 19 respectively. Mean \pm SD of 3 mice per group and time point. For B and C: Multiple t-test of diabetic versus control mice at the same time point; * $p > 0.05$; *** $p > 0.001$; ns, non-significant. D/ HES staining of histological section of compressed area at day 5 and 10 after the beginning of the compression protocol on control mice and diabetic mice. Arrows indicate head of keratinocyte tongue, arrow heads indicate thickened epidermis behind keratinocyte tongue, and stars indicate necrotic areas.

Figure 4. CGRP protein expression during PU healing

A/ Western blot of skin protein extracts against CGRP during PU healing of control and diabetic mice, highlighting the two precursor protein isoforms (proCGRP) at 16 and 14 kDa. B/ Relative total proCGRP protein expression (sum of 16 and 14 kDa- band signals) during PU healing with normalization of western blot signals by total protein on Ponceau Red staining of control (circle) and diabetic (square, dotted line) groups (Ponceau Red picture in Supplementary Figure 1). Closure day for control group is day 19, whereas it is day 23 for diabetic group. Mean \pm SD of $n = 3$ mice per group and time point. Two-way ANOVA, diabetic versus control at the same time point is indicated closed to lines; upper brackets represent comparison between time points for control mice; lower dotted brackets represent comparison between time points for diabetic mice. * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$; *** $p > 0.001$; ns, non-significant.

Figure 5. Spacio-temporal expression of RAMP1 and CLR during skin PU healing

A/ Representative merged immunostaining of RAMP1 (green), CLR (red), and nucleus counterstained with DAPI (blue), on skin section at day 5 and day 10 after de beginning of the compression protocol with magnets in control and diabetic groups, and at the closure day (day 19 for control group, day 23 for diabetic group). Arrows indicate head of keratinocyte tongue; stars indicate necrotic areas; squares with numbers indicate zoomed areas shown below. B/ Zoomed areas of the large immunostaining skin sections, with unmerge signals for RAMP1, CLR and DAPI. Dotted lines indicate separation between epidermis (e) and underlying tissue.

Figure 6. RAMP1, CLR and RCP protein expression during PU healing

A/ Western blot of skin protein extracts against RAMP1, CLR and RCP during PU healing of control and diabetic mice. Expected molecular weight are 18 kDa for RAMP1, but a lower (16 kDa) and higher (65 kDa) molecular weight RAMP1-immunoreactive bands were observed during healing in diabetic skin extracts; 37 kDa for unglycosylated CLR form, and 45-55 kDa for glycosylated CLR forms. B/ RCP, C/ 18 kDa-RAMP1, D/ total CLR and E/ 45-55 kDa glycosylated forms of CLR relative protein expression during PU healing with normalization of western blot signals by total protein on Ponceau Red staining (Supplementary Fig. 1) of control (circle) and diabetic (square, dotted line) groups. Closure day for control group is day 19, whereas it is day 23 for diabetic group. Mean \pm SD of $n = 3$ mice per group and time point. Two-way ANOVA, diabetic versus control at the same time point is indicated closed to lines; upper brackets represent comparison between time points for control mice; lower dotted brackets represent comparison between time points for diabetic mice. * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$; *** $p > 0.001$; ns, non-significant.

Figure 7. Immunoprecipitation of RCP partners to identify presence of mature CGRP complex receptor.

On the left, representative western blot of skin protein extracts after immunoprecipitation (IP) with anti-RCP antibody of control and diabetic mice during PU healing. $n = 3$ mice per group and time point, with the same initial skin protein amount used to make the IP. On the right, negative and positive controls used to validate rabbit anti-RCP antibody for immunoprecipitation.

FIGURES

Figure 1

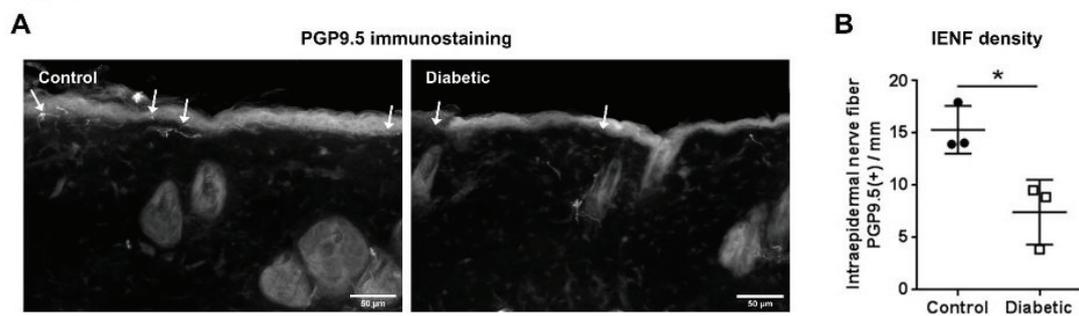


Figure 2

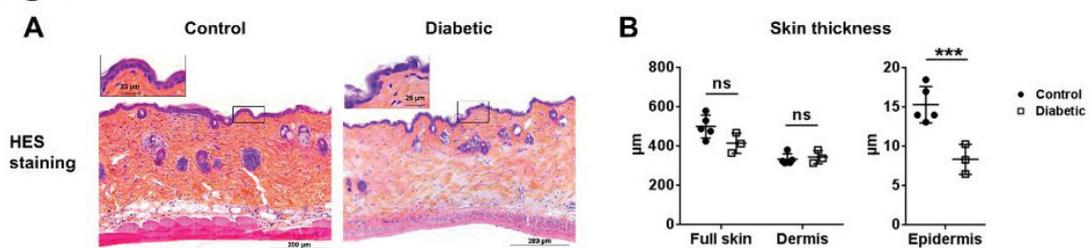


Figure 3

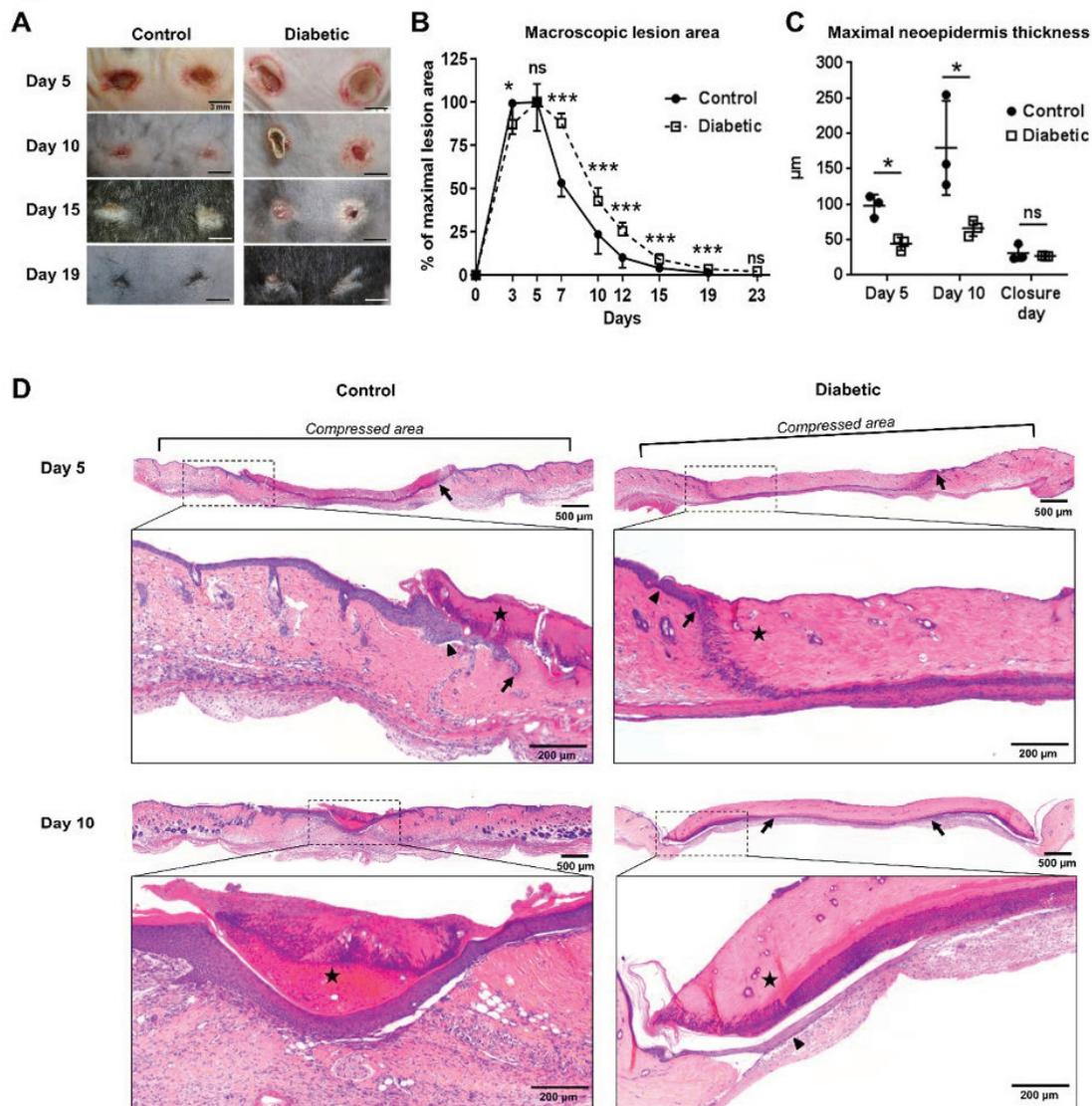


Figure 4

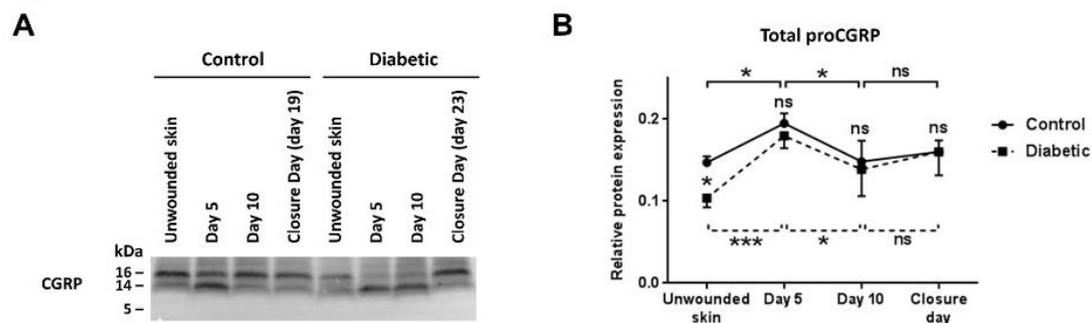


Figure 5

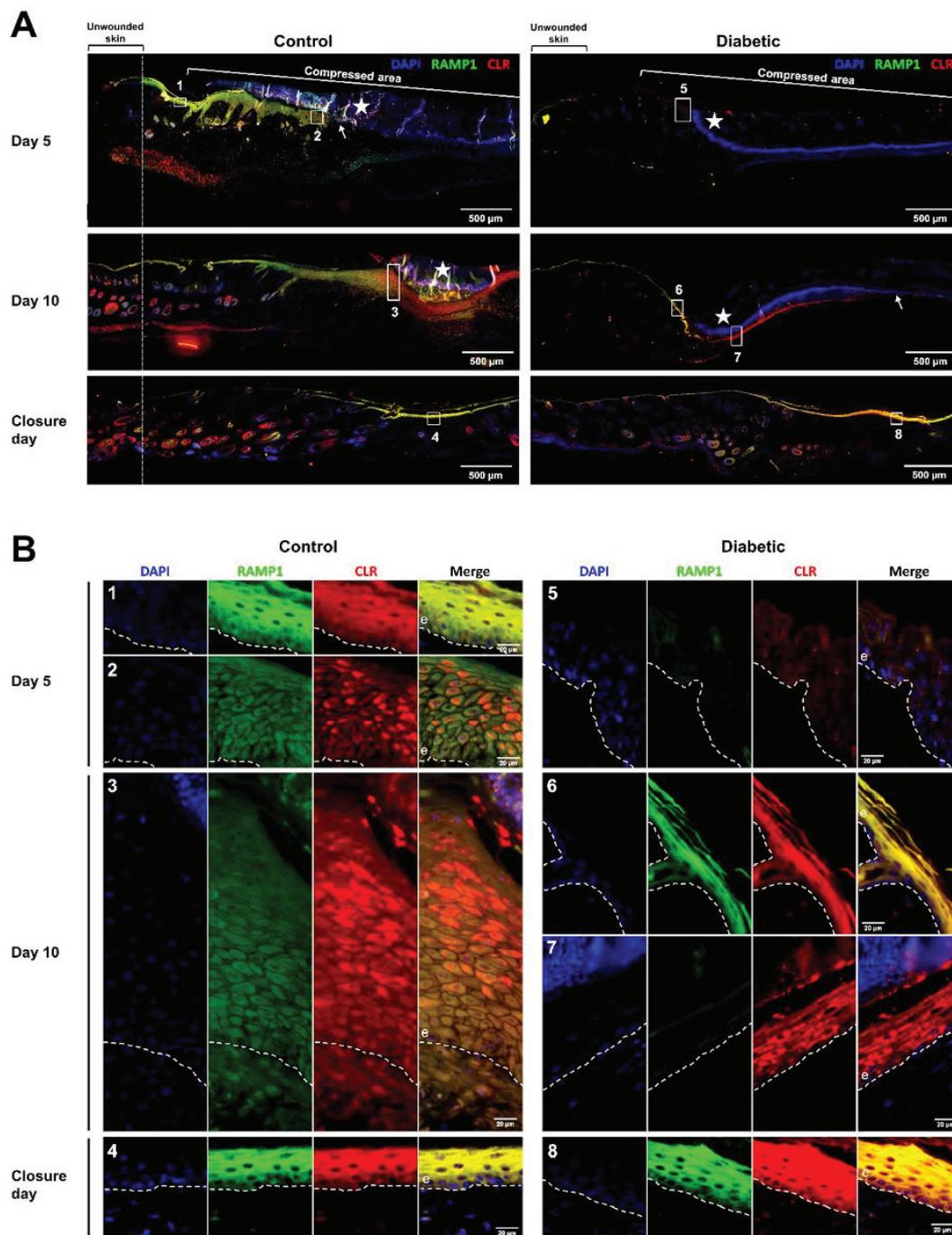


Figure 6

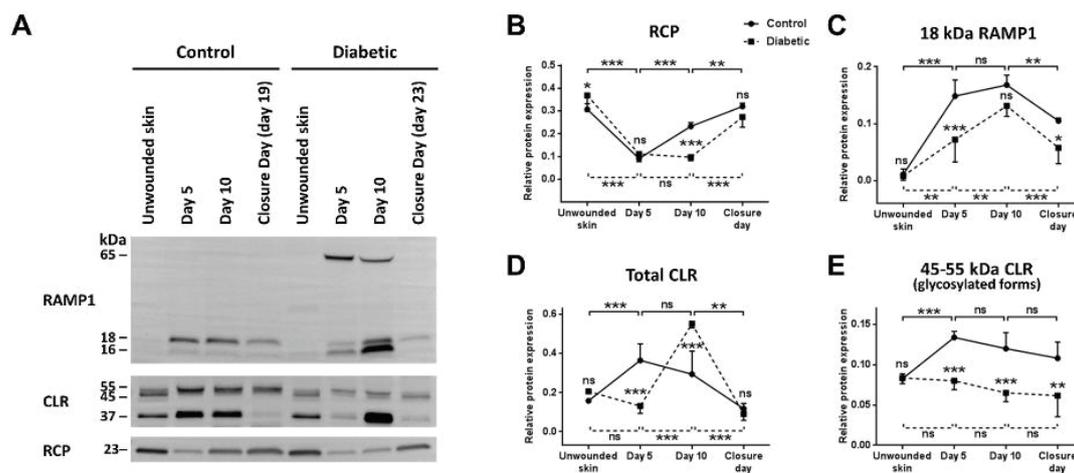
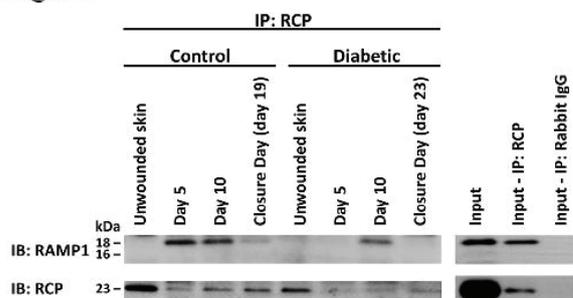


Figure 7



SUPPLEMENTAL DATA

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Real-time quantitative RT-PCR

Skin samples were immersed in RNAlater solution immediately after recover and kept at -80°C until RNA extraction. Total RNAs were isolated using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), followed by reverse transcription with PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France). Quantitative detection of mRNA transcripts was carried out by real-time PCR with SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara). Relative quantities of MMP9, MMP10 and MMP13 mRNA were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with B2M and RPL13A levels as the endogenous controls. Primers were purchased from Qiagen with QT00108815, QT00115521, QT00111104, QT01149547, and QT00267197 references, respectively.

Western blot with different reducing conditions.

Pool of skin protein extracts from unwounded or day 5-wounded skin from 3 diabetic or 3 control mice were treated as previously described but with 0, 15 or 100 mM of DTT.

RESULTS

Western blot against RAMP1 of skin samples treated with higher reducing condition had no effect on 65 and 16 kDa-immunopositive bands visible only in diabetic wounded skin (Supplementary Fig. 2). In unreduced condition, no band at 65 or 16 kDa was observed, however, high molecular weight RAMP1-immunopositive bands were present in wounded skin for control and diabetic skin around 150 and 160 kDa respectively.

Gene expression of MMP-9 and -10 in unwounded skin were not different between control and diabetic mice (Supplementary Fig. 3A and B). During PU healing in control and diabetic mice, both MMP-9 and -10 gene expressions greatly increased with a peak at day 5 followed by a gradual decrease until closure day, however diabetic mice gene expressions were greatly higher compared to control mice at day 5 and 10.

MMP-13 gene expression was lower in diabetic than control mice unwounded skin (Supplementary Fig. 3C). At day 5 of wound healing, both control and diabetic mice showed considerable rise in MMP-13 gene expression. Then control mice MMP-13 gene expression gradually decreased until closure day, whereas diabetic mice gene expression remains at the same level between day 5 and 10, before to dramatically decreased at closure day.

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGEND

Supplementary Figure 1. Ponceau Red staining of protein for normalization of western-blot signal.

Representative Ponceau red staining of membrane used for western-blot of control and diabetic mice during PU healing. The total amount of protein per line evaluated by Ponceau red was used to normalize protein expression detected by western-blot.

Supplementary Figure 2. RAMP1 protein signal in different reducing conditions of unwounded and day 5-wounded skin in control and diabetic mice.

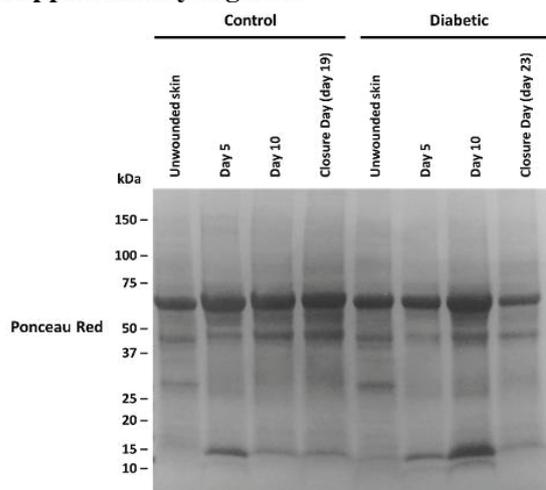
Western blot against RAMP1 of skin protein extracts were treated with different concentrations of DTT. Ctrl, control; Db, diabetic; Unwo.skin, unwounded skin.

Supplementary Figure 3. MMP-9, 10 and 13 gene expressions during PU healing

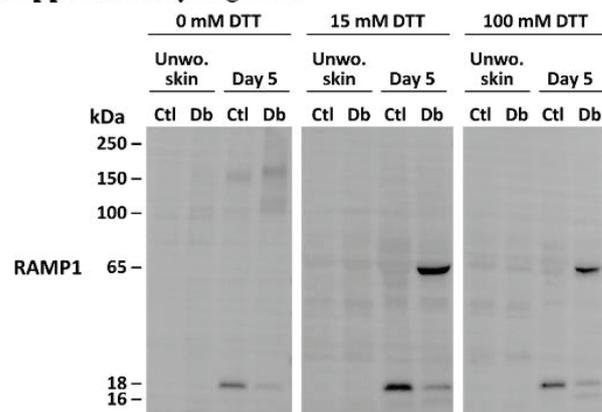
Gene expressions of MMP-9, 10 and 13 in skin extracts during PU healing of control and diabetic mice normalized by B2M and RPL13A gene expressions, and expressed relatively to control mice unwounded skin MMPs gene expression. Control and diabetic mice groups are represented in black and hatched bars, respectively. Closure day for control group is day 19, whereas it is day 23 for diabetic group. Mean \pm SD of 3 mice per group and time point. Multiple t-test of diabetic versus control at each time point. * $p > 0.05$; ns, non-significant.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

