



HAL
open science

Pathophysiologie des escarres dans le muscle squelettique

Marion Le Gall

► **To cite this version:**

Marion Le Gall. Pathophysiologie des escarres dans le muscle squelettique. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT058 . tel-02955996

HAL Id: tel-02955996

<https://theses.hal.science/tel-02955996>

Submitted on 2 Oct 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physiologie

École doctorale CBS2

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche PhyMedExp – INSERM U1046 – CNRS UMR 9214

Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles

PATHOPHYSIOLOGIE DES ESCARRES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

Présentée par Marion LE GALL

Le 20 novembre 2018

Sous la direction de M. Alain LACAMPAGNE et M. Luc TÉOT

Devant le jury composé de

Mme Bérengère FROMY, DR, LBTI, CNRS, Université de Lyon 1	Rapporteur
M. Georges LEFTHÉRIOTIS, PU-PH, CHU de Nice	Rapporteur
Mme Christelle BONOD-BIDAUD, MC, LBTI, CNRS, Université de Lyon 1	Examineur
M. Eric AGDEPPA, PhD, Hill-Rom	Examineur
M. Stefan MATECKI, PU-PH, PhyMedExp, Université de Montpellier	Président du jury
M. Luc TEOT, MD, CHU de Montpellier	Directeur de thèse
M. Alain LACAMPAGNE, DR, PhyMedExp, Université de Montpellier	Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

« Quand il me semble que rien ne marche, je vais voir le tailleur de pierres et je le regarde frapper cent fois sur son bloc sans qu'apparaisse la moindre fissure. A la cent et unième fois, le bloc se fend en deux, et je sais que ce n'est pas l'effet de ce dernier coup, mais l'effet conjugué des coups qui l'ont précédé. »

Jacob Riis

“For me, I am driven by two main philosophies: know more today about the world than I knew yesterday and lessen the suffering of others. You'd be surprised how far that gets you.”

Neil deGrasse Tyson

Table des matières

Table des matières.....	1
Communications scientifiques.....	3
Liste des abréviations	4
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	8
Préambule.....	9
Les supports de prévention et de traitement des escarres.....	14
REVUE DE LA LITTERATURE	20
Chapitre 1 : Mécanismes physiopathologiques à l’origine des escarres dans le tissu musculaire	21
Implication du tissu musculaire.....	21
Déformation mécanique	23
Augmentation de pression du flux lymphatique	28
Ischémie	33
Ischémie-reperfusion	37
Couplage excitation-contraction	41
Résumé chapitre 1.....	47
Chapitre 2 : Interactions avec le tissu cutané et altérations systémiques	48
Tissu cutané.....	48
Biomarqueurs systémiques et locaux.....	53
Résumé chapitre 2.....	60
Chapitre 3 : Cas particuliers de la paraplégie, du diabète et de la cicatrisation	61
Paraplégie : un état basal à haut risque	61
Diabète	65
Cicatrisation.....	67
Résumé chapitre 3.....	72
Objectifs de la thèse.....	73
MATERIELS ET METHODES	74
Modèles humains	75
Etude clinique sur l’étiologie des escarres NCT0242046.....	75
Etude clinique pression d’interface et micro-vascularisation NCT 03114245.....	78
Sérothèque biomarqueurs d’escarres.....	81

Modèles animaux	83
Escarres expérimentales.....	83
Cicatrisation chronique	86
Cicatrisation aiguë	89
Etudes des propriétés physiologiques.....	92
Préparation des microsomes.....	92
Technique d'enregistrement électrophysiologique de bilayer – bicouche lipidique plane	93
Respiration mitochondriale – utilisation de l'oxygraphe Oroboros	94
Analyses biologiques	96
Isolement des fractions mitochondriale et cytosolique	96
Western blot.....	97
Oxyblot	99
Immunoprécipitation du RyR1	100
Dosage Milliplex	101
Dosage ELISA	102
Analyses histologiques.....	103
Inclusion et coupe en paraffine.....	103
Coloration Hématoxyline, éosine sur soupes en paraffine	104
Conservation et coupe au cryostat.....	105
Coloration trichrome de Masson pour cryosections	106
Immunofluorescence.....	107
Analyses statistiques	108
RESULTATS	109
Etude 1 : RyR1, un nouvel acteur d'escarre	110
Etude 2 : L'alitement prolongé chez les paraplégiques induit la dissociation de la calstabin1 du RyR	141
Etude 3 : Le graphène pour booster la cicatrisation.....	162
DISCUSSION	180
BIBLIOGRAPHIE.....	190

Communications scientifiques

PUBLICATIONS

Akodad M, Fauconnier J, Sicard P, Huet F, Blandel F, Bourret A, de Santa Barbara P, Aguilhon S, **Le Gall M**, Huggon G, Lacampagne A, Roubille F, Interest of colchicine in the treatment of acute myocardial infarct responsible for heart failure in a mouse model, *Int J Cardiol*, 2017.

Le Gall M, Matecki S, Agdeppa E, Lacampagne A, Téot L, Les supports de prévention et de traitement des escarres, *Journal francophone de Cicatrisation*, 2017.

Kaikenger P, Duvert JB, Pirio C, **Le Gall M**, Flocard T, Deguignet P, Di Francesco N. Pressure Sensing and Adjusting Footwear. Patent 62/337,646. 17 May, 2016.

PRESENTATIONS

Le Gall M, Matecki S, Agdeppa E, Téot L, Lacampagne A, Early pathways of muscle damage in mouse pressure ulcer model using low pressure intensity, Poster, 4th EPUAP Focus Meeting, 21-23 May, Turku (Finland), 2018. **Prix du meilleur poster**

Le Gall M, Bernardin A, Souidi M, Meli AC, Matecki S, Agdeppa E, Téot L, Lacampagne A, Early pathways of muscle damage in mouse pressure ulcer model using low pressure intensity, Poster & flash talk, CBS² Day, 31 May, Montpellier (France), 2018.

Baume M, **Le Gall M**, Supports Thérapeutiques, Oral communication, Journées de Cicatrisation, 21-23 January, Paris (France), 2018.

Le Gall M, Matecki S, Agdeppa E, Lacampagne A, Téot L, The influence of pressure on microvascularization in paraplegic patients, Oral communication, Updates in Wound Technology (UWT), 15-17 January, Paris (France), 2017.

Le Gall M, Lacampagne A, Téot L, Matecki S, Trial C, Quantifying the pressure thresholds for tissue injury in paraplegic patients, Poster, CBS² Day, Montpellier (France), 27 May, 2015.

Le Gall M, Matecki S, Agdeppa E, Lacampagne A, Téot L, How to measure oxygen in the periwound skin? Oral communication, 8th International Workshop of Wound Technology, 18-20 January, Paris (France), 2015.

Liste des abréviations

ATP	Adénosine tri phosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
bFGF	Basic fibroblast growth factor
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CEC	Couplage excitation-contraction
CK	Creatine kinase
CRP	Creatine reactive protein
DTI	Escarre profonde (Deep tissue injury)
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
GGH	Glucosyl-galactosyl hydroxylisine
GH	Galactosyl hydroxylisine
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H-FABP	Heart fatty acid binding protein
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
I/R ou IR	Ischémie reperfusion
IF	Immunofluorescence
IFN- α	Cytokine interferon alpha
IL-1 β	Interleukine 1 beta
IP	Immunoprécipitation
IP-10	Chemokine interferon gamma induced protein 10
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KDR	Kinase insert domain-containing receptor
LDH	Lactate déshydrogénase
MAPK	Mitogene activated protein
Mb	Myoglobine
mmHg	millimètre de Mercure, unité internationale (1mmHg = 0,133 kPa)
MMP-9	Métalloprotéinase 9
NAD	Nicotamide adénosine dinucléotide

NCE	Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NPUAP	Société savante mondiale experte dans les escarres (national pressure ulcer advisory panel)
OH^-	Radical hydroxyde
PKA	Protein kinase A
PI-3K	Phosphatidylinositol 3' kinase
PIV	Pressure induced vasodilatation
$p\text{O}_2$	Pression partielle en oxygène
PU	Escarre (Pressure Ulcer)
rHb	Quantité d'hémoglobine
ROS	Espèces réactives oxygénées
RS	Réticulum sarcoplasmique
RyR	Récepteur de la Ryanodine
SCI	Blessé médullaire (Spinal cord injury)
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase
SO_2	Saturation en oxygène
TIMP-1/2	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1/2
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth Factor

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation des contraintes mécaniques. D'après Schelkanova et al, 2015	9
Figure 2 : Prévalence des escarres dans le monde d'après les données du tableau 2	12
Figure 3 : Algorithme de traitement des escarres d'après Bhattacharya et Mishra, 2015.....	19
Figure 4 : Exemple de cas clinique d'une escarre profonde du sacrum, D'après NPUAP.....	21
Figure 5 : Schématisation des expériences de modélisation des contraintes mécaniques d'un volontaire sain. D'après Linder-Ganz et al, 2007, 2008	22
Figure 6 : Exemple de cas clinique d'une escarre liée à l'utilisation d'un dispositif médical sur le visage d'un nouveau-né. D'après Brill, 2014.....	23
Figure 7 : Architecture de la bicouche lipidique et du cytosquelette, ©Marianna Ruiz, édité par Alokprasad84.....	24
Figure 8 : Images IRM T2 d'un muscle jambier de rat (A) avant indentation, (B) pendant l'indentation avec le piston, (C) après indentation. La zone à hyper signal T2 en (C) correspond à la région anatomique présentant le plus de lésions cellulaires. D'après Stekelenburg et al, 2006.....	25
Figure 9 : Cascade des 3 grandes familles de la voie MAPK, du stimulus initial à la réponse cellulaire. D'après Cowan et Storey, 2003	26
Figure 10 : Cascade d'évènements entraînant des lésions musculaires à partir d'une déformation mécanique des cellules	27
Figure 11 : Structure des vaisseaux collecteurs du réseau lymphatique et des lymphagions en conditions normale et pathologique. D'après Al-Kofahi et al, 2017.	29
Figure 12 : Images de spectroscopie proche infrarouge (NIRS) du fluorochrome Indocyanine green de bras compressés à 0 mmHg (A) et 60 mmHg (B,C) pendant 45 min. Variation de drainage lors de la compression. D'après Gray, Voegeli et Bader, 2016.....	30
Figure 13 : Variation du flux lymphatique sur un muscle jambier de chien soumis à une pression croissante. D'après Miller et Seale, 1981.....	31
Figure 14 : Cascade possible d'évènements entraînant le développement d'une escarre. D'après Reddy, 1990.....	32
Figure 15 : Exemple de cas clinique, image IRM de myonécrose. D'après Linder-Ganz et al, 2009.....	33
Figure 16 : Cascade des évènements moléculaires de l'ischémie à la lésion tissulaire. D'après Rubin, 2008.....	35
Figure 17 : Cascade d'évènements après une ischémie entraînant des lésions musculaires.....	36
Figure 18 : Exemple de cas clinique d'une escarre ischiatique chez un patient paraplégique	37

Figure 19 : Schématisation de différents mécanismes cellulaires impliqués dans le phénomène de « no-reflow ». D'après Reffelmann et Kloner, 2002.....	37
Figure 20 : Schématisation des échanges ioniques dans la cellule en ischémie et IR. D'après Piper et al, 2003. NCE = échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	38
Figure 21 : Variation calcique intracellulaire durant les phases d'ischémie et reperfusion. D'après Piper et al, 2004. NCE = échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	39
Figure 22 : Cascade d'évènements après ischémie/reperfusion dans le tissu musculaire	40
Figure 23 : Cercle vicieux de dérégulation de l'homéostasie calcique. D'après Gissel, 2005	42
Figure 24 : Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique, représentation des différents mécanismes. D'après MacIntosh et al, 2012.....	45
Figure 25 : Schématisation du couplage excitation contraction en situation physiologique et en situation de stress. D'après Bellinger, Mongillo et Marks, 2008.....	46
Figure 26 : Exemple de cas Clinique d'une escarre talonnière de stade 3 ©Gordian Medical, Inc. dba American Medical Technologies	48
Figure 27 : Structure du tissu cutané ©2004 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cumming	49
Figure 28 : Surface du derme papillaire sur une escarre de stade 2 au sacrum chez une patiente de 84 ans. H : zone saine, B : zone limitrophe, D : zone de l'escarre. X100. D'après Hasigawa et Shimada, 2005	51
Figure 29 : Variations de la pression interne en fonction de la distance latérale par rapport à la proéminence osseuse. a) variation de la profondeur (distance ventrale) par rapport à la proéminence osseuse ; b) variation de l'intensité de la contrainte mécanique externe exercée.	52
Figure 30 : Relations linéaires entre la variation de concentration de lactate de volontaires sains et a) la pression externe exercée sur la peau et b) le pourcentage de réduction de la pression transcutanée en dioxygène. D'après Bader et al, 2005.....	58
Figure 31 : Synthèse des variations de biomarqueurs présents dans la sueur après application d'une pression externe sur une peau humaine.....	59
Figure 32 : Colonne vertébrale ©2015 Anatomy and Physiology Notes	61
Figure 33 : Cascade non-exhaustive de voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire. D'après Fanzani et al, 2012	63
Figure 34 : Modèle de fuite calcique du RyR1 et de dysfonction mitochondriale dans le tissu musculaire squelettique âgé. Hypothétiquement, cette condition correspond aux muscles squelettiques de patients paraplégiques. D'après Andersson et al, 2011.....	64
Figure 35 : Exemple de cas clinique d'un ulcère de pied diabétique. D'après Edmonds et Foster, 2006	65

Figure 36 : Voies de signalisation impliquées dans l'augmentation du calcium intracellulaire suite à l'entrée d'insuline dans la cellule musculaire squelettique. D'après Contreras-Ferrat et al, 2014	66
Figure 37 : Schéma de l'évolution des phases de cicatrisation normale dans le temps. D'après Rounier et al, 2001	67
Figure 38 : Phases de cicatrisation normale. D'après Eming et al, 2016	68
Figure 39 : Schématisation de a) la zone à inciser pour implantation de l'aimant ; b) le montage papier + aimants, d'après Hasmitot et al., 2008 ; c) la vérification de l'intensité de pression ; d) les zones musculaires d'intérêt à prélever.	84
Figure 40 : Photo de la zone comprimée, injectée avec du Bleu Evans 1% a) au retrait de l'aimant externe ; b) 2 heures après le retrait. Le cercle en pointillés représente l'aimant externe pendant les 2h de compression	86
Figure 41 : Schéma bilan étude 1	111
Figure 42 : Schéma bilan étude 2	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des escarres d'après NPUAP	11
Tableau 2 : Données mondiales sur la prévalence des escarres.....	13
Tableau 3 : Durée critique d'ischémie des différents tissus. D'après Steinau, 1988	34
Tableau 4 : Systèmes de régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire ON/OFF	43
Tableau 5 : Caractéristiques de 19 études cliniques sur les biomarqueurs. Abréviations : n/a : non applicable ; s-urine : urine synthétique ; reperf : reperfusion ; post-contr : post contrainte mécanique ; color : colorimétrique sinon se référer à la liste des abréviations.....	57
Tableau 6 : Différentes phases de cicatrisation normale.....	69

Préambule

L'escarre est définie comme une lésion ischémique liée à une compression qui peut être associée ou non à un cisaillement (**figure 1**). Ces plaies se développent en regard de proéminences osseuses, au niveau de la peau et des tissus sous-jacents. En clinique, on distingue 2 catégories de plaies :

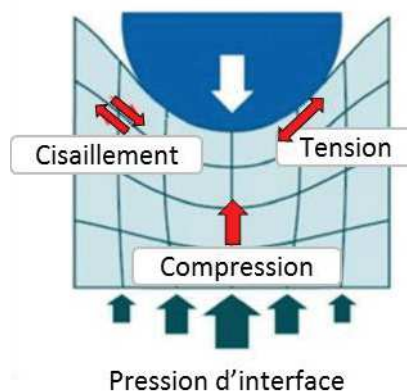
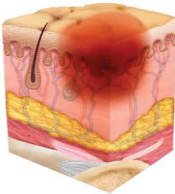

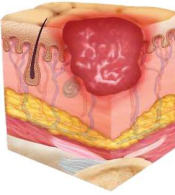

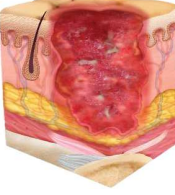



Figure 1 : Schématisation des contraintes mécaniques. D'après Schelkanova et al, 2015

- les **escarres superficielles** touchent les tissus cutanés et résultent majoritairement de contrainte de friction et de macération. Ces escarres sont souvent de stade 1 ou 2 (**tableau 1**). Elles sont plus difficiles à repérer (notamment chez la personne de couleur) et sont parfois confondues avec d'autres pathologies comme la dermite associée à l'incontinence. Elles peuvent être douloureuses pour le patient. Les traitements sont essentiellement réalisés avec des pansements spécifiques en fonction de l'état de la plaie.
- les **escarres profondes** sont liées à une atteinte musculaire initiale. Ces plaies sont les plus graves, catégorisées de stade 3, 4 ou inclassables (**tableau 1**). Elles se caractérisent par une perte complète de l'épaisseur cutanée avec une atteinte des tissus adipeux et/ou musculaires et osseux. Dans certains cas, un capot fibreux ou nécrotique empêche l'évaluation de l'atteinte des tissus. Ces plaies sont longues à traiter, requièrent des pansements complexes, à réévaluer avec la cicatrisation de la plaie. Une antibiothérapie peut être prescrite car ces plaies engendrent une infection des tissus mous. Dans le cas de plaies avec retard de cicatrisation, plusieurs temps chirurgicaux sont nécessaires pour nettoyer la plaie puis combler la perte tissulaire et fermer l'orifice. Ces plaies peuvent avoir des répercussions graves sur l'état de santé des patients avec un risque majoré d'infections, de chocs septiques, d'amputations et une atteinte du pronostic vital si ces comorbidités ne sont pas prises à temps.

Stade	Description clinique	Schéma	Photo
Stade 1	Erythème cutané. Altération visuelle d'une peau intacte. La température de la peau, la consistance et la sensibilité du tissu peuvent être modifiées. Dans la majorité des cas, il existe une rougeur locale qui ne blanchit pas quand on la presse du doigt.		
Stade 2	Phlyctène. Elle peut être sèche ou humide. Diminution de l'épaisseur de l'épiderme et/ou du derme. L'escarre est superficielle et se présente comme une abrasion, une ulcération peu profonde.		
Stade 3	Perte de toute l'épaisseur de la peau avec altération ou nécrose du tissu sous-cutané (qui peut s'étendre jusqu'au fascia). Ulcération profonde avec ou sans envahissement des tissus adjacents.		

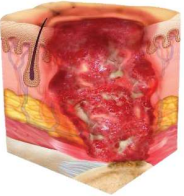

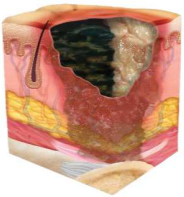

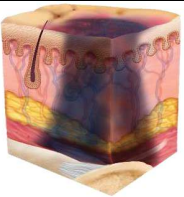

Stade 4	<p>Perte de toute l'épaisseur de la peau avec destruction importante des tissus sous-jacents. Atteinte des muscles, des os ou des structures de soutien. Les fistules peuvent être envahies.</p>		
Inclassable	<p>Perte non visible de toute l'épaisseur de la peau avec destruction importante des tissus sous-jacents. L'atteinte des tissus profonds ne peut pas être correctement évaluée à cause de la présence d'écoulements, de fibrine et/ou de tissus nécrosés (stade 3 ou 4).</p>		
<p>Escarres profondes Deep Tissue Injury (DTI)</p>	<p>Décoloration pourpre, brune ou rouge sombre ne blanchissant pas. La peau est généralement intacte mais les tissus sous-jacents sont déjà sévèrement lésés. L'escarre évoluera en stade 3, 4 ou inclassable.</p>		

Tableau 1 : Classification des escarres d'après NPUAP

L'incidence ou le nombre de nouveaux cas sur une cohorte varie en fonction des régions du monde (**figure 2**). La prévalence ou le nombre de cas répertoriés (nouvelles escarres ou escarres anciennes) sur une cohorte est très variable selon la population de patients étudiée. Aussi en fonction des structures d'accueil et de l'état de santé du patient on distingue (VanGilder et al., 2017):

- Urgences : 8,8%
- Soins prolongés : 11,3%
- Centre de rééducation et maison de repos : 11,0%
- Centre de soins spécialisés : 28,8%

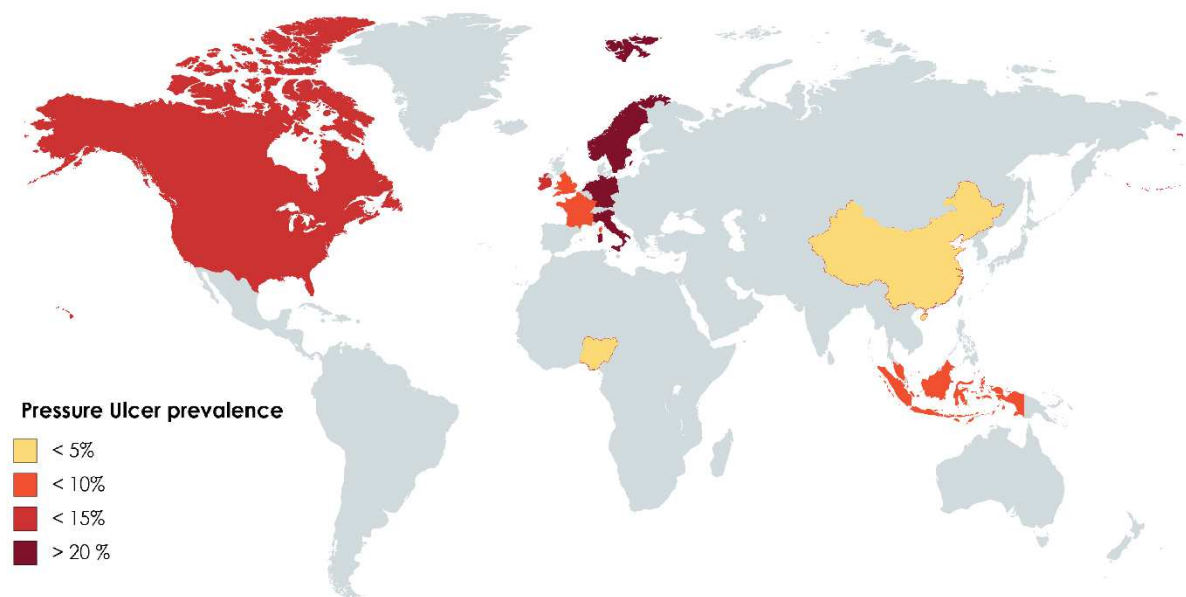


Figure 2 : Prévalence des escarres dans le monde d'après les données du tableau 2

Pays	Prévalence (%)	Taille cohorte (nombre de patients)	Référence
Etats Unis / Canada	15	>85 000	(VanGilder et al., 2017)
Nigeria	3,2 – stade 1 non pris en compte	1 211	(Adegoke et al., 2013)
Chine	1,58 – stade 1 non pris en compte	39 952	(Jiang et al., 2014b)
Indonésie	8	1 132	(Amir et al., 2017)
France	8,9	37 307	(Barrois et al., 2008)
Suède	23	695	(Gunningberg, 2004)
Allemagne	21	21 574	(Lahmann et al., 2006)
Pays de Galles	8,9	8 365	(Clark et al., 2017)
Angleterre	7,1	2 239	(Smith et al., 2016)
Norvège	54	59	(Moore et al., 2015)
Irlande	12	121	
Pays Bas	24,2	NK	(Meesterberends et al., 2010)
Italie	23	NK	

Tableau 2 : Données mondiales sur la prévalence des escarres

On considère que **80% des escarres peuvent être évitées** aussi la prévention des escarres est aujourd'hui une problématique de santé mondiale. Cette prévention passe par :

- une **identification des patients à risque** grâce à l'utilisation de plusieurs échelles (Norton, Bradford et Waterlow étant les plus connues),
- une **mobilisation régulière des points d'appui** du patient (toutes les 2 à 3 heures, 24/24h),
- l'utilisation de **supports thérapeutiques** adaptés dont vous trouverez une revue ci-après.

Les supports de prévention et de traitement des escarres

La prévention et le traitement des escarres passe par l'utilisation de supports de redistribution des pressions pour décharger ou augmenter la surface d'appui et diminuer l'intensité des pressions. Le choix du support dépend de la mobilité et du risque d'escarre du patient. Des recommandations existent pour aider au choix de la catégorie de support, mais les études cliniques manquent pour appuyer scientifiquement l'utilisation d'un support plutôt qu'un autre.

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

Mots clés - escarre ; lit ; prévention ; support ; surface

Support surfaces to prevent and treat pressure ulcers. To prevent and treat pressure ulcer, support surfaces are used to distribute the pressure to unload or increase the surface (between the patient body and the support) and decrease pressure intensity. Patient mobility and pressure ulcer risk assessment influence the support surface's choice. Guidelines help to choose between the support surface's categories but there is a lack of clinical trials to have strong scientific evidence promoting the use of a support surface over another.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved

Keywords - bed; mattress; pressure ulcer; prevention; support surface

L'escarre est une lésion localisée de la peau et/ou des tissus sous-jacents, située en regard d'une saillie osseuse. Elle résulte d'un phénomène d'écrasement tissulaire par pression (avec ou sans cisaillement) de forte intensité ou continue pendant une longue durée. La macération locale, la dénutrition, l'hypovascularisation et les comorbidités du patient conditionnent la réponse des tissus mous face à une contrainte en pression et en cisaillement [1].

En France, la dernière enquête nationale de prévalence (ENP) des escarres réalisée par l'association PERSE (Prévention, Éducation, Recherche et Soins Escarres) rapporte une incidence de 8,1 % et une prévalence variant entre 1,1 % et 22,8 % en fonction des services interrogés [2]. La prévention est réalisée grâce à des supports définis comme des dispositifs de redistribution des pressions. Ils sont conçus pour gérer les contraintes mécaniques appliquées sur les tissus, le microclimat et/ou d'autres fonctions thérapeutiques (matelas, plate-forme avec lit et matelas intégré, sur-matelas, coussins d'assise) [3].

En complément d'un protocole de mobilisation régulière des points d'appui du patient, ces dispositifs réduisent l'intensité de pressions au niveau des zones à risque d'escarre et participent au sauvetage tissulaire. Les supports actuellement commercialisés facilitent les soins (réglage de la hauteur du lit, mode spécial pour les soins et la toilette). Ils sont ergonomiques et sécurisants

pour le patient afin d'assurer un confort optimal tout en maintenant leurs fonctions thérapeutiques.

♦ **Les recommandations sur le choix de support** émises par la *US National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP), l'*European Pressure Ulcer Advisory Panel* (EPUAP) et la *Pan Pacific Pressure Injury Alliance* (PPPIA) sont majoritairement basées sur l'avis d'experts (22 recommandations sur 26) [4]. Les études cliniques randomisées sont éparées et leur méthodologie ne permet pas toujours de préconiser l'utilisation d'un support plutôt qu'un autre, ce qui rend le choix difficile face au large portfolio proposé.

♦ **Le choix du support doit être adapté au degré de perte de mobilité du patient**, elle-même liée au risque de développement d'escarres. Pour un patient mobile à faible risque, il est recommandé d'utiliser des matelas en mousse ou même des matelas standards hospitaliers. Si le patient est peu mobile ou immobile, il est indispensable, en plus d'une mobilisation régulière, de diminuer l'intensité des points de pression entre son corps et le support.

♦ **Deux méthodes de redistribution de pression** peuvent être utilisées :

- **la décharge totale de la zone d'appui** consiste à déplacer toutes les contraintes mécaniques sur une autre surface anatomique. En cas d'escarre ou de suspicion de dommages tissulaires profonds (*Deep Tissue Injury* — DTI), la zone lésée doit être

Marion LE GALL^{a,*}
Doctorante

Stefan MATECKI^a
Professeur hospitalo-universitaire, physiologie clinique

Éric AGDEPPA^b
Directeur exécutif de l'innovation

Alain LACAMPAGNE^a
Directeur de recherche CNRS

Luc TEOT^c
Chirurgien, chirurgie plastique et reconstructrice

^aInserm U1046, CNRS UMR-9214, université de Montpellier, CHU Lapeyronie, Montpellier, France

^bHill-Rom, Batesville, Indiana, États-Unis

^cDépartement médico-chirurgical Plaies et cicatrisation, brûlés, chirurgie plastique et reconstructrice, CHU Lapeyronie, 191, avenue du Doyen-Gaston-Giraud, 34090 Montpellier, France

*Auteur correspondant.
Adresse e-mail : marion.le-gall@inserm.fr (M. Le Gall).

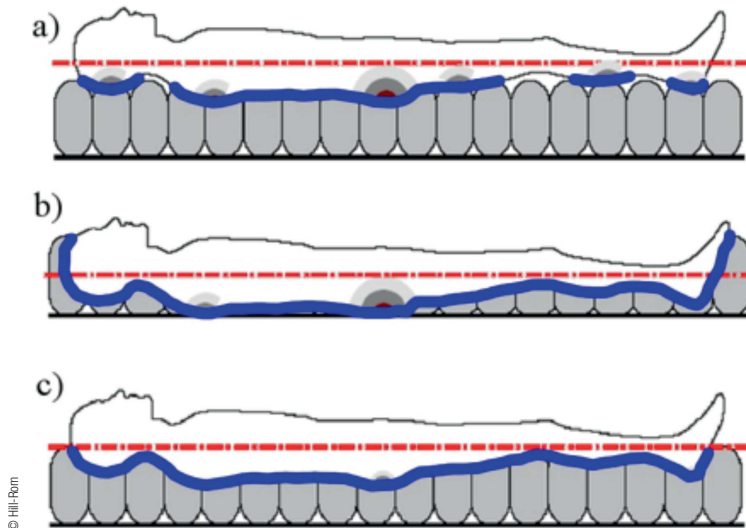


Figure 1 (a, b, c). Immersion et enveloppement en fonction du gabarit du patient. a. Le support n'assure pas un enveloppement optimal et l'immersion est trop faible, les pressions sont mal réparties ; b. L'immersion est trop importante, le patient touche le plan dur sous le support et les tissus mous sont lésés au niveau des points de contact ; c. Le support permet un enveloppement et une immersion optimale du patient et une répartition homogène des pressions sur l'ensemble du corps. Le support est alors parfaitement adapté au patient.

totale déchargée : en adaptant la position du patient (décubitus ventral, latéral, position de Fowler) ou en utilisant des supports (bottes de décharge ou dégonflement partiel d'une cellule d'air sur le matelas pour une escarre talonnière). Cette méthode préserve les tissus mais ne peut pas être utilisée systématiquement. Le déplacement de pressions d'intensité élevée peut créer un cisaillement et/ou induire une nouvelle escarre ;

- **la répartition des pressions** augmente la surface d'appui du patient afin de diminuer les intensités de pression et passer sous le seuil minimal de lésion (32 mmHg). L'enveloppement du support autour du patient est la capacité du matelas à épouser la forme de ce dernier (en bleu sur la figure 1). L'immersion est la profondeur à laquelle le patient s'enfonce dans le support. Le support idéal permet un enveloppement maximal afin d'augmenter la surface d'appui ; l'immersion est déterminée par l'épaisseur du support pour éviter que le patient ne soit en contact direct avec un plan dur (comme montré dans la figure 1b).

En fonction du patient (sa masse, sa morphologie), la même technologie peut donner des résultats différents. Aujourd'hui, aucun support "miracle" n'assure une prévention parfaite pour tous les patients.

♦ **Cette revue a pour but de lister les différents types de supports anti-escarres** actuellement disponibles sur le marché et d'en décrire les principales fonctionnalités, afin d'offrir une vue d'ensemble des

portfolios fournisseurs. Les indications qui vont aider le praticien dans le choix du support adapté à son patient seront discutées en s'appuyant sur une revue de la littérature.

Description des supports disponibles aujourd'hui

Deux catégories sont actuellement disponibles : les supports de prévention (passifs ou actifs) et ceux qui participent à la prise en charge d'une escarre existante. Par définition, ces derniers sont également utilisables pour la prévention d'escarres supplémentaires liées à l'immobilisation.

Historiquement, les supports ont été classés en fonction de leur mode de fonctionnement (statique ou dynamique) et des matériaux qui les composent. Les supports statiques conservent leurs caractéristiques physiques dans le temps contrairement aux matelas dynamiques qui vont les modifier (pression dans les cellules d'air, flux d'air pour gérer le micro-climat cutané, etc.). Ces supports sont généralement motorisés et nécessitent une source d'alimentation. Aujourd'hui, les supports sont classés selon leur niveau de technologie embarquée [5-7].

Les supports simples CLP (*continuous low pressure*) dits "low-tech"

Cette gamme de produits répartit des pressions sur la plus grande surface possible afin d'éviter les pics de pression. Ces supports sont soit des matelas, surmatelas, coussins ou plaques de protection, utilisés au bloc opératoire :

- supports en mousse standard ;
- supports en mousse polyuréthane haute densité (HD) et support à mémoire de forme. Les supports en mousse de polyuréthane peuvent être composés de mousses de différentes densités en fonction des zones anatomiques pour optimiser l'enveloppement et l'immersion. Les blocs de mousse peuvent être découpés ou moulés (en forme de gaufrier), en monobloc ou amovibles et adaptables en fonction du patient pour assurer une redistribution efficace. La mousse des matelas et surmatelas peut être de haute résilience ou à mémoire de forme ;
- supports en gel viscoélastique ou viscofluide en polyuréthane, silicone ou hydrogel ;
- supports en fibres siliconnées ;
- supports à air à pression constante sans motorisation ;
- supports à eau ;
- supports en peau de moutons australiens.

Les supports perfectionnés dits "high-tech"

Ces supports se caractérisent par un niveau élevé de technologie embarquée. On distingue :

- **les surfaces à pression alternée** : ces supports sont constitués de cellules d'air de diamètre variable et sont dotés d'une pompe. Une partie des cellules (1/2 ou 1/3 ou 1/4 en fonction des modèles) se dégonflent et se gonflent en alternance. Cette technologie permet le changement régulier des points d'appui du patient. Ces matelas fonctionnent soit à haute pression (*Alternative Pressure — AP*) pour un changement dynamique des points d'appui soit à basse pression (*Alternative Low Pressure — ALP*) pour réduire les pressions et favoriser l'angiogenèse ;
- **les lits à perte d'air** : ces supports motorisés sont constitués de plusieurs groupes indépendants de cellules d'air (correspondant aux zones anatomiques du sacrum, du buste et des talons par exemple) de diamètre variable. Des capteurs de pression identifient la morphologie du patient et asservissent la pression continue dans les cellules pour optimiser l'immersion et réduire dynamiquement les pressions d'interface ;
- **les lits fluidisés** : des microsphères en céramique d'un diamètre inférieur à 100 µm sont mises en suspension grâce à un flux d'air chaud dans une cuve fermée par un drap perméable à l'air. Le patient, supporté par les microsphères, "flotte" avec un enveloppement et une gestion du microclimat optimal.

Le microclimat pris en charge par les supports

Une meilleure compréhension du rôle de la macération dans le développement des escarres [8] a permis d'introduire la gestion du microclimat dans le design des supports. Ceux-ci facilitent l'évaporation de la transpiration et réduisent les températures de contact à l'aide de pompes et/ou de matériaux imperméables aux liquides, mais perméables à la vapeur d'eau (*figure 2*).

L'humidité augmente le coefficient de friction entre la peau et son support ; une prise en charge efficace du microclimat vise ainsi à réduire les phénomènes de friction. Cette technologie est disponible sous forme de surmatelas ou d'accessoires à intégrer aux matelas "high-tech".

La place du lit dans la prévention et le traitement des escarres

Le lit participe à la redistribution des pressions en maintenant le patient dans une position donnée grâce à des articulations motorisées. Lors d'une commande de remontée du buste, après une certaine inclinaison, l'articulation au niveau des genoux se déclenche automatiquement pour sécuriser le patient. Dans cette position, la surface portante au niveau des cuisses est augmentée et les contraintes au niveau du sacrum et des ischions sont réduites (*figure 3*).

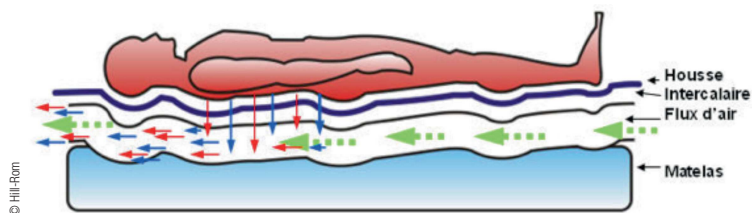


Figure 2. Principe de prise en charge du microclimat.

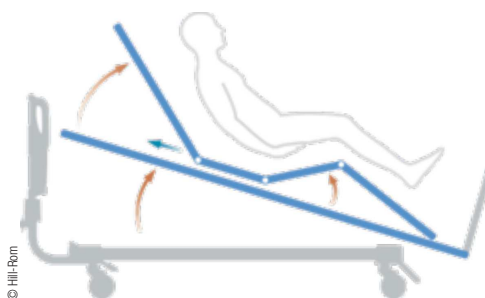


Figure 3. Articulation d'un lit pour redistribuer les pressions et éviter le cisaillement.

Certains modèles de lit permettent le repositionnement du patient, une partie ou la totalité du lit pivotant latéralement. Cette mobilité facilite le *nursing* et modifie les points d'appui du patient.

Les plates-formes composées d'un lit médical et d'un matelas intégré

Pour une prise en charge totale du patient, les fournisseurs proposent aujourd'hui des plates-formes, intégrant dans un même support les fonctionnalités d'un lit médical et d'une surface thérapeutique. Le support se commande *via* une seule interface et les informations des capteurs se croisent pour obtenir un système plus intelligent (mesure du poids de patient *via* le lit qui ajuste ensuite la pression du matelas, détection de sortie de lit ou de déplacement dangereux du patient dans le lit alors que les barrières sont descendues). Certains de ces modèles permettent une latéralisation partielle de 30°. Les cellules d'air se gonflent et se dégonflent alternativement, de chaque côté du matelas, pour tourner le patient et décharger les points d'appui.

Indications pour le choix d'un support et revue de la littérature

♦ **Les directives de 2014** [4] émises par la NPUAP, l'EPUAP et la PPIIA contiennent les recommandations suivantes :

- **pour la prévention à faible risque**, l'utilisation d'un matelas mousse en polyuréthane HD ou d'un matelas mousse à mémoire de forme est préférée à celle d'un matelas de mousse standard ;

Références

[1] National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP). NPUAP Pressure Injury Stages. www.npuap.org/resources/educational-and-clinical-resources/npuap-pressure-injury-stages/

[2] Barrois B, Colin D, Allaert FA. Enquête nationale de prévalence des escarres décennale PERSE en France. Conférence "Journées Cicatrisations 2017"; 2017, Janv 15-17. Revue Francophone de cicatrisation. 2017;1(Suppl):S96-7. www.researchgate.net/publication/312490246_Enquete_nationale_de_prevalence_des_escarres_decennale_PERSE_en_France

[3] NPUAP, Support Surface Standards Initiative (S3I). Terms and definitions related to support surfaces. 29/01/2007. www.npuap.org/wp-content/uploads/2012/03/NPUAP_S3I_TD.pdf

[4] NPUAP, European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP), Pan Pacific Pressure Injury Alliance (PPPIA). Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide. Osborne Park (Australie): Cambridge Media; 2014. www.npuap.org/wp-content/uploads/2014/08/Quick-Reference-Guide-DIGITAL-NPUAP-EPUAP-PPPIA-Jan2016.pdf

[5] Lortat-Jacob A, Colin D, Institut Garches. Les escarres : Actes des 13^{es} Entretiens de l'Institut Garches. Paris: Éd. Frison-Roche; 2000.

[6] McInnes E, Jammali-Blasi A, Bell-Syer SE, Dumville JC, Middleton V, Cullum N. Support surfaces for pressure ulcer prevention. In: Cochrane Database Syst Rev. 2011;4:CD001735. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001735.pub5/abstract>

[7] Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes). Prévention et traitement des escarres de l'adulte et du sujet âgé. Novembre 2001. www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/escarresdef_long.pdf

- **pour les patients à risque élevé** de développement d'escarres, si la fréquence de repositionnement manuel du patient ne peut se faire régulièrement, il est recommandé d'utiliser une surface (matelas ou surmatelas) motorisée (supports "high-tech") ;
 - **pour les patients porteurs d'escarres de stade I ou II**, l'utilisation des matelas en mousse polyuréthane HD, des matelas en mousse à mémoire de forme ou des supports de redistribution de pression non motorisés est préconisée ;
 - **pour le traitement des escarres de stade III, IV ou inclassables**, ou de dommages tissulaires profonds sans décharge possible, les patients seront de préférence placés sur un support offrant une bonne distribution des pressions, une réduction des phénomènes de cisaillement et une gestion du microclimat. Ces informations sont synthétisées dans le *tableau 1*.
- ♦ **Ces recommandations sont en accord avec les récentes revues Cochrane** [6,9]. En 2015, les

méta-analyses effectuées sur plus de 60 études peuvent être résumées de la manière suivante :

- l'utilisation de mousse en polyuréthane HD ou à mémoire de forme à la place des mousses standards réduit l'incidence des escarres chez les personnes à risque ;
 - l'incidence des escarres postopératoires diminue si des surmatelas anti-escarres sont utilisés pendant la chirurgie ;
 - la peau de mouton australien prévient efficacement les escarres.
- ♦ **La prise en charge de certains supports est remboursée** pour les blessés médullaires et les patients ayant un score inférieur ou égal à 14 sur l'échelle de Norton ou un score équivalent sur les autres échelles de risque de développement d'escarre validées. Pour certains dispositifs médicaux, les modalités de prise en charge peuvent évoluer. Les prix d'achat des dispositifs pour les personnes de plus de 120 kg peuvent également différer. La Sécurité sociale répartit les coussins et les matelas en trois classes (I, II et III). Le remboursement des surfaces varie en fonction du degré de technologie embarquée (*tableau 2*).

Tableau 1. Recommandations sur le choix des supports [4].

Support/Patient	À risque	À risque élevé	Stade I/II	Stade III/IV ou inclassable	Dommmages tissulaires profonds si pas de décharge possible
Mousse standard					
Mousse polyuréthane HD et mémoire de forme	X		X	X*	X*
Gel			X		
Fibres siliconées			X		
Air			X	X*	X*
Eau			X		
Peau de mouton australien			X		
Pressions alternées		X		X*	X*
Lit à perte d'air		X		X*	X*
		X		X*	X*

*si le support permet la redistribution de pression, une réduction du cisaillement et une gestion du microclimat.

Tableau 2. Exemples de remboursement sur le prix d'achat des dispositifs* issus du site de l'Assurance maladie [10].

Classe	Matelas	Surmatelas
I	Mousse	À eau 66 €
	Mousse structure	À mousse 50 €
	Mixte	À pression alternée 50 €
		À air statique 150 € - 300 €
		À fibres siliconées 200 €
II	Air	À mousse viscoélastique 250 €
	Mousse viscoélastique	
	Mixte	
III	Mousse multistratée	

*sauf pour les matelas à air où le prix correspond au remboursement par jour pour un contrat de location.

Discussion

♦ **Les preuves scientifiques démontrant la supériorité d'un support** par rapport à un autre demeurent peu nombreuses. Les études cliniques sont souvent menées sur de petites cohortes et présentent des biais (définition du support standard manquante, fréquence de repositionnement manuel des patients irrégulière, inclusion de patients porteurs d'escarres de stade I, etc.). Des groupes de réflexion scientifique se sont récemment mis en place pour identifier des critères spécifiques d'évaluation pour comparer les études cliniques et faciliter les méta-analyses [11].

♦ **Face à la diversité des résultats cliniques**, les études comparatives se sont basées sur d'autres critères d'évaluation : les pressions d'interface, des modèles d'éléments finis et des mesures de la microvascularisation locale (pression transcutanée en dioxygène et laser Doppler). Bien que plus rapides et faciles à mener avec des résultats comparables, ces études recrutent généralement, pour des questions d'éthique, des individus sains dans des conditions éloignées de la clinique (position en décubitus dorsal sans coussin de tête, temps d'alitement court, etc.). Elles fournissent des informations intéressantes sur les performances techniques des supports, mais ne sont pas toujours le reflet de la clinique.

♦ **Les ressources matérielles et humaines et le rapport qualité/prix des supports** sont bien souvent des freins, même si l'état de santé du patient oriente vers le choix du support optimal. Pour argumenter l'achat d'un nouveau support, le niveau de remboursement par l'Assurance maladie et l'évaluation des années de vie pondérées par la qualité (*quality-adjusted life years* — QALYS) doivent être pris en compte. Selon une étude anglaise, les matelas à pression alternée sont plus rentables que les surmatelas à pression alternée [6]. Il est toujours important de réévaluer les besoins du patient. Pour un coussin d'assise, les intensités de pression sont plus élevées, car la surface de contact est réduite. Le support doit être adaptable, ajustable et avoir un enveloppement optimal. Les changements morphologiques et anatomiques développés après l'installation de la paraplégie engendreront des modifications des points d'appui et la nécessité d'une réévaluation régulière du support. Les patients doivent être sensibilisés à détecter ces changements, avoir accès aux outils d'évaluation des supports et alerter en cas de doute. Le patient doit se sentir stable, confortable et en sécurité pour maintenir sa position. La nuisance sonore des supports motorisés est également un élément à prendre en compte.

♦ **Le lit est parfois négligé comme support**, car il n'est pas en contact direct avec le patient. Néanmoins, il participe au positionnement et à la distribution des pressions d'interface et facilite les soins.

♦ **La généralisation des supports fait émerger d'autres problématiques** comme l'usage de brancards pour blessé médullaire, de tables opératoires ou de sièges de toilettes. Dans ces situations où le patient est immobile, les contraintes appliquées sur les tissus mous sont d'intensité élevée et peuvent créer les premières lésions. De même, le linge de lit et les vêtements des patients peuvent augmenter les pressions d'interface. Enfin, les supports peuvent parfois être eux-mêmes source d'escarres. Des plaies liées aux dispositifs médicaux (sondes, bassins hygiéniques, accessoires de décharge) surviennent surtout pour les patients immobiles, à risque élevé d'escarre. Les constructeurs doivent anticiper les risques potentiels avec l'avis éclairé des praticiens et la surveillance vigilante du personnel hospitalier.

Conclusion

Les supports sont des outils indispensables pour la prévention et le traitement des escarres, même si leur utilisation ne dispense pas d'une mobilisation fréquente des points d'appui des patients immobilisés. Le catalogue de produits est très fourni et il est difficile pour le praticien de déterminer quel support donnera les meilleurs résultats pour un patient. Cette revue rappelle les différentes catégories de supports utilisés aujourd'hui en France et leurs indications. Les plates-formes et les lits à rotation latérale sont les dernières innovations industrielles. Par ailleurs, des besoins de nouveaux supports pour limiter les pressions d'intensité élevée ont été identifiés.

Pour étayer les indications et démontrer la supériorité d'un modèle de support par rapport à un autre, des études cliniques randomisées avec une méthodologie solide et une large cohorte sont nécessaires. Plusieurs sociétés scientifiques travaillent actuellement sur une harmonisation des critères de jugement pour utiliser aux mieux les données actuelles et futures. ▶

Références

- [8] Yusuf S, Okuwa M, Shigeta Y, Dai M, Iuchi T, Rahman S, et al. Microclimate and development of pressure ulcers and superficial skin changes. *Int Wound J*. 2015;12(1):40-6. www.researchgate.net/publication/236046317_Microclimate_and_development_of_pressure_ulcers_and_superficial_skin_changes
- [9] McInnes E, Jammali-Blasi A, Bell-Syer S, Dumville J, Cullum N. Preventing pressure ulcers: Are pressure-redistributing support surfaces effective? A Cochrane systematic review and meta-analysis. *Int J Nurs Stud*. 2012 Mar;49(3):345-59. [www.journalofnursingstudies.com/article/S0020-7489\(11\)00411-1/fulltext](http://www.journalofnursingstudies.com/article/S0020-7489(11)00411-1/fulltext)
- [10] Assurance maladie. Liste des produits et des prestations (LPP) : Recherche par chapitre. www.codage.ext.cnamts.fr/codif/tips//chapitre/index_chap.php?p_ref_menu_code=14&p_site=AMELI
- [11] NPUAP. Support Surface Standards Initiative (S3I). www.npuap.org/resources/educational-and-clinical-resources/support-surface-standards-initiative-s3i/

Déclaration de liens d'intérêts
L'entreprise Hill-Rom emploie Marion Le Gall et Éric Agdeppa, et participe au financement du travail de thèse de Marion Le Gall.

Comme illustré **figure 2**, en dépit des protocoles de prévention, la survenue des escarres reste fréquente. Leur **traitement** est résumé dans la **figure 3** adapté de (Bhattacharya and Mishra, 2015).

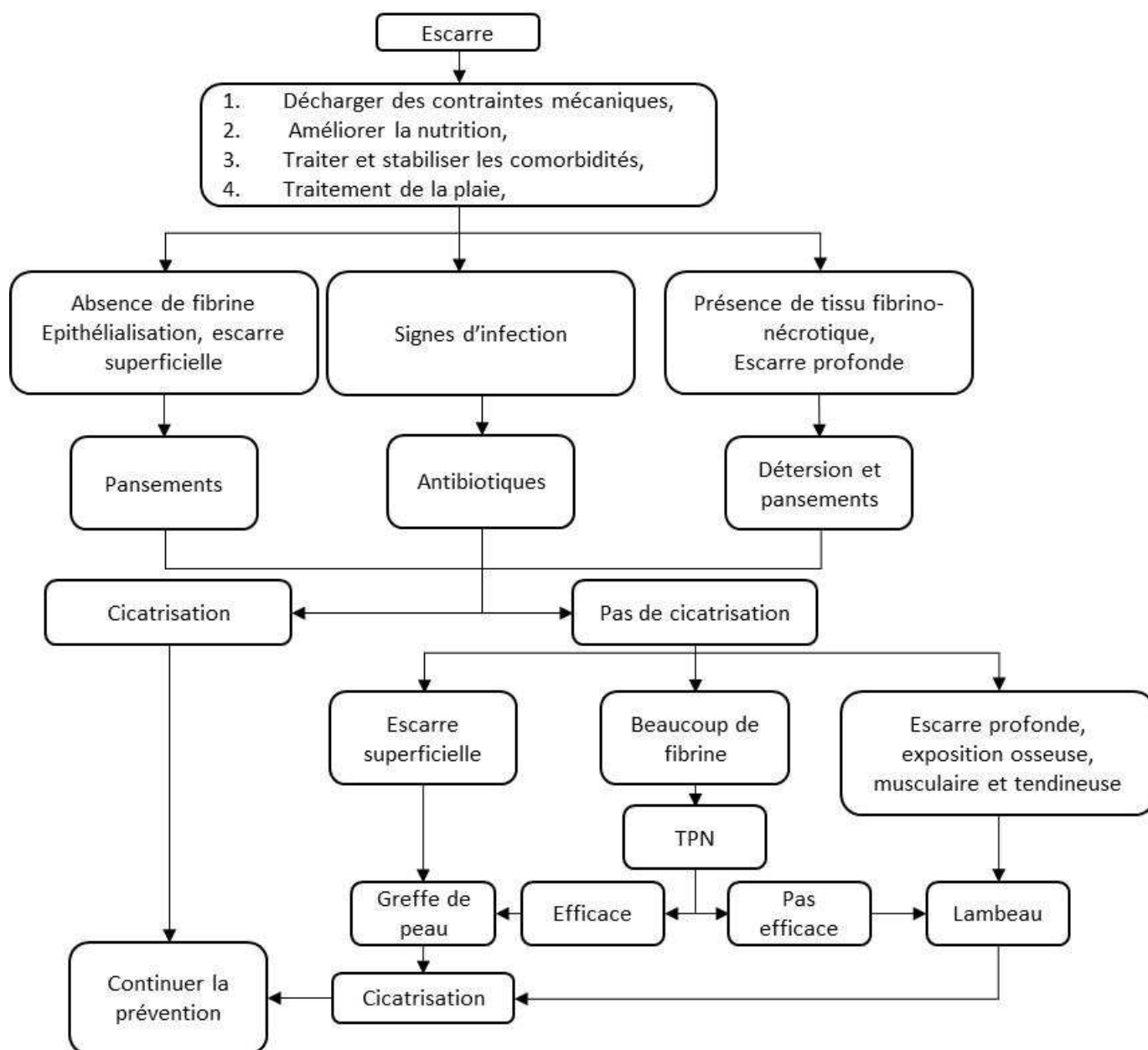


Figure 3 : Algorithme de traitement des escarres d'après Bhattacharya et Mishra, 2015

Cette revue de la littérature nous amènera tout d'abord dans le **muscle squelettique**, sur les traces de la genèse des escarres. Puis nous dériverons sur les **interactions avec le tissu cutané** et les altérations systémiques, à la recherche des **biomarqueurs** qui révolutionneront la prévention de demain. Enfin, nous reviendrons au patient : les différents aspects de la **paraplégie** et du **diabète**, qui le rendent plus vulnérable au développement des escarres et à une mauvaise **cicatrisation** qui clôturera cette revue de la littérature.

Revue de la littérature

Chapitre 1 : Mécanismes physiopathologiques à l'origine des escarres dans le tissu musculaire

Implication du tissu musculaire

Les escarres profondes sont appelées en français et en anglais **Deep Tissue Injury (DTI)**, et correspondent à une catégorie à part dans la classification des escarres. L'incidence de ces plaies a longtemps été sous-estimée et aujourd'hui 14% des escarres sont classifiés comme des DTI (Kayser, VanGilder et al. 2018).



Cas clinique

Décoloration de la peau qui après quelques jours laisse place à une abrasion cutanée. La lésion cutanée est minime mais met à jour sur une cavité importante avec un décollement des tissus sous-jacents et une atteinte des tissus périphériques.

Figure 4 : Exemple de cas clinique d'une escarre profonde du sacrum, D'après NPUAP.

Ce constat clinique est le point de départ de travaux portant sur les déformations des tissus mous grâce à l'imagerie IRM (Linder-Ganz, Shabshin et al. 2008, Linder-Ganz and Gefen 2009, Linder-Ganz, Yarnitzky et al. 2009). Brièvement, des volontaires sains se sont assis dans une IRM avec et sans harnais lesté. En ajoutant un lesté à la personne, les ingénieurs ont étudié la déformation des muscles compressés pendant la station assise, qui sont les *gluteus maximus* (ou muscles grand fessier), sous les ischions (voir **figure 5**) (Oomens et al., 2003). Ces images ont ensuite été associées à des analyses par éléments finis pour créer et valider des modèles de déformation des tissus. Ces outils sont les premières clés qui ont permis une meilleure compréhension de la répartition des contraintes exercées dans le corps du patient.

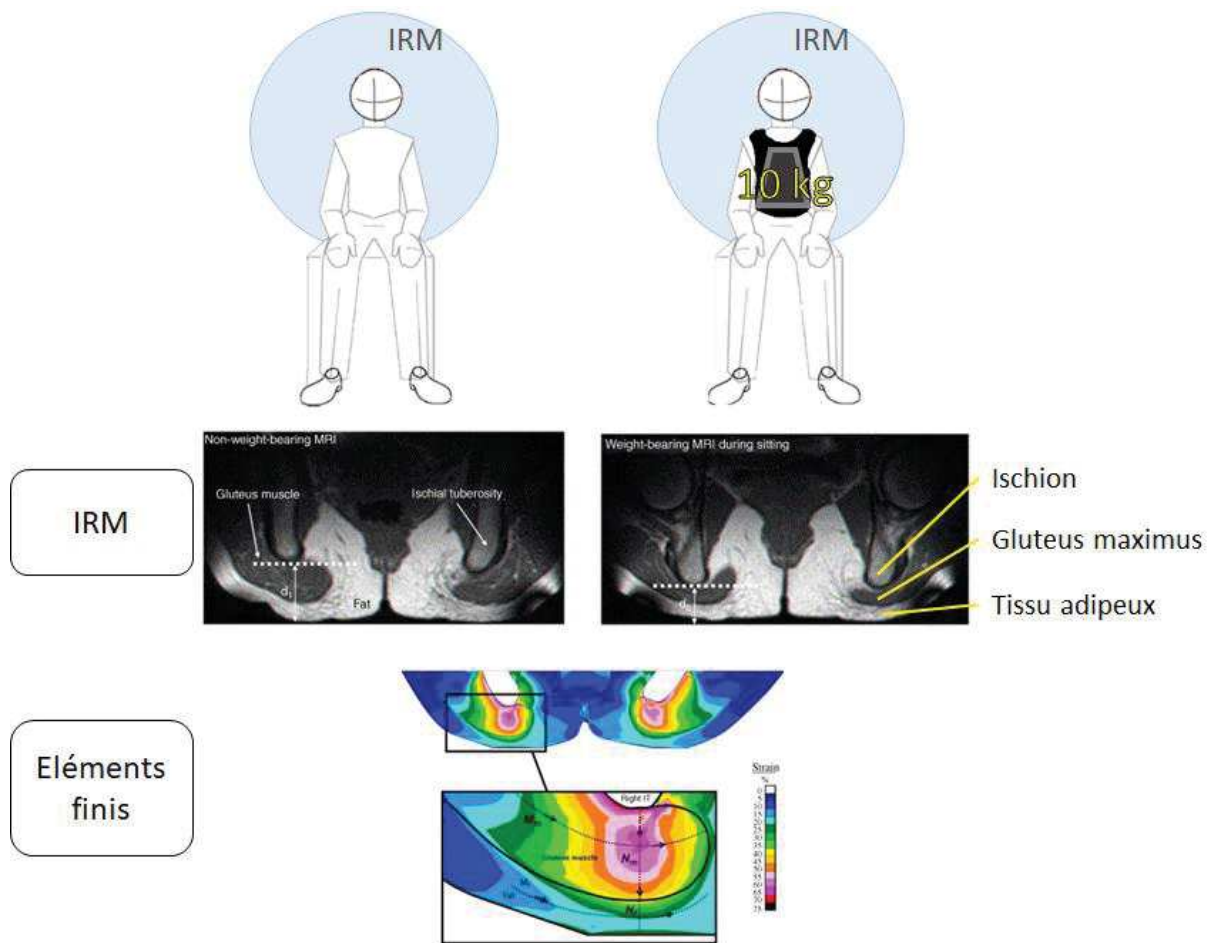


Figure 5 : Schématisation des expériences de modélisation des contraintes mécaniques d'un volontaire sain. D'après Linder-Ganz et al, 2007, 2008

Sous l'effet d'une compression, les tissus mous se déforment et les contraintes maximales sont localisées au niveau de la protubérance osseuse dans le muscle en contact direct avec celui-ci. Ces éléments ont mis en perspective les mesures des contraintes cutanées qui reflètent mal la déformation interne de nos tissus et complexifient la prévention (non-invasive) des escarres. **On considère aujourd'hui qu'environ 70% de la déformation tissulaire est localisée dans le muscle contre 30% pour le tissu adipeux** (Shabshin et al., 2010). D'autre part, ces résultats participent aux études sur l'étiologie des escarres qui regroupent 4 hypothèses scientifiques présentées dans ce chapitre :

- (1) **déformation mécanique,**
- (2) **augmentation de pression du flux lymphatique,**
- (3) **ischémie,**
- (4) **ischémie / reperfusion.**

Déformation mécanique



Cas clinique (Brill, 2014)

Station allongée de courte durée sur un support non adapté, qui peut arriver dans le cadre du transport d'un patient ou au bloc opératoire. C'est également une cause de développement des escarres liées aux dispositifs médicaux dont les matériaux, trop rigides créent des lésions, comme ici sur la joue et le nez.

Figure 6 : Exemple de cas clinique d'une escarre liée à l'utilisation d'un dispositif médical sur le visage d'un nouveau-né. D'après Brill, 2014

Comme les os qui se cassent après un choc, les tissus mous dont les muscles, la graisse et la peau se déforment jusqu'à un certain point avant de rompre. En fonction de notre état de santé, notre âge, notre environnement et notre hérédité, nos tissus sont plus ou moins fragiles face aux contraintes mécaniques. Aussi les personnes âgées et les nouveaux nés sont particulièrement vulnérables au développement de lésions cutanées et musculaires suite à une compression (Blaylock and Gardner, 1994; Defloor, 1999).

Les cellules ont la capacité de détecter un stress mécanique et de le traduire en signal biochimique qui pourra être lu, compris et auquel la cellule pourra répondre. Ce mécanisme est appelé **mécano-traduction**, permis grâce à des **mécano-récepteurs** qui captent les signaux mécaniques au niveau de la membrane cellulaire. On distingue la **bicouche lipidique membranaire** et le **cytosquelette** comme mécanorécepteurs prépondérants dans les cellules musculaires squelettiques.

La bicouche lipidique est un élément de la membrane cellulaire. Son rôle est de réguler les échanges ioniques entre la cellule et le milieu extérieur grâce à ces caractéristiques polaires. Les lipides qui la constituent entourent la cellule en formant des invaginations, de sorte que la bicouche lipidique se déforme en adaptant sa géométrie. Néanmoins la bicouche lipidique n'est pas extensible, supportant mal la tension, et quand la surface dépasse le seuil limite de la cellule, elle peut se rompre rapidement à l'image d'un ballon de baudruche rempli d'eau (Dulhunty and Franzini-Armstrong, 1975).

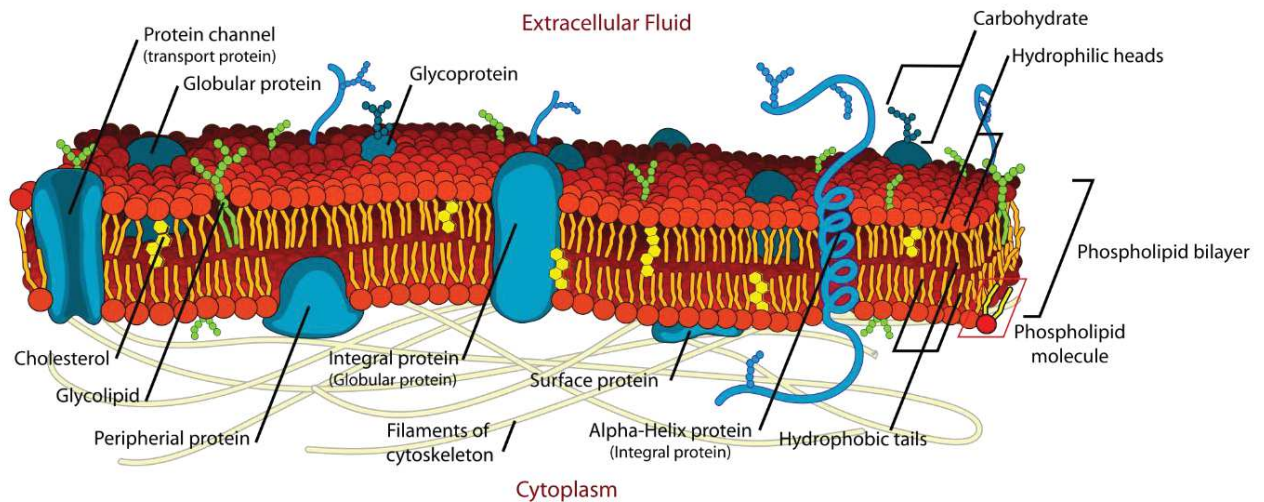


Figure 7 : Architecture de la bicouche lipidique et du cytosquelette, ©Marianna Ruiz, édité par Alokprasad84

Le cytosquelette est l'élément clé de l'architecture cellulaire. Il est formé de filaments et de microtubules qui soutiennent la cellule et lui permettent de se mouvoir. Les contraintes mécaniques sont transmises de la matrice extracellulaire au cytosquelette via des points d'adhérence focale (les costamères) ou des complexes dystrophine-glycoprotéines. Ces signaux sont ensuite transformés par les voies **Mitogene Activated Protein Kinase (MAPK)** et **phosphatidylinositol 3' kinase (PI-3K)**. En plus de ces deux cascades, les phospholipases et le calcium ont un rôle dans la mécano-transduction.

Les modèles utilisés pour étudier la déformation mécanique des cellules sont essentiellement *in vivo*. Le volume de la cellule est inchangé mais leur surface augmente de manière anisotropique en suivant l'orientation du cytosquelette : la cellule passe d'une forme circulaire à une forme allongée. Les modèles animaux de compression sont générés par un piston venant comprimé le muscle de l'animal, généralement une patte arrière (l'autre patte est alors le contrôle non-comprimé) à une intensité donnée (Salcido et al., 2007). Des analyses histologiques couplées à des acquisitions IRM permettent d'évaluer les lésions musculaires *in vivo* en modulant l'intensité de compression et la durée de compression (Stekelenburg et al., 2007). En IRM, un hyper signal pondéré en T2 est concomitant avec l'apparition d'un œdème. Les régions anatomiques à hyper signal T2 sont celles où les lésions histologiques sont majoritaires (Bosboom et al., 2003; Stekelenburg et al., 2007).

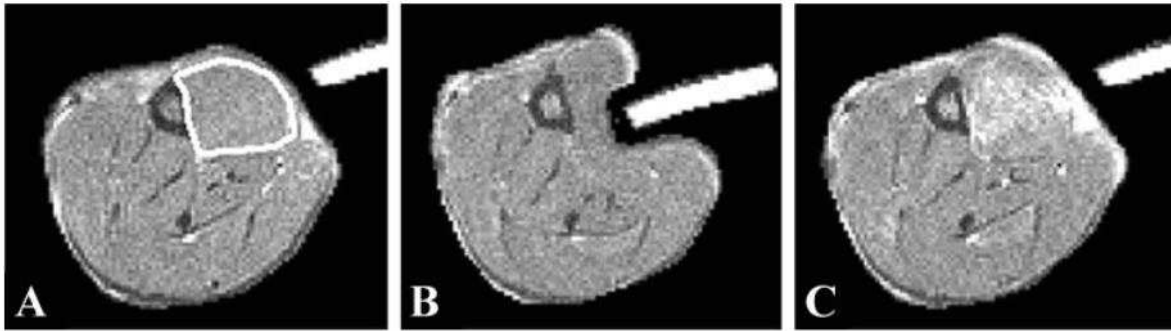


Figure 8 : Images IRM T2 d'un muscle jambier de rat (A) avant indentation, (B) pendant l'indentation avec le piston, (C) après indentation. La zone à hyper signal T2 en (C) correspond à la région anatomique présentant le plus de lésions cellulaires. D'après Stekelenburg et al, 2006.

Un modèle *In-vitro* 3D comprimé présente une accumulation de cellules lésées directement en regard du piston qui assure la compression (Breuls et al., 2003). Plus l'intensité de compression est importante, plus tôt les cellules mourront. Récemment, l'impact d'une compression statique sur le cytosquelette de cellules sur un modèle *in-vitro* 3D a été étudié (Wu et al., 2016). Brièvement, des agencements 3D de cellules musculaires squelettiques de souris ont été construits pour simuler un muscle. Ces structures ont été comprimées en faisant varier la durée de la compression pour appréhender la cinétique des modifications intra musculaire. Notamment, **la voie MAPK** a été étudiée car cette voie de signalisation traduit les stimuli mécaniques de la membrane cellulaire jusqu'au noyau via l'activation des composants de la famille de kinase. Ces signaux régulent le devenir de la cellule soumise à la compression mécanique. La voie MAPK est constituée de 3 grandes sous-familles de kinases : p38, ERK1/2 et JNK.

Les protéines de la **famille p38** ont deux sites de phosphorylation qui sont activés par le stress oxydant, les cytokines inflammatoires, les récepteurs de mort cellulaire (TNF : Tumor Necrosis Factor) ou les médiateurs vasoactifs suite à une ischémie (Burkholder, 2007; Cowan and Storey, 2003). L'activation de cette chaîne de kinases induit des changements de transcription de protéines impliquées dans le mouvement des cellules, un remodelage de la chromatine, du cytosquelette et une dérégulation de l'expression de CHOP et ATF2.

ERK1 et ERK2 ont un rôle dans la division, la migration et la survie cellulaire. Ces deux familles de kinase sont activées par les facteurs de croissance et les facteurs mitogènes. En fonction du stimuli initial, après translocation au noyau cellulaire, ERK phosphoryle des substrats qui détermineront le devenir de la cellule (Cowan and Storey, 2003). Cette famille de kinases joue également un rôle durant l'exercice physique et l'adaptation du muscle squelettique après un effort physique à haute intensité

où la phosphorylation de ERK1/2 est majorée (Widegren et al., 2000). ERK peut également être phosphorylé à la suite d'un stress oxydant ou d'un signal calcique via la voie de la protéine kinase C (PKC) (Burkholder, 2007).

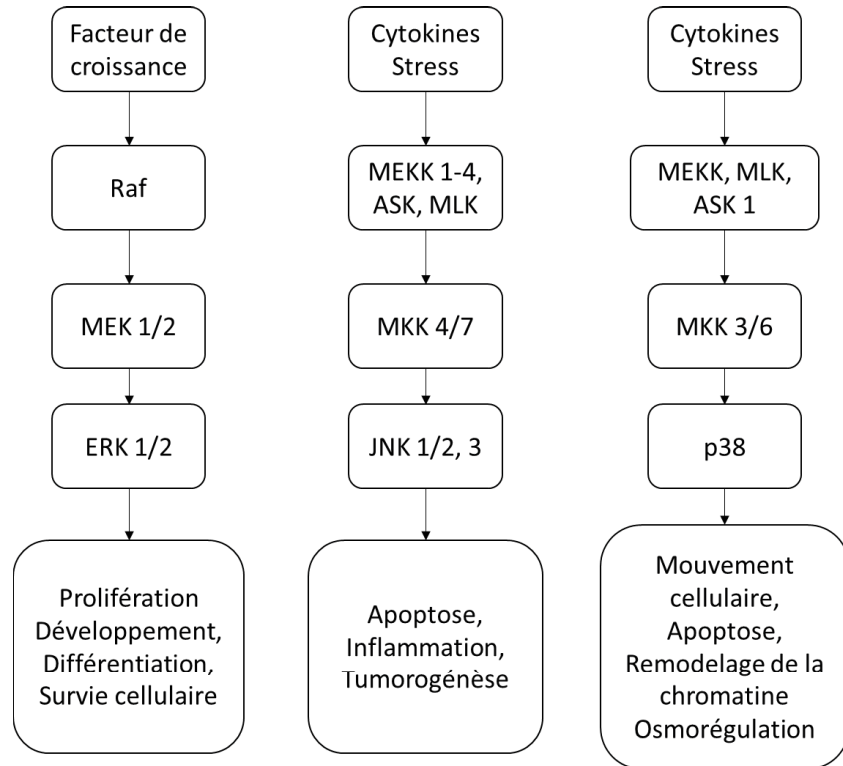


Figure 9 : Cascade des 3 grandes familles de la voie MAPK, du stimulus initial à la réponse cellulaire. D'après Cowan et Storey, 2003

Les enzymes de la **famille de JNK** sont activées par une double phosphorylation après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires, une ischémie, les protéines de chocs thermiques (HSP : Heat Shock Protein) ou un stress osmotique. Sous forme active, les kinases sont des dimères qui se lient à la membrane nucléaire et modifie les facteurs de transcription de plusieurs protéines dont le facteur de mort cellulaire p53 et ATF-2 (Zhang et al., 1998). Généralement, une activation de JNK induit l'apoptose (Burkholder, 2007; Cowan and Storey, 2003).

Après une compression de 5, 10 minutes et 24 heures, l'expression de la forme phosphorylée de p38 augmente. Aucune modification n'est détectée entre 20 minutes et 14 heures de compression. Après 14 heures de compression, l'expression totale de p38 diminue significativement (Wu et al., 2016). Or si on considère le ratio de la forme phosphorylée p-p38 sur la forme totale p38, p38 est activée à 5 min, 10 min et 14 heures comparé au groupe non-comprimé. De même, les autres sous-familles de

MAPK présentent une expression de(s) formes phosphorylée(s) d'ERK and JNK augmentée à 5 minutes de compression. La voie MAPK est activée sur ces 3 grandes sous-familles dès le début de la compression statique.

Aucune modification de l'expression de l'**alpha-actinine**, protéine du cytosquelette qui assure l'ancrage des filaments fins dans la contraction musculaire n'est rapportée. Mais une désorganisation après 2 heures de compression est visible en Immunofluorescence (IF) et perdue à 24 heures de compression (Wu et al., 2016). Cette étude met en évidence une activation précoce et temporaire de la voie MAPK au travers des 3 sous-familles de kinases dès le début de la compression des cellules musculaires. Cette activation se traduit entre 5 minutes et 2 heures de compression statique par une désorganisation du cytosquelette de la cellule. Les mécanorécepteurs présents dans la membrane cellulaire traduisent la contrainte mécanique par des signaux chimiques qui phosphorylent différentes protéines cytotologique et nucléiques qui modifient l'expression des facteurs de transcription de la cellule et engendre un dérèglement osmotique, une inflammation et l'apoptose de la cellule.

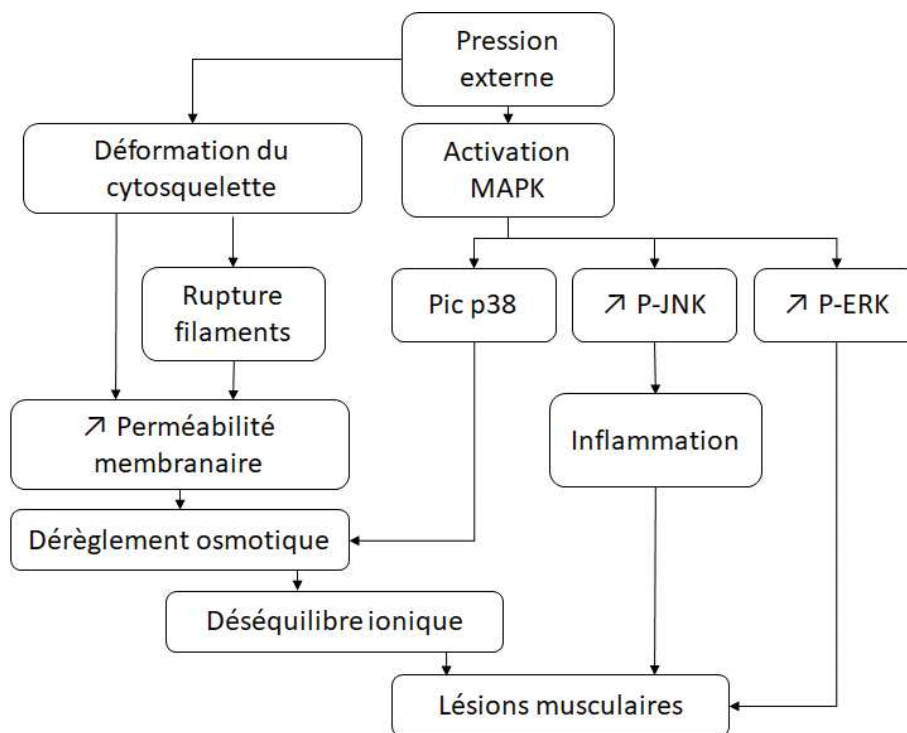


Figure 10 : Cascade d'évènements entraînant des lésions musculaires à partir d'une déformation mécanique des cellules

La déformation mécanique a des effets directs sur les cellules mais elle est également responsable de la déformation des structures à l'échelle de cluster de cellules irriguées par des capillaires (mm) et à l'échelle des organes (cm) (Shoham and Gefen, 2012).

Augmentation de pression du flux lymphatique

Les mammifères utilisent le réseau sanguin afin d'apporter l'oxygène et les nutriments essentiels à nos cellules et de drainer les déchets métaboliques. Lors des échanges entre les organes et le système sanguin, un gradient de pression se crée : la pression artérielle est plus élevée que la pression interstitielle ce qui entraîne un exsudat continu de liquide et de protéines depuis le réseau sanguin vers l'espace interstitiel. Pour pallier à ce gradient de pression, le corps est constitué d'un système lymphatique dont le rôle est de drainer l'excédent de liquide depuis l'espace interstitiel vers la circulation sanguine pour maintenir l'homéostasie tissulaire.

Lors d'un cisaillement, il a été supposé que les différentes couches de tissu glissent les unes sur les autres et viennent pincer les capillaires. Cette dérive du système circulatoire perturberait le flux lymphatique et la pression interstitielle. Aussi, le système lymphatique ne serait plus en mesure de préserver l'équilibre ionique de la cellule.

Le système lymphatique est composé de :

- **capillaires lymphatiques** de 30 à 80 μm de diamètre (Morfoisse, 2015). Ils sont constitués d'une couche de cellules endothéliales et sont reliés à la matrice extracellulaire via des filaments de fibrilline qui viennent s'ancrer dans les fibres de collagène du tissu conjonctif. L'interaction entre les fibres de fibrilline et de collagène assure la fonctionnalité des capillaires en les maintenant ouverts en dépit des gradients de pression (Leak and Burke, 1968). Ils assurent l'entrée des fluides,
- **vaisseaux pré-collecteurs** sont des vaisseaux intermédiaires, d'un diamètre compris entre 100 et 200 μm , entre les capillaires lymphatiques et les vaisseaux collecteurs (Morfoisse, 2015),
- **vaisseaux collecteurs** sont organisés en sous-unité fonctionnelles : les **lymphangions**, qui propulsent la lymphe dans l'organisme depuis l'espace interstitiel jusqu'à la circulation sanguine (**figure 11**). Le flux lymphatique est permis grâce à la contraction des muscles squelettiques environnants et à la contraction des muscles lisses qui soutiennent les vaisseaux collecteurs (Reddy, 1990),
- **ganglions** qui sont les lieux de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires.

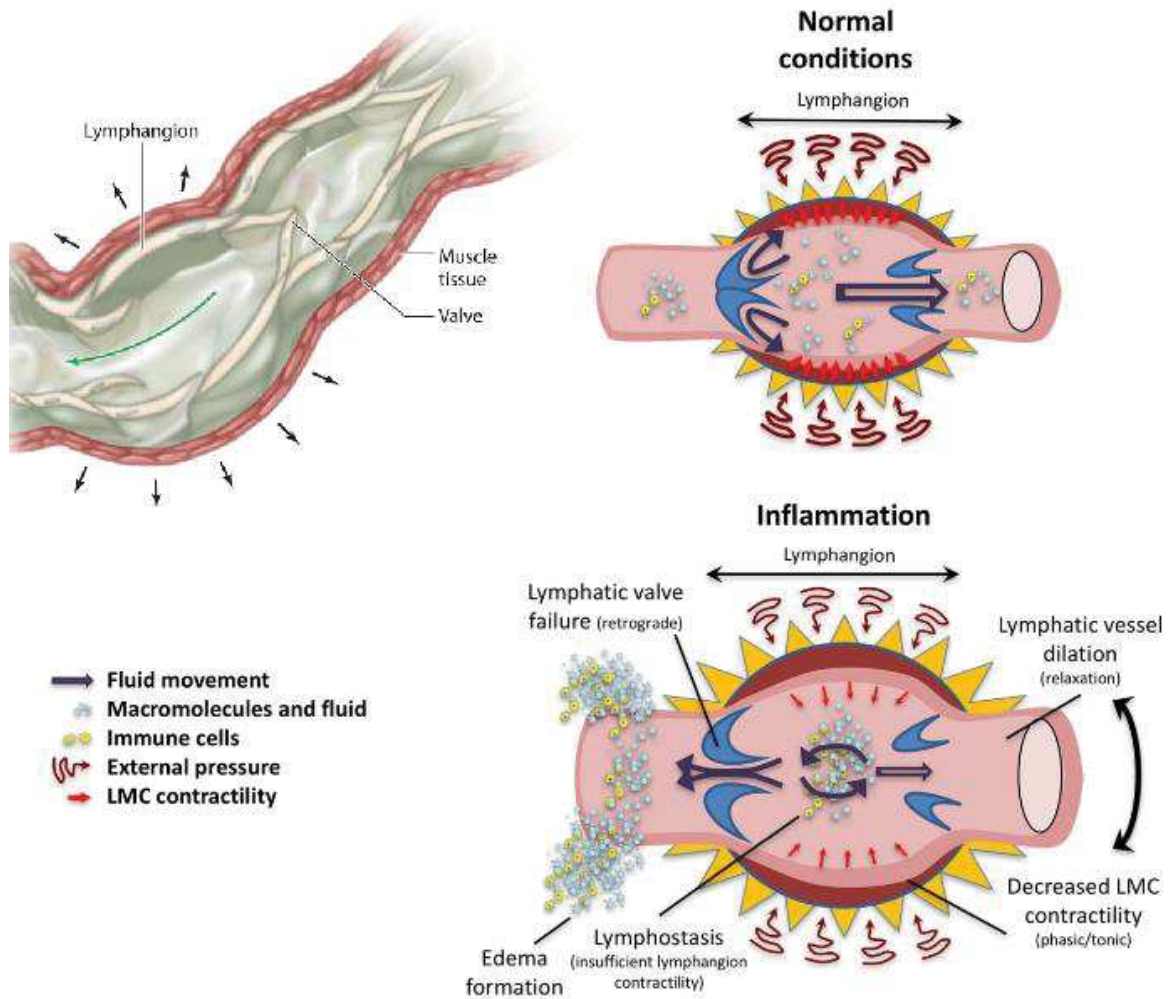


Figure 11 : Structure des vaisseaux collecteurs du réseau lymphatique et des lymphagions en conditions normale et pathologique. D'après Al-Kofahi et al, 2017.

Dans le cas d'une compression prolongée, la pression produit une ischémie qui résulte en une anoxie vasculaire. Une quantité anormale de sérum sanguin peut être retenue au niveau du tissu comprimé, provoquant un œdème. Or la présence d'œdème a été corrélée à des perturbations du système lymphatique (Husain, 1953). La compression dans le temps provoque :

- (1) une inertie de la lymphe ou lymphœdème,
- (2) une accumulation des déchets métaboliques qui ne peuvent plus s'évacuer,
- (3) un non approvisionnement des cellules en nutriments.

Récemment, la spectroscopie proche infrarouge ou NIRS associée à une injection du fluorochrome Indocyanine green a été utilisée pour évaluer l'architecture et la fonctionnalité du système lymphatique (Alander et al., 2012; Marshall et al., 2010). Les muscles fléchisseurs d'un avant-bras de

volontaires sains ont été comprimés à 60 mmHg pendant 45 min à l'aide d'un piston cylindrique, le second bras servant de contrôle (Gray et al., 2016a, 2016b). Puis des images de fluoroscopie ont été réalisées sur les deux zones, toutes les 5 min pendant 45 min. Deux profils d'imagerie apparaissent (**figure 12**) :

- (1) un drainage lymphatique unidirectionnel sous la forme d'un hyper-signal qui part du site de compression vers le creux axillaire, figure 12.A,
- (2) un hyper-signal sur la zone comprimée sans drainage directionnel. Des halos peuvent apparaître au niveau du site de compression. Il n'y a pas de retour lymphatique visible, suggérant une inertie du liquide, figures 12.B et 12.C. Aucun vaisseau collecteur n'apparaît sur ces images.

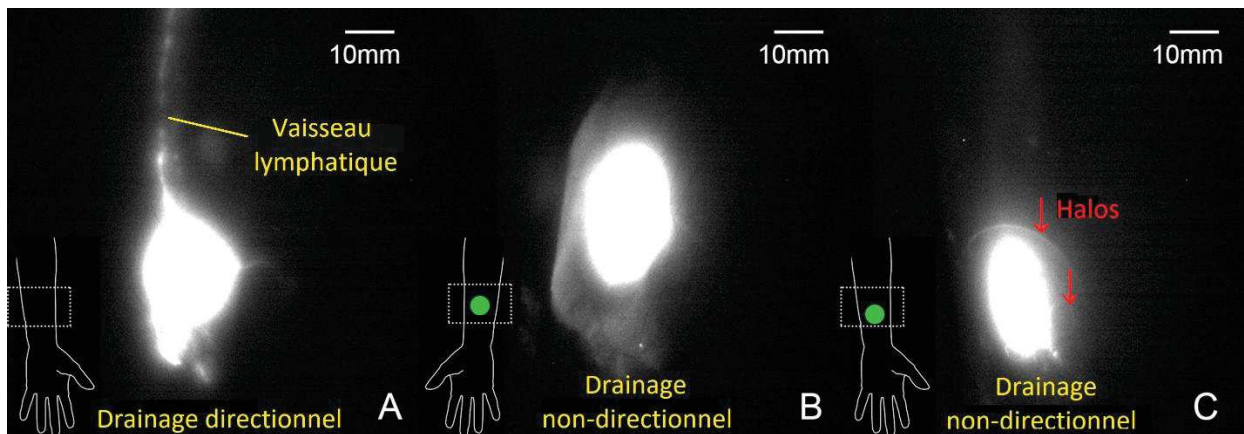


Figure 12 : Images de spectroscopie proche infrarouge (NIRS) du fluorochrome Indocyanine green de bras comprimés à 0 mmHg (A) et 60 mmHg (B,C) pendant 45 min. Variation de drainage lors de la compression. D'après Gray, Voegeli et Bader, 2016

Sur la petite cohorte de volontaires sains (n=8), les deux profils sont retrouvés dans le bras non comprimé et le bras comprimé à 60 mmHg avec une prédominance de drainage non-directionnel pour le bras comprimé et de drainage unidirectionnel pour le bras non-comprimé. Ces résultats suggèrent qu'à 60 mmHg appliqué pendant 45 min le système lymphatique de patients sains est localement endommagé sous la forme d'un effondrement de la pression lymphatique (Gray et al., 2016a).

Ces données sont supportées par des expériences sur la relation entre pression d'interface et vitesse de drainage lymphatique réalisées sur un modèle canin (Miller and Seale, 1981). Brièvement, les muscles jambiers de chiens anesthésiés ont été comprimés à une intensité de pression croissante (0-75 mmHg, itération de 15 mmHg). Un bolus de marqueur radioactif et un système de détection placé directement sur le site de compression renvoie les valeurs du flux lymphatique local. Ces travaux ont mis en évidence une augmentation non-linéaire du flux lymphatique de 0 à 60 mmHg avec une valeur

du flux lymphatique par volume tissulaire de 0,324 mL/h/mL et 0,96 mL/h/mL respectivement. A 60 mmHg, deux sous-groupes se distinguent : une partie de la population de chiens présente une augmentation du flux alors que l'autre partie présente une diminution de flux. A 75 mmHg, le flux est stoppé : le collapsus lymphatique est détecté chez tous les animaux (voir **figure 13**).

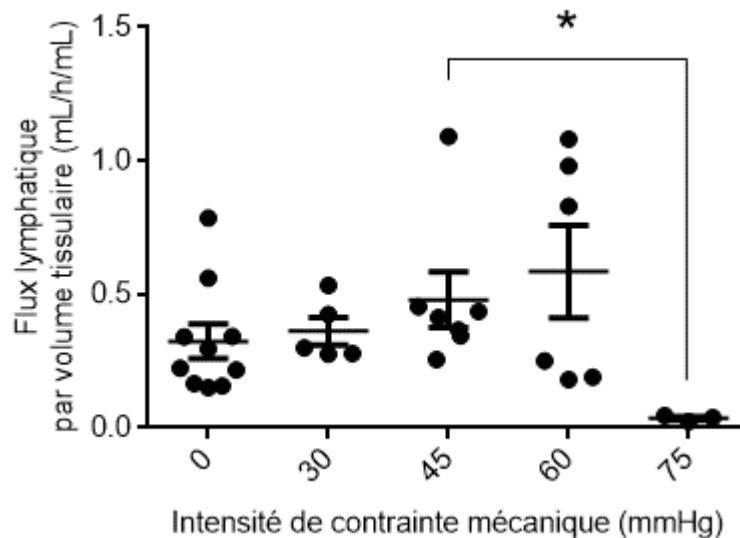


Figure 13 : Variation du flux lymphatique sur un muscle jambier de chien soumis à une pression croissante. D'après Miller et Seale, 1981.

A la suite d'une compression des tissus externe, une dilatation des lymphagions augmente le flux lymphatique jusqu'à une valeur critique comprise entre 60 et 75 mmHg. Entre ces deux intensités de pression, en condition physiologique, les vaisseaux collecteurs n'assurent plus le drainage local de la lymphe. Des modèles mathématiques suggèrent également que l'occlusion lymphatique se produit pour une pression prolongé dans le temps (Reddy and Cochran, 1981).

Une atteinte des filaments de fibrilline ou d'élastine qui assurent le maintien des capillaires et de vaisseaux en position ouverte peut également avoir des effets sur le drainage lymphatique. En effet, comme le cytosquelette, les filaments de structure du tissu conjonctif peuvent être atteint après une stress mécanique de forte intensité ou continu sur une longue durée (Krouskop et al., 1978). La rigidité des structures porteuses du système lymphatique est fonction du flux (Reddy and Patel, 1995). De plus, les propriétés contractiles du muscle lisse entourant les vaisseaux collecteurs sont sensibles au stress mécanique. La contraction des muscles lisses entourant les vaisseaux collecteurs est également dépendante de la présence de biomarqueurs : les catécholamines augmentent sous forme de dose/réponse la contraction, alors que la sérotonine provoque des spasmes des muscles lisses qui diminuent le flux lymphatique (Reddy, 1990). Ces résultats suggèrent la nécessité d'une analyse

critique des traitements médicamenteux des patients à risque de développement d'escarre. La propulsion de la lymphe dans les vaisseaux collecteurs est assurée quand la distension radiale du lymphagion (voir **figure 11**) dépasse un seuil donné. La contraction des lymphagions est suivie d'une relaxation dont les propriétés sont similaires au cœur. Néanmoins, si en raison d'une compression prolongée les lymphagions sont distendus à l'état basal, alors le couplage contraction/relaxation ne peut plus s'effectuer physiologiquement et la lymphe n'est plus transportée correctement vers la circulation sanguine (Reddy, 1990).

Le fluide interstitiel est pressé de la zone sous contrainte mécanique vers la zone non comprimée (**figure 12**). Sans ce liquide, les cellules sont directement en contact entre elles. Ce contact direct entraîne un stress qui induit une inhibition de contact ou un arrêt de la synthèse de collagène (Reddy and Cochran, 1981).

A l'image de la reperfusion, traitée plus loin, une fois la contrainte mécanique déchargée, le flux interstitiel est réduit et cette variation de pression peut être la cause de l'éclatement des capillaires, d'œdèmes ou de lésions lymphatiques. Une étude sur le mouton a mis en évidence que l'utilisation d'un support à pression alternée permet d'augmenter le flux lymphatique (Gunther and Clark, 2000).

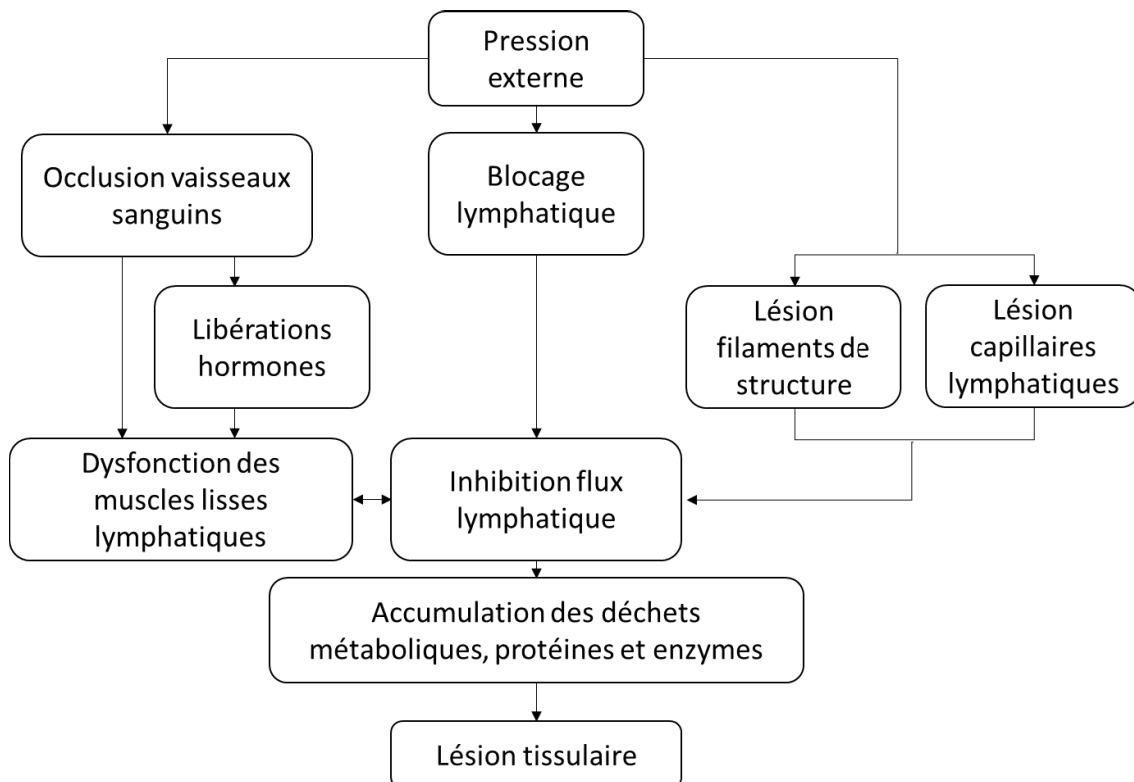
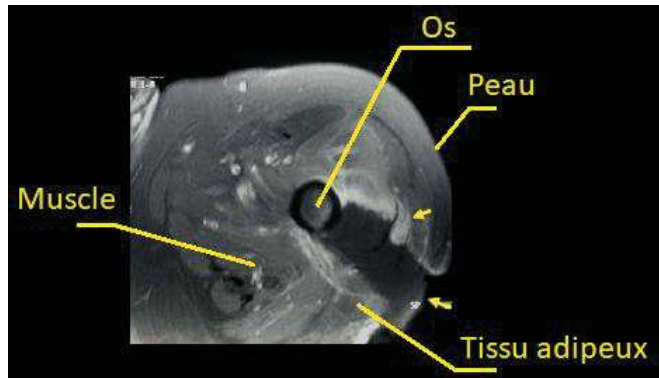


Figure 14 : Cascade possible d'événements entraînant le développement d'une escarre. D'après Reddy, 1990

Ischémie



Cas clinique (Linder-Ganz et al.)

Jeune homme retrouvé inconscient dans la rue après plusieurs 2-3 jours, allongé sur son téléphone portable. Images IRM de nécrose musculaire ou myonécrose des muscles jambiers. (Linder-Ganz et al.)

Figure 15 : Exemple de cas clinique, image IRM de myonécrose. D'après Linder-Ganz et al, 2009

L'ischémie est l'interruption ou la diminution de la circulation sanguine au niveau d'un tissu ou d'un organe. Les cellules sont alors privées d'un apport en dioxygène, en nutriments et les déchets métaboliques s'accumulent dans la cellule. La respiration cellulaire passe d'un **mode aérobie** à un **mode anaérobie temporaire**. Historiquement, l'ischémie est la première cause décrite comme déclencheur d'escarre. En effet, une compression ou un cisaillement à la surface de la peau vient obstruer les capillaires sanguins sous-jacents créant une ischémie locale. Dans les premières phases d'ischémie, une **hyperémie réactive** apparaît, il s'agit d'une augmentation de l'afflux sanguin pour pallier à l'ischémie.

L'ischémie locale est généralement associée à une **immobilité** prolongée, comme illustrée par le cas clinique ci-dessus (voir **figure 15**). Le téléphone portable dans la poche du patient a eu le même effet qu'un indenteur sur les tissus mous et a induit une dégénérescence des tissus musculaires, adipeux et cutanés qui s'est traduit par une myonécrose de la cuisse (Linder-Ganz et al.). Aujourd'hui encore, on retient comme valeur seuil de pression maximale supportée par les tissus 32 mmHg qui correspond à la pression d'un capillaire sanguin d'un pouce sain, mesurée par Landis en 1930. Le capillaire sanguin se fermera si la pression externe est supérieure à la pression interne du capillaire (Landis, 1930). Ce seuil reste néanmoins arbitraire et ne peut être utilisé comme valeur absolue à partir de laquelle une ischémie se développe et les paramètres intrinsèques et extrinsèques du patient doivent être pris en compte. De plus, des expériences plus récentes ont mesurées une pression moyenne des capillaires sanguins égale à 47 mmHg au lieu de 32 mmHg (Defloor, 1999).

Le muscle est le tissu le plus sensible aux lésions ischémiques (voir **tableau 3**) et sa vulnérabilité est liée aux types de fibres musculaires composant le muscle (type I oxydative étant les plus sensible) (Blaisdell, 2002).

Tissu	Durée critique d'ischémie
Muscle	4 heures
Nerf	8 heures
Graisse	13 heures
Peau	24 heures
Os	4 jours

Tableau 3 : Durée critique d'ischémie des différents tissus. D'après Steinau, 1988

En conditions physiologiques, les cellules respirent en mode aérobie, c'est-à-dire que notre organisme oxyde trois acides gras provenant de notre alimentation : l'acétyl coenzyme A, l'acide acétoglutarique et l'acide oxaloacétique en dioxyde de carbone (CO₂) par l'intermédiaire du **cycle de Krebs** pour **générer de l'énergie sous forme d'ATP et des équivalents de réduction (H⁺)**. L'oxygène est l'accepteur final d'électrons.

En l'absence d'oxygène, durant une ischémie (voir **figure 16**), la cellule passe en mode anaérobie pour générer de l'énergie et l'accepteur final d'électron sera une molécule organique. Brièvement, la cellule génère de l'ATP via la glycolyse (oxydation de glucose). Or en ischémie, pour continuer à produire de l'ATP, la cellule doit réoxygéner le NADH en NAD⁺ par fermentation (oxydation sans oxygène) lactique. La cellule produit et stock une concentration croissante de radicaux libres. Le rendement en énergie via la voie anaérobie est inférieur à la voie aérobie et augmente la concentration d'**acide lactique** intracellulaire qui acidifie le pH cellulaire et est toxique pour la cellule. La diminution de stock d'ATP entraîne une inactivation de l'**échangeur ionique Na⁺/K⁺**. Pour rétablir un pH physiologique à 6 (Carter et al., 1967), l'échangeur H⁺/Na⁺ expulse les ions H⁺ mais augmente *de facto* la concentration de Na⁺ intracellulaire. L'augmentation de Na⁺ active à son tour l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ pour expulser l'excès de Na⁺ mais entraîne l'entrée de Ca²⁺ dans le cytoplasme. Or faute d'ATP disponible, l'utilisation des pompes Ca²⁺ (ATP-dépendantes) est impossible et le Ca²⁺ s'accumule dans le milieu intracellulaire. **L'homéostasie calcique** n'est plus assurée par la cellule qui active les lysozymes et la phospholipase A₂ dont la fonction est de dégrader les phospholipides membranaires. La métabolisation des phospholipides membranaires entraîne la libération des acides gras libres, des médiateurs d'inflammation (cytokines pro-inflammatoires) et de détergents des membranes cellulaires. *In fine*, l'ischémie induit un déséquilibre ionique et une perméabilisation des membranes cellulaires qui contribue à un **œdème cellulaire** (Loerakker, 2007; Pottecher, 2012; Rubin et al., 2008).

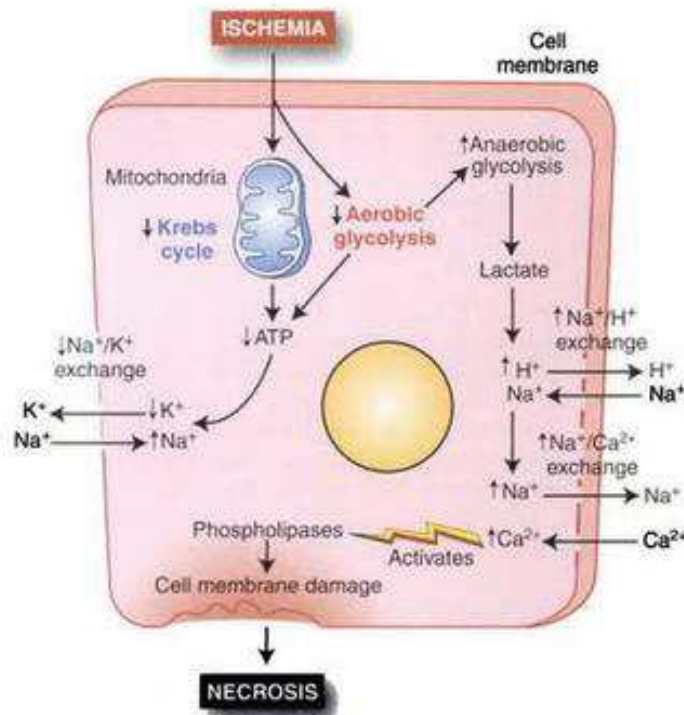


Figure 16 : Cascade des évènements moléculaires de l'ischémie à la lésion tissulaire. D'après Rubin, 2008

Le niveau de lésion tissulaire est fonction de la durée d'ischémie. Néanmoins, le mode anaérobie temporaire des cellules permet une **réversibilité des lésions jusqu'à 4 heures d'ischémie**. Des expériences d'ischémie de membres ont montrés qu'après 6 heures d'ischémie 80% du stock d'ATP initial était consommé et que la nécrose musculaire s'était installée. Respectivement après 3, 4 et 5 heures d'ischémie totale de membre, la myonécrose atteignait 2, 30 et 90% du tissu musculaire (Blaisdell, 2002).

En regard du rôle de l'ischémie seule ou ischémie isolée sur le développement des escarres, les études se concentrent majoritairement sur des modèles cutanés et non musculaires : le seuil de pression partielle en oxygène de 10 mmHg (1,3 kPa) est retenu comme limite ischémique dans le tissu cutané humain. Il est intéressant de relever que le flux sanguin diminue linéairement avec une augmentation de la contrainte mécanique exercée sur la peau. La pression partielle en oxygène (pO_2) chez le volontaire sain diminue plus rapidement dans le tissu musculaire directement en contact avec les proéminences osseuses comparé aux muscles centraux (Bouten, 1996). Des études musculaires chez le rat montrent que 3 heures d'ischémie engendrent une augmentation de Ca^{2+} dans le cytoplasme qui vient libérer *in fine* l'O-phosphoserine, un dérivé phosphorylé de la sérine et de l'acide phosphorique et un composant de la membrane cellulaire (Grisotto et al., 2000). La concentration de glutathion et

de malondialdéhyde qui sont deux composés chimiques impliqués dans l'état redox de la cellule restent stable après 3 heures d'ischémie. En résumé, la concentration d'espèces oxygénées réactives augmentent durant l'ischémie mais l'équilibre redox est néanmoins maintenu (Pottecher, 2012). La chaîne respiratoire mitochondriale et le potentiel d'action de la membrane interne mitochondriale sont significativement réduits après 5 heures d'ischémie isolée chez le rat (Brandão et al., 2003).

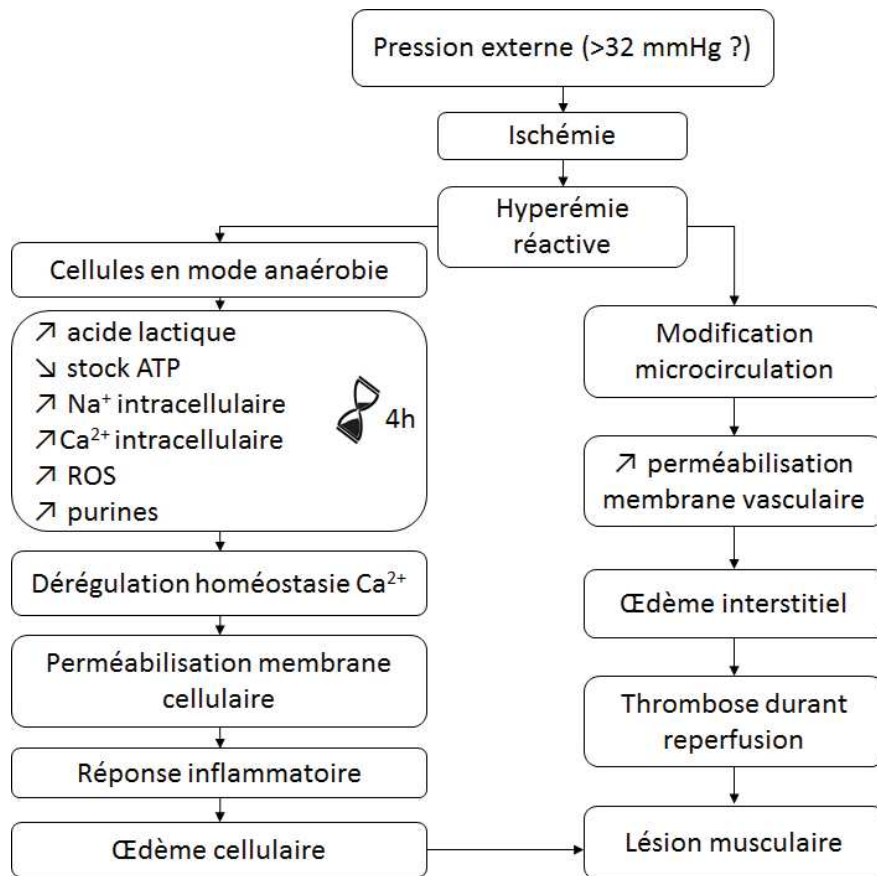


Figure 17 : Cascade d'évènements après une ischémie entraînant des lésions musculaires

En plus des lésions musculaires, l'ischémie modifie la **microcirculation** (circulation sanguine dans des vaisseaux de diamètre inférieur à 150 μm). Après l'interruption de la circulation sanguine, la membrane cellulaire des cellules capillaires s'invagine vers la lumière des capillaires. Plus la durée de l'ischémie se prolonge, plus les modifications de la microcirculation seront importantes induisant une augmentation de la perméabilité vasculaire et le développement d'un **œdème interstitiel** (Blaisdell, 2002). Pour limiter les lésions, il est donc primordial de réduire au minimum la durée d'ischémie isolée, la **réoxygénation des tissus** : la reperfusion doit être engagée le plus rapidement possible.

Ischémie-reperfusion



Cas clinique

Escarre ischiatique d'un patient paraplégique suite à une demi-journée de transport d'encombrants sur ses genoux.

Figure 18 : Exemple de cas clinique d'une escarre ischiatique chez un patient paraplégique

L'**ischémie reperfusion** ou **I/R** est une condition pathologique définie par une diminution initiale ou un arrêt de la circulation sanguine suivi de la restauration de la perfusion et de la réoxygénation des tissus. La restauration de la circulation sanguine peut dans de nombreux scénarios exacerber une lésion tissulaire et engendrer une **réaction inflammatoire**, appelé aussi **lésion de reperfusion**. L'I/R est impliquée dans de nombreux processus de mort cellulaire : de l'infarctus du myocarde à l'AVC (Eltzschig and Eckle, 2011). A l'image d'un clamage cardiaque, la reperfusion est souhaitée le plus tôt possible mais s'accompagne de nécroses hémorragiques du cœur qui sont souvent létales pour le patient (Cerra et al., 1975). Le même mécanisme s'applique au muscle squelettique.

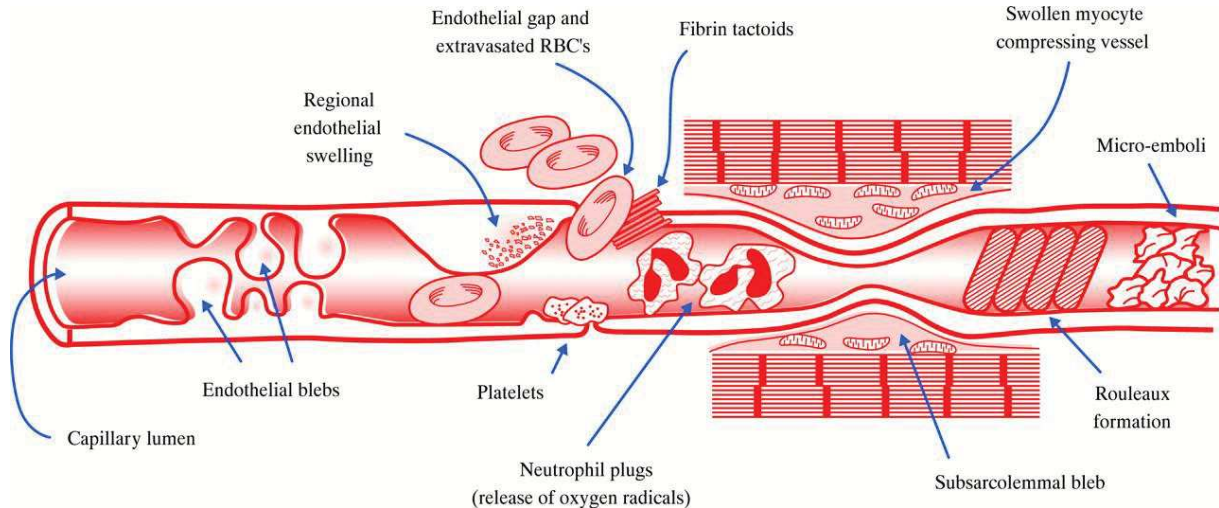


Figure 19 : Schématisation de différents mécanismes cellulaires impliqués dans le phénomène de « no-reflow ». D'après Reffelmann et Kloner, 2002.

En plus des lésions de reperfusion, la microcirculation peut être impactée par le phénomène de « **no-reflow** ». Il désigne une occlusion totale, permanente, localisée d'un système capillaire après une ischémie critique. Même après une reperfusion des tissus, les capillaires sanguins n'assurent plus la circulation sanguine au niveau des zones de « no-reflow ». Si l'ischémie des muscles squelettique se

prolonge après 6 heures, il n'y a pas de modification du flux entre l'ischémie et la reperfusion (Ikebe et al., 2001) *A contrario*, le flux sanguin post-ischémie de 90 minutes et de 3 heures augmentent significativement après 10 minutes et 2 heures de réoxygénation, respectivement. La mise en place du « no-reflow » a plusieurs hypothèses, illustrées **figure 19** et décrites par ailleurs dans la littérature (Blaisdell, 2002; Reffelmann and Kloner, 2002) :

- (1) thrombose et protubérances endothéliales,
- (2) gonflement des cellules capillaires endothéliales,
- (3) augmentation de la pression extravasculaire due à la formation d'un œdème interstitiel.

A la fin de l'ischémie, la cellule est en mode anaérobie : la concentration de lactate est importante, créant une acidose. La concentration de Na^+ et Ca^{2+} intracellulaire est majorée et le stock d'ATP est réduit en fonction de la durée de l'ischémie. Directement après la reperfusion, l'échangeur Na^+/H^+ et le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ sont activés pour rétablir un pH physiologique. Si la mitochondrie résume correctement son rôle de poumon de la cellule, c'est-à-dire si l'ischémie n'a pas été prolongée après 5 heures, la production d'ATP est rétablie dans la cellule. La pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ expulse dans un premier temps l'excédent de Na^+ et en échange augmente sa concentration calcique cytoplasmique (voir **figure 20** et **figure 21**). Puis, grâce au nouveau stock d'ATP, la pompe Na^+ permet de réguler l'excédent d'ions sodiques pendant que l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ rejette le surplus calcique et rétablit l'homéostasie ionique (Piper et al., 2003, 2004; Pottecher, 2012).

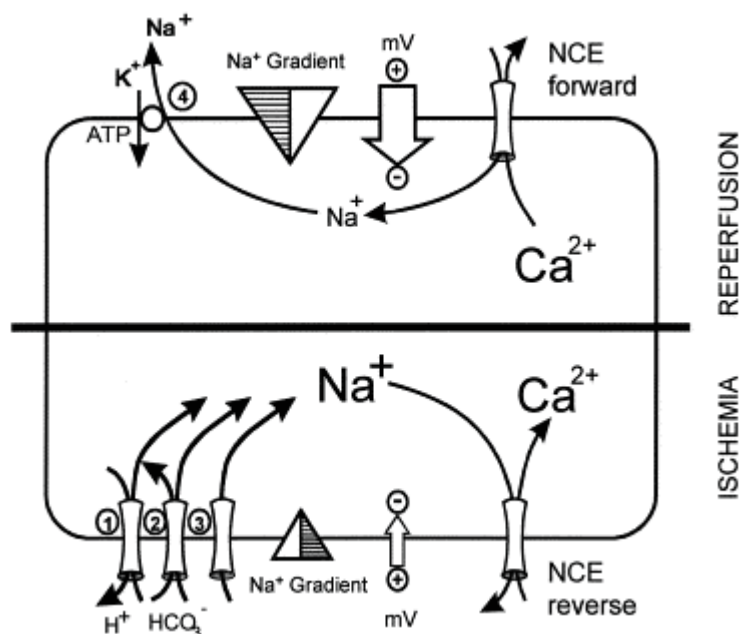


Figure 20 : Schématisation des échanges ioniques dans la cellule en ischémie et IR. D'après Piper et al, 2003. NCE = échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

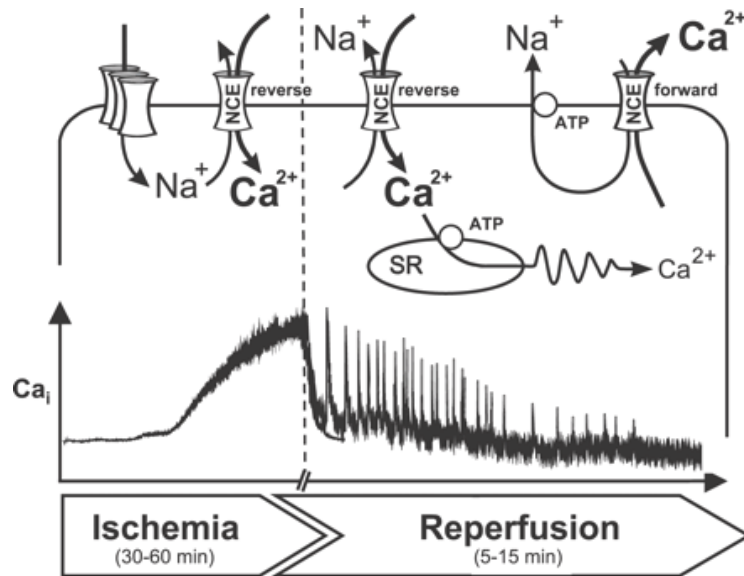


Figure 21 : Variation calcique intracellulaire durant les phases d'ischémie et reperfusion. D'après Piper et al, 2004. NCE = échangeur Na⁺/Ca²⁺

Comme illustré sur la **figure 21**, l'I/R s'accompagne d'une accumulation massive de calcium intracellulaire. Le pic de calcium intervient dans les premières minutes de la reperfusion quand le sang chargé en nutriments vient réoxygéner les cellules en mode anaérobie. Afin de prévenir des lésions musculaires dues à une surcharge calcique, (Smith et al., 1990) s'est intéressé à réduire la charge calcique extracellulaire pendant la phase de reperfusion. Brièvement, les muscles squelettiques de chien ont été reperfusés après 5 heures d'ischémie soit avec une reperfusion de sang oxygéné soit avec une solution à faible concentration calcique (0,11 mM Ca²⁺). La charge totale de calcium musculaire pré-ischémie et à la fin de l'ischémie est identique pour les 2 groupes. Les muscles traités avec la solution à faible concentration calcique ont une charge totale Ca²⁺ stable pendant les 30 premières minutes de reperfusion puis augmente de manière linéaire, similaire à l'augmentation du groupe contrôle dès le début de la reperfusion. Le pourcentage nécrotique des muscles 48 heures post-reperfusion est identique entre les 2 groupes, suggérant qu'une limitation de l'afflux calcique lors de la reperfusion retarde l'entrée de calcium intracellulaire mais ne prévient pas la nécrose musculaire. Par contre, une reperfusion graduelle limitera les lésions histopathologiques et favorisera un retour à l'état basal de l'activité potassique dans un modèle d'ischémie isolée de reins de rats. D'un autre côté, la reperfusion graduelle n'a pas d'effet sur la libération des marqueurs de stress oxydant (malonyldealdéhyde et myeloperoxydase), impliqués dans la peroxydation lipidique. Une reperfusion sur plusieurs minutes pourrait être bénéfique pour une ischémie isolée de 45 minutes (Durrani et al., 2006).

L'arrivée d'oxygène dans la cellule en mode anaérobie et donc chargée en radicaux libres crée des **espèces réactives oxygénées (ROS)**. Le lecteur est invité à consulter les articles suivants pour plus d'informations (Dhalla et al., 2000; Honda et al., 2005; Murphy and Steenbergen, 2008; Zorov et al., 2006). Succinctement, la xanthine oxydase catalyse la formation à partir de xanthine, d'oxygène et d'eau pour produire de l'acide urique et du **peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**. En excès, H₂O₂ est converti en **radical hydroxyle (OH[•])** en concentration dépassant les mécanismes de défense anti-oxydatifs cellulaires. Les radicaux hydroxyles sont impliqués dans :

- (1) la **peroxydation lipidique** qui détruit les chaînes d'acides gras polysaturés, les phospholipides et augmente la perméabilité membranaire,
- (2) les **lésions oxydatives** en interagissant avec les protéines intracellulaires,
- (3) les **lésions de l'ADN**.

L'augmentation des ROS et l'afflux calcique entraînent une **dépolarisation de la membrane mitochondriale** et *de facto* un découplage de la chaîne respiratoire. Ces altérations sont suivies d'une **libération de facteurs apoptotiques** de la mitochondrie vers le cytoplasme tels que le cytochrome C, des cytokines pro-inflammatoires et une **activation des caspases**.

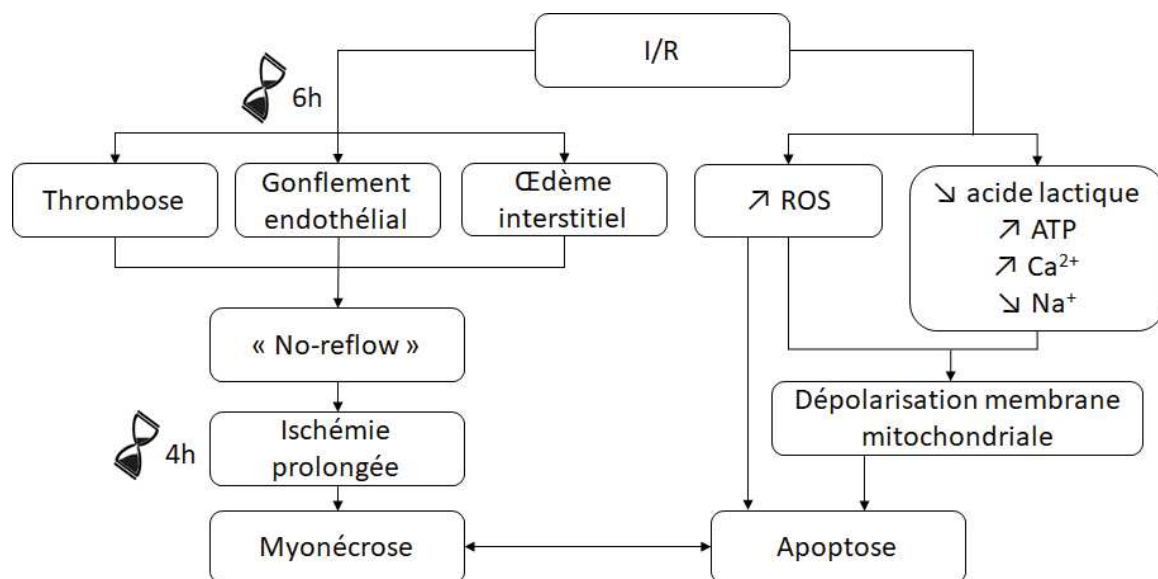


Figure 22 : Cascade d'évènements après ischémie/reperfusion dans le tissu musculaire

La membrane phospholipidique des muscles squelettiques de rat est lésée après une ischémie isolée de 3 heures mais les marqueurs de stress oxydant sont stables. Par contre, après 45 minutes de reperfusion, la concentration de glutathion oxydé et l'expression de malondialdéhyde augmentent dans les tissus musculaires. Une augmentation du glutathion oxydé est rapportée alors que la synthèse en glutamine diminue. Ces résultats supportent l'hypothèse qu'après 3 heures d'ischémie isolée et 45

minutes de reperfusion, un stress oxydant induit une peroxydation lipidique et une destruction de la membrane plasmique (Grisotto et al., 2000).

L'impact de l'ischémie reperfusion dans le développement d'escarre a été étudié sur plusieurs modèles animaux (rongeurs et porcins principalement) (Stekelenburg et al., 2005). Ces études ont permis de montrer qu'à durée égale d'ischémie, les **cycles d'ischémie reperfusion sont plus délétères que l'ischémie isolée** pour le tissu musculaire et le tissu cutané (Peirce et al., 2000).

Les muscles jambiers de rats sont soumis à des cycles I/R de 2 heures de compression à 166 mmHg suivis de 30 minutes de reperfusion. Le nombre de cellules inflammatoires augmente proportionnellement au nombre de cycles d'I/R. L'expression des protéines CHOP et GRP78, impliquées dans le stress du RS, augmentent respectivement après 1 cycle d'I/R et à 3 cycles par rapport au groupe contrôle. Après une augmentation initiale par rapport au contrôle, les ratios de la forme phosphorylée d'Akt sur Akt et celui de p-GSK/GSK baissent proportionnellement au nombre de cycles d'I/R. Le **stress du RS** et les marqueurs pro-apoptotiques s'expriment **graduellement en fonction du nombre d'I/R** mais les dérégulations commencent après 1 cycle I/R (Cui et al., 2016).

Deux cycles de compression à 100 mmHg durant 6 heures, suivis de 18 heures de reperfusion sont appliqués aux muscles jambiers de rats. Il est décrit une augmentation significative du nombre de noyaux interstitiel et de l'aire de l'espace interstitiel comparé au contrôle (Sin et al., 2013). 72% des noyaux sont marqués positifs à des lésions oxydatives de l'ADN après 2 I/R. L'expression des enzymes antioxydantes SOD2 diminue de manière constante entre 1, 2 et 3 cycles d'I/R. Les marqueurs de stress nitrosylé augmentent après 2 cycles d'I/R. L'administration d'un antioxydant (le Resvatrol) prévient l'apparition des lésions histologiques et l'augmentation du stress oxydant et nitrosylant (Sin et al., 2013).

Les modèles, même disparates d'escarre induite par l'I/R montrent des lésions musculaires à partir d'un seul cycle d'I/R mettant en évidence la vulnérabilité des tissus face aux ROS. Les lésions seront proportionnelles au nombre de répétition de la reperfusion.

Couplage excitation-contraction

Nous avons pu voir, au travers des différentes hypothèses de ce chapitre, pouvant expliquer le développement des escarres que le calcium est un messager secondaire clé (Gissel, 2005). En effet, dans le monde vivant, les variations calciques intracellulaires doivent toujours être étroitement régulées à l'aide de mécanisme ON/OFF (voir **figure 23** et **tableau 4**). La concentration de Ca^{2+} dans le

cytoplasme est en condition physiologique de l'ordre de 100nM au repos tandis que sa concentration dans le milieu extracellulaire, par-delà la membrane plasmique, est de 1 à 2 mM. Si la concentration calcique est trop importante, le Ca^{2+} libre se lie à groupes phosphates de l'ATP pour former des précipités de phosphate de calcium.

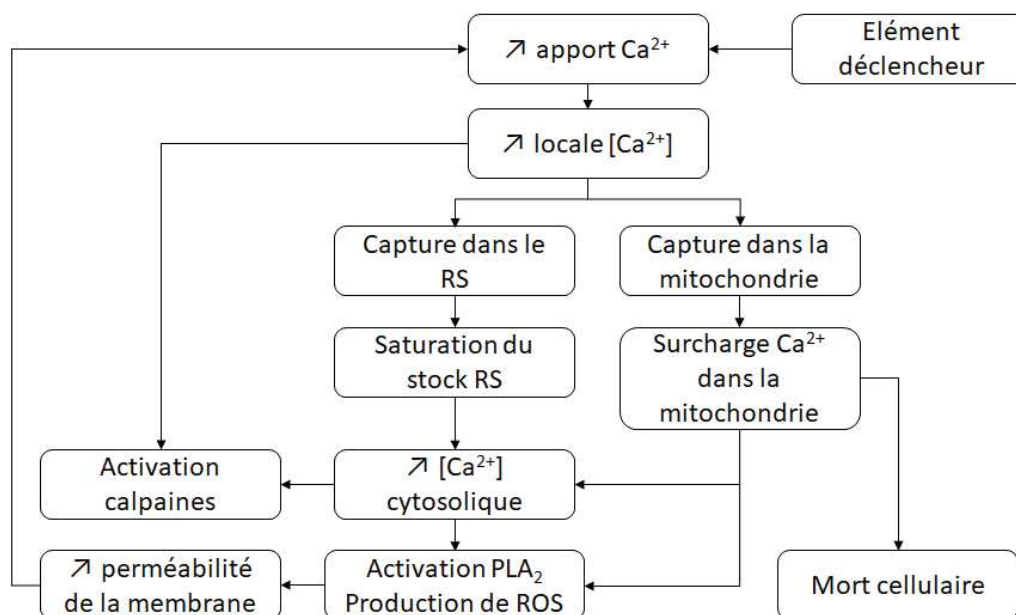


Figure 23 : Cercle vicieux de dérégulation de l'homéostasie calcique. D'après Gissel, 2005

ON	OFF
<p>Canaux calciums dépendants du voltage : activés en réponse à une dépolarisation de la membrane. En fonction du canal, il y a un seuil d'activation haut ou bas. Les canaux sont de type L ou T. Les canaux de type L sont sensibles aux dihydropyridines.</p>	<p>Pompes SERCA : ou Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase sont situées dans la membrane du RS et capturent le surplus Ca^{2+} cytoplasmique dans le RS. Première voie de diminution de la concentration de Ca^{2+} libre dans le cytosol. C'est un processus actif qui nécessite l'hydrolyse d'ATP et qui a une cinétique lente par rapport au relâchement Ca^{2+} par le RyR.</p>
<p>Canaux Transient Receptor Potential : présents dans la membrane plasmique, ils sont perméables au Ca^{2+} et participent à la reconstitution de la réserve calcique du Réticulum Sarcoplasmique (RS).</p>	<p>Echangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: extrusion du Ca^{2+} cytoplasmique vers le milieu extracellulaire. 2 modes « reverse » et « forward » permettant l'échange d'un ion Ca^{2+} pour 3 ions Na^+.</p>

<p>Récepteurs de la Ryanodine (RyR) : situés dans la membrane du RS. Leurs caractéristiques sont développées ci-après.</p>	<p>Pompes Ca^{2+}-ATPase : transport actif nécessitant l'hydrolyse d'ATP qui expulse le Ca^{2+} cytoplasmique vers le milieu extracellulaire contre son gradient électrochimique.</p>
<p>Récepteurs IP3 : récepteurs à l'inositol 1,5-triphosphate présents dans la membrane du RS. La probabilité d'ouverture du récepteur est liée à la concentration de Ca^{2+}</p>	<p>Protéines tampons liant le Ca^{2+}: « calcium binding proteins » dont la calmoduline et la calsequestrine</p>

Tableau 4 : Systèmes de régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire ON/OFF

Le **réticulum sarcoplasmique (RS)** est le réservoir de Ca^{2+} intracellulaire et a 3 rôles principaux à jouer dans l'homéostasie calcique :

- (1) libération du Ca^{2+} dans le cytosol via le récepteur à la Ryanodine (RyR),
- (2) recapture du Ca^{2+} cytosolique via les pompes SERCA
- (3) stockage des protéines tampons du Ca^{2+} dans la lumière du RS.

La concentration calcique au repos est faible dans le milieu intracellulaire, néanmoins durant la contraction musculaire, le Ca^{2+} doit rapidement augmenter pour permettre le glissement des filaments d'actine et de myosine. Le **couplage excitation-contraction (CEC)**, définit le processus suivant lequel la membrane plasmique est dépolarisée et active le relargage du Ca^{2+} du RS au cytoplasme. Ce processus est très bien décrit ailleurs dans la littérature (Bers, 2002; Ebashi, 1991; Bichraoui, 2010; Calderón et al., 2014; Rebbeck et al., 2014; MacIntosh et al., 2012) aussi il sera abordé brièvement dans cet état de l'art.

Le CEC est un processus de transduction du signal qui convertit une stimulation électrique en mouvement et/ou contraction musculaire. Un potentiel d'action se propage sur la membrane plasmique et active le récepteur aux dihydropyridines (DHPR) (voir **figure 24**) qui est lui-même couplé mécaniquement, dans les muscles striés squelettique, aux récepteurs de la Ryanodine. Le récepteur de la Ryanodine (RyR) est un homotétramère constitué de 4 sous-unités de 565 kDa chacune. Les sous-unités sont connectées sur des régions dites de « clamp ». Ce complexe est situé dans la membrane du RS, avec une région transmembranaire et une région cytoplasmique majoritaire (encart **figure 24**). Il existe 3 isoformes de RyR dans le corps humain :

- (1) **RyR1** retrouvé majoritairement dans le muscle squelettique, c'est l'isoforme étudié dans ce manuscrit,
- (2) RyR2 prépondérant dans le muscle cardiaque,
- (3) RyR3 détecté dans le cerveau et des cellules musculaires lisses.

La structure cristallographique a été découverte dernièrement en 2015 grâce aux développements la cryomicroscopie électronique (Zalk et al., 2015). Pour des informations complémentaires sur la structure du RyR, le lecteur est adressé aux articles suivants (Clarke and Hendrickson, 2016; Seo et al., 2015; Williams et al., 2018; Yuchi et al., 2015).

La cinétique de relargage des ions Ca^{2+} est extrêmement rapide, le canal a une conductance élevée pour le Ca^{2+} de 100 pS à 50 mM Ca^{2+} et une faible sélectivité (rapport de perméabilité de 5 avec le Na^+ et de 6 avec le K^+ (Smith et al., 1988). Ainsi, lors de l'activation de DHPR, le canal calcique s'ouvre pour créer un **transitoire calcique**, c'est-à-dire un pic de la concentration pour le Ca^{2+} cytosolique qui immédiatement utilisé pour la contraction des fibres musculaires (**figure 24**).

Le RyR1 interagit avec de nombreux ligands tels que l'ATP, le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} et de nombreuses protéines (Lanner et al., 2010). Dans cette revue, nous détaillerons uniquement le lien avec sa protéine stabilisatrice la **calstabin1** ou **FKBP12**. Le RyR est également soumis à des **modifications post-traductionnelles** qui régulent son fonctionnement (Kushnir et al., 2018). En effet, le RyR1 est un assemblage de 80 à 100 cystéines dont une vingtaine facilement oxydable, nitrosylée, alkylée ou glutathionilée. Il est sensible aux modifications redox qui altèrent la sensibilité et la fréquence d'ouverture et de fermeture du canal, créant un phénotype de **fuite calcique** appelé aussi « **leaky RyR** » (Bellinger et al., 2008). Une augmentation de la nitrosylation du RyR1 participe à une augmentation de la fuite calcique du RS vers le cytoplasme et à une diminution de la force musculaire (Bellinger et al., 2009). Une hyperphosphorylation sur un site PKA peut induire une dissociation de la calstabin1 et une fuite calcique du complexe (Kushnir et al., 2018; Reiken et al., 2003). Le RyR1 peut également présenter une phosphorylation sur la sérine 2843 (voir **figure 25**). Les phosphorylations sur la sérine 2808 sont essentiellement le résultat de PKA et la CAMKII phosphoryle le site de la sérine 2015 (Wehrens et al., 2004).

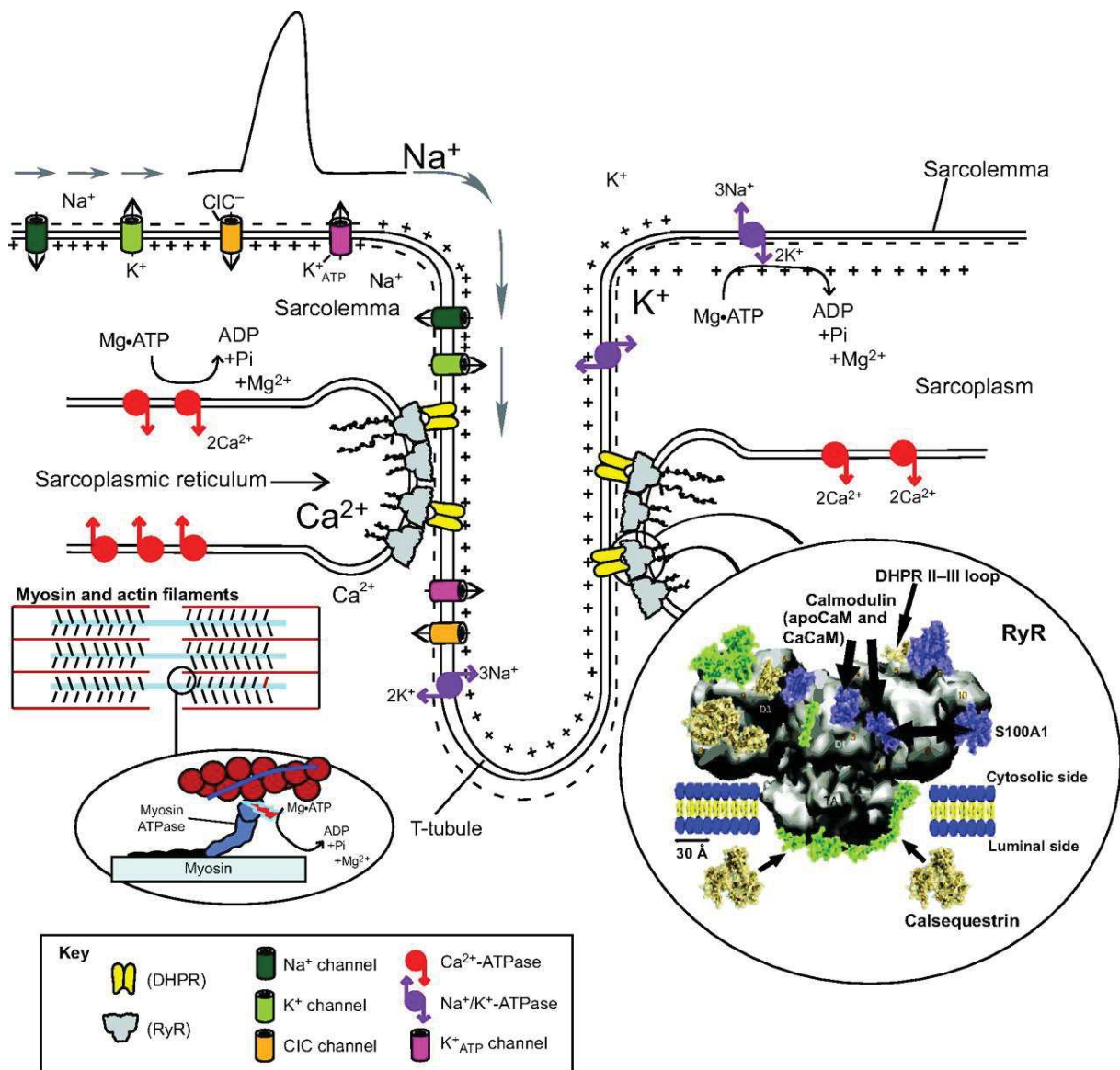


Figure 24 : Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique, représentation des différents mécanismes. D'après MacIntosh et al, 2012

La **Calstabin1** ou **FKBP12** est une protéine cytoplasmique de 12 kDa qui stabilise le RyR. A raison de 4 protéines de calstabin pour une protéine de RyR, ce récepteur chaperonne le canal en coordonnant sa fermeture et son ouverture (voir **figure 25**). Lors d'une **dissociation entre RyR et calstabin**, la probabilité d'ouverture du canal augmente, entraînant des états de sous conductance (désynchronisation des 4 sous-unités de RyR) et une fuite calcique du type « leaky RyR » qui peuvent générer des situations pathologiques (Bellinger et al., 2008; Fauconnier et al., 2011).

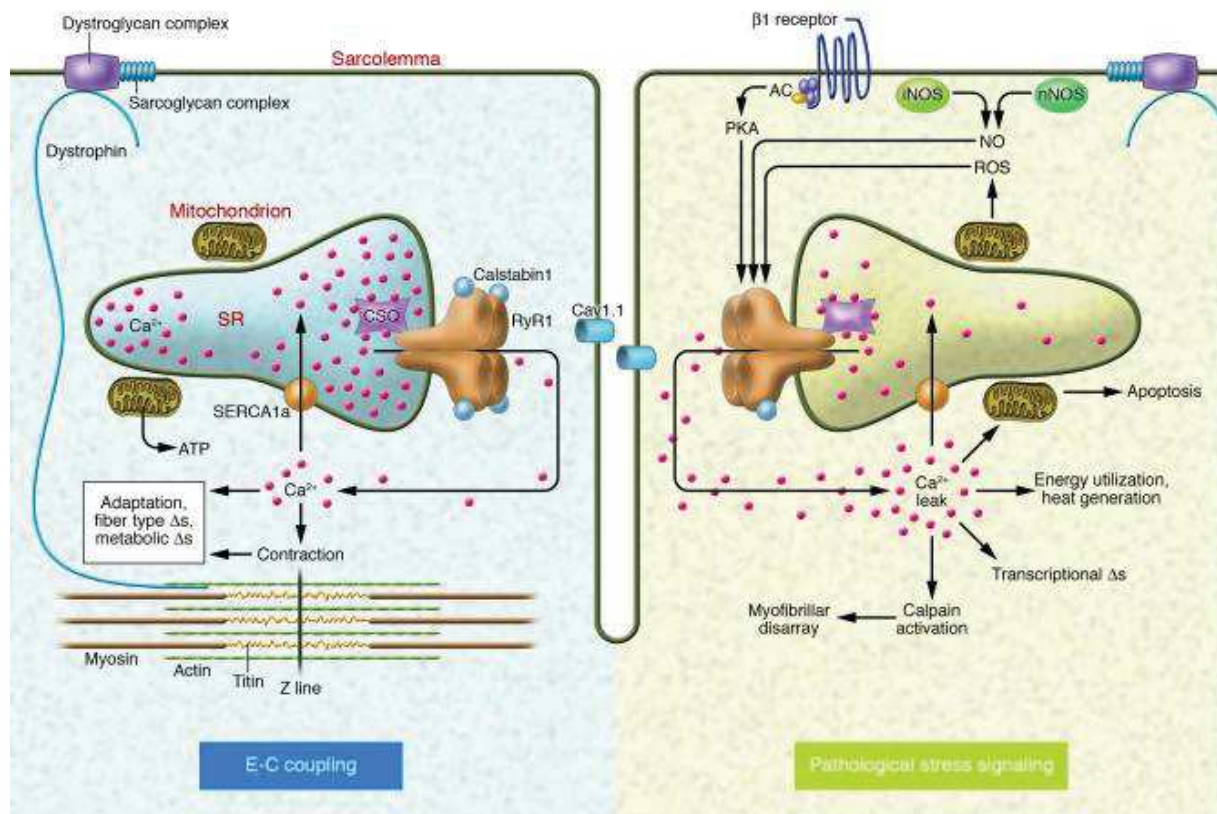


Figure 25 : Schématisation du couplage excitation contraction en situation physiologique et en situation de stress. D'après Bellinger, Mongillo et Marks, 2008.

D'un point de vue **pharmacologique**, de nouvelles drogues stabilisatrices de l'interaction RyR/calstabin, appelées **Rycal**, promettent des résultats intéressants sur un large éventail de pathologies où une fuite calcique a été identifiée (dystrophie de Duchenne, sarcopénie, dysfonction cardiaque, diabète, Alzheimer, etc.) (Marks et al., 2014). Un dérivé de 1,4-benzothiazépine, le **S107** permet par voie orale ou par injection, de traiter des animaux pour réduire la fuite calcique (Andersson and Marks, 2010; Wehrens et al., 2005). A ce jour, l'implication de ce canal n'a pas été mise encore en évidence lors de mécanismes de compression du tissu musculaire et de l'établissement d'escarres.

Résumé chapitre 1

Historiquement, l'étiologie des escarres fait apparaître comme étape initiale une ischémie des tissus musculaires, situés entre une proéminence osseuse et une contrainte mécanique appliquée sur la peau. Or même si le tissu musculaire est susceptible de présenter des lésions plus rapidement que le tissu adipeux ou cutané après une ischémie, les cellules musculaires squelettiques tolèrent le mode anaérobie pendant 4 heures avant les premières lésions irréversibles. Une escarre peut malheureusement se développer en moins de deux heures. Aussi les mécanismes à l'origine du développement des escarres sont plus complexes.

On distingue en plus de l'hypothèse ischémique, la déformation mécanique, l'augmentation de pression lymphatique et le phénomène d'ischémie reperfusion comme potentiels mécanismes biologiques générant des escarres. Or à chaque cas clinique, la ou les cause(s) peut varier. Néanmoins, un fil conducteur persiste entre toutes ces hypothèses en une dérégulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Un cercle vicieux se met en place dans la cellule musculaire et peut générer une myonécrose. Le récepteur de la Ryanodine est un des acteurs clés qui permet l'afflux de calcium du stock intracellulaire (le réticulum sarcoplasmique) vers le cytosol. C'est également une des cibles des mécanismes oxydants qui affectent son fonctionnement et entraînent des fuites calciques.

Le tissu musculaire est le foyer des escarres mais ces lésions se propagent également dans le tissu cutané et le tissu adipeux. Aujourd'hui, la médecine se tourne vers des biomarqueurs systémiques pour détecter les lésions musculaires précoces et enrayer le développement des escarres avant que la plaie n'apparaisse.

Chapitre 2 : Interactions avec le tissu cutané et altérations systémiques

Si les escarres semblent se développer en premier lieu dans le dans le tissu musculaire et affectent également le tissu cutané, une atteinte directe du tissu cutané peut également être observée à l'image de l'escarre talonnière, **figure 26**. Les escarres peuvent donner lieu à des chocs septiques, des ostéomyélites, résections osseuses voire des amputations. Par quel mécanisme une affection musculaire peut-elle perturber l'ensemble de l'organisme ? Dans ce chapitre, nous décrirons les liens entre escarre et tissu cutané et altérations systémiques. Cette dernière partie s'intègre dans la recherche de biomarqueurs spécifiques qui détecteraient la survenue d'escarres. Une prise en charge rapide permettrait d'agir avant la perte de tissu cutané qui favorise l'infection et de limiter la durée de cicatrisation.

Tissu cutané



Cas clinique

Le talon et l'occiput sont des zones anatomiques à fort risque de développement d'escarres lorsque le patient est alité. Pourtant, il n'y a pas de muscle entre la peau et le calcanéum. L'escarre talonnière se développe directement dans le tissu sous-jacent.

Figure 26 : Exemple de cas Clinique d'une escarre talonnière de stade 3 ©Gordian Medical, Inc. dba American Medical Technologies

La peau est l'organe humain dont la superficie est la plus étendue. Elle a plusieurs fonctions dont :

- (1) La protection contre les agressions extérieures,
- (2) L'homéostasie de l'organisme,
- (3) La thermorégulation,
- (4) Le sens du toucher.

La structure du tissu cutané est divisée en 3 feuillets : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (voir **figure 27**). L'**épiderme** est le feuillet le plus fin, composé à 80% de kératinocytes qui sont subdivisés en 4 à 5 strates. Ces cellules produisent la kératine, une protéine fibreuse qui contribue à la protection contre les agressions extérieures. Leur régulation est assurée par un gradient calcique (Elias et al., 2002) et

des facteurs de croissance : EGF et TGF α stimulent la migration et la prolifération des cellules, alors que TnF- α et TGF β inhibent la prolifération des kératinocytes et stimulent leur différenciation (Ferraq, 2007). L'épiderme est dépourvu de réseau sanguin mais est alimenté en nutriments par les papilles du derme.

Le **derme** est une structure organisée de fibres d'élastine et de collagène. La présence de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques alimentent les composants décrits **figure 27**. Les **fibroblastes** et les **cellules migratrices** se côtoient et ont respectivement à charge la synthèse des composants de la **matrice extracellulaire** et la **réponse immunitaire**. C'est également un lieu de stockage de l'eau de l'organisme (de 20 à 40%) dans la substance fondamentale. La distribution des capillaires sanguins dans le derme est fonction des paramètres intrinsèques au patient dont l'âge et la zone anatomique observée. Sur le même patient âgé, la zone sacrée présente une diminution de l'épaisseur du derme papillaire et une meilleure distribution des capillaires sanguins que dans la zone ischiatique (Hagisawa et al., 2001).

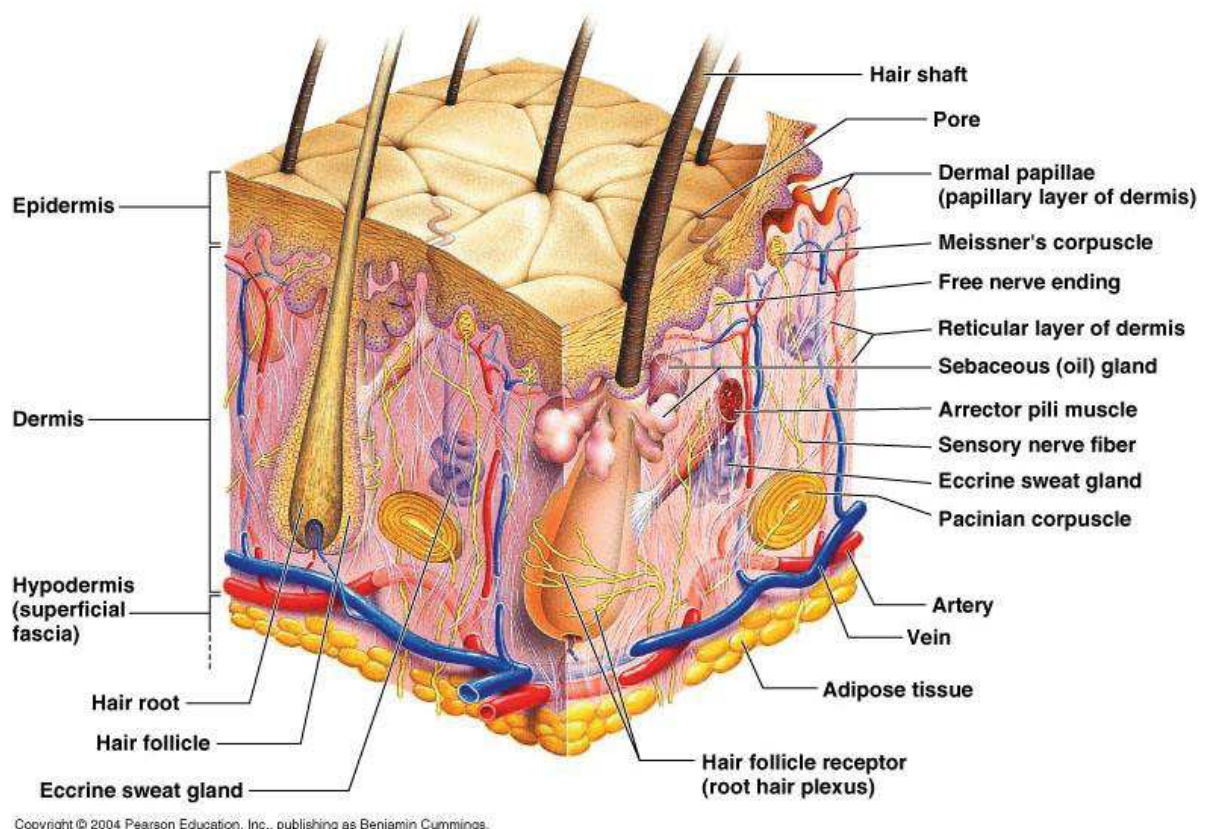


Figure 27 : Structure du tissu cutané ©2004 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cumming

La matrice extracellulaire est un réseau organisé de fibres de collagène et d'élastine. Leurs propriétés mécaniques sont celles d'un **matériau visco-élastique** capable de s'allonger et de se rétrécir (Hagisawa and Shimada, 2005). Lors d'une tension, les fibres s'alignent suivant l'orientation de la contrainte mécanique, déplaçant la substance fondamentale et le liquide interstitiel. Les fibres absorbent et transmettent la contrainte comme décrit dans le **chapitre 1**. Le **comportement mécanique de la matrice extracellulaire est fonction de l'intensité et de la durée de contrainte**. Dans le cas d'une contrainte brève, la déformation sera élastique avec une faible résistance et un retour rapide à l'état initial. *A contrario*, une contrainte prolongée induira une résistance à la déformation et un délai avant le retour des fibres à leur état initial. Si l'intensité de contrainte dépasse un seuil, les fibres de collagène seront irréversiblement déformées avec perte de leur conformation initiale (Gibson et al., 1965; Hagisawa and Shimada, 2005).

L'**hypoderme** est le feuillet sous-jacent au derme. C'est un **tissu conjonctif contenant des adipocytes** qui servent de réserve énergétique. L'hypoderme distribue la pression en fonctionnant comme un **airbag lors d'une compression**. La peau dorsale de souris ayant reçu un régime standard et un régime hypercalorique de 2 à 12 semaines est comprimée 4 heures à 82 mmHg. Les souris du régime hypercalorique de 12 semaines ont un hypoderme plus épais, une meilleure perfusion à 12 heures post-compression et moins de lésions cutanées 24 heures post-compression comparées aux autres groupes (Nguyen-Tu et al., 2013).

Les résultats de plusieurs études morphologiques montrent des **modifications précoces du derme papillaire** dans des escarres de stade 1 et 2 (Arao et al., 1998; Barnett and Ablarde, 1994; Moore et al., 2015; Witkowski and Parish, 1982). Comme illustré sur la **figure 28**, la morphologie du derme papillaire est modifiée entre la zone saine (H : Healthy), la zone limitrophe (B : Boundary) et la zone qui présente une escarre de stade 2 (D : Damaged) (Hagisawa and Shimada, 2005). Avec la compression, l'apport en sang et en nutriments est réduit et le flux lymphatique diminue dans les papilles du derme. En conséquence, l'épaisseur de l'épiderme diminue, les kératinocytes meurent et la structure de collagène se rigidifie.

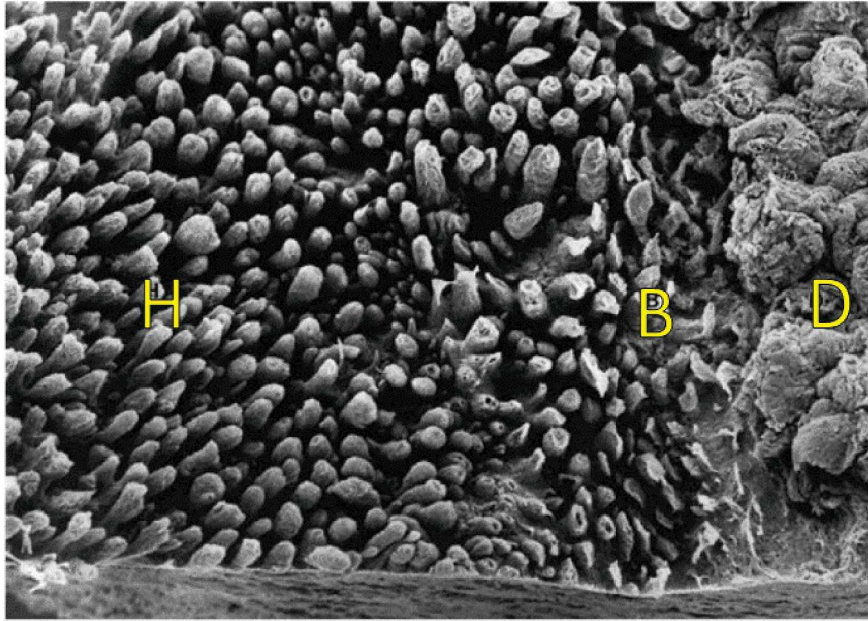


Figure 28 : Surface du derme papillaire sur une escarre de stade 2 au sacrum chez une patiente de 84 ans. H : zone saine, B : zone limitrophe, D : zone de l'escarre. X100. D'après Hasigawa et Shimada, 2005

Dues aux différences de propriétés mécaniques entre le tissu cutané et musculaire, les contraintes varient (voir modélisation par éléments finis sur **figure 5**). Il existe peu de données pour expliquer comment sont transmises les pressions dans et entre les différents tissus. Pour deux compressions externes cutanées d'intensités 106 et 152 mmHg chez le porc, **28% de la contrainte est retrouvée dans le tissu iliaque sous-jacent**. Cette augmentation de contrainte du tissu sous-cutané entraîne une élévation de 28 et 60 mmHg de la pression lymphatique respectivement (Dodd and Gross, 1991). Pour autant, l'intensité de la compression interne est maximale au plus proche de la proéminence osseuse et décroît si l'on s'en éloigne latéralement ou ventralement (**figure 28.a**). La compression interne est également fonction de la contrainte mécanique externe appliquée (**figure 28.b**). Ces résultats prouvent que la **contrainte mécanique à la surface cutanée est proportionnelle à celle appliquée dans le muscle** sous-jacents et que les **contraintes mécaniques se propagent également latéralement** dans les tissus (Le et al., 1984).

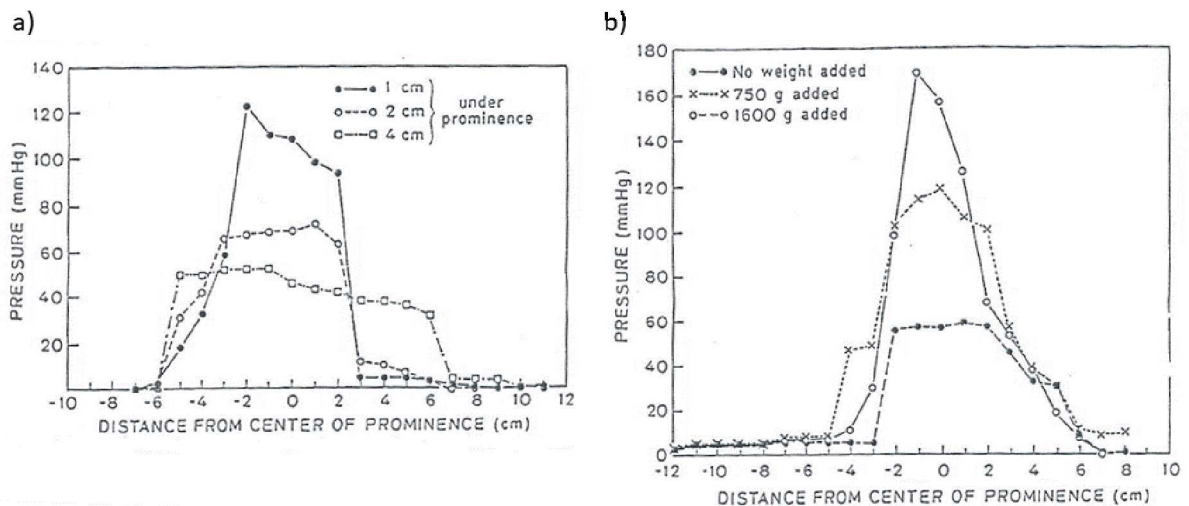


Figure 29 : Variations de la pression interne en fonction de la distance latérale par rapport à la proéminence osseuse. a) variation de la profondeur (distance ventrale) par rapport à la proéminence osseuse ; b) variation de l'intensité de la contrainte mécanique externe exercée.

D'après Le et al, 1984.

Pour étudier l'interaction entre les tissus, la **modélisation numérique** est aujourd'hui un outil indispensable. Ce sujet, très complet et en développement rapide, n'est pas exposé dans cette revue de la littérature mais le lecteur est invité à lire les références suivantes (Oomens et al., 2003; Oomens, 2005; Leopold and Gefen, 2012; Coleman et al., 2014; Macron et al., 2018; Oomens et al., 2018).

De la même manière que le tissu musculaire, les quatre hypothèses présentées dans le chapitre 1 peuvent ensemble ou séparément être les causes du développement de lésion dans la peau. Si la contrainte mécanique externe est inférieure au seuil acceptable par la cellule, la déformation est réversible. Si on excède cette limite, des mécanismes de compensation s'activeront pour régénérer la cellule ou provoqueront la mort cellulaire (Stojadinovic et al., 2013; Wang and Sanders, 2005). Une revue de 2017 résume les résultats des travaux sur le lien entre pression, cisaillement et viabilité cutané chez l'homme (Hoogendoorn et al., 2017).

Pour améliorer le sauvetage tissulaire et repousser le seuil de pression limite de dégénération, une **période d'adaptation** est possible. La peau de porcs subit des cycles quotidiens de compression associée à un cisaillement à intensité croissante sur 4 semaines (valeurs finales : 1717 et 398 mmHg respectivement). Ce régime permet une augmentation du diamètre des fibres de collagène et une diminution de leur densité sans modification de l'épaisseur épidermique par rapport au contrôle (Sanders and Goldstein, 2001). Il est possible que cette adaptation du tissu cutané passe par la

formation de nouvelles fibres de collagène au diamètre plus important et une destruction des fibres initiales par les métalloprotéines (Wang and Sanders, 2003). Ce mécanisme d'entraînement est particulièrement important pour les patients alités qu'il faut réhabituer progressivement à la station assise ou dans le cas de lambeau ou d'amputation pour rendre le tissu cutané plus résistant.

La **vasodilatation induite par la pression** (ou PIV pour Pressure-Induced Vasodilatation en anglais) est un mécanisme physiologique qui augmente le flux sanguin transitoirement suite à l'application progressive d'une contrainte mécanique. Lors de la compression progressive (5 mmHg/min) de la peau, le débit sanguin augmente dans le tissu sous-jacent créant une vasodilatation locale. Il existe donc un **couplage entre la mécanosensibilité et la vasodilatation** dans le tissu cutané. Ce système de protection dépend des fibres nerveuses capsaïcino sensibles. L'âge, certaines pathologies comme le diabète ou l'utilisation d'anesthésique modulent la PIV chez l'homme et l'animal (Saumet, 2005; Gaubert, 2008). Une altération de la PIV n'a pas été identifiée comme facteurs de risque d'escarre (Bergstrand et al., 2014). Néanmoins, une absence de PIV est synonyme de fragilité de la microcirculation. On retrouve ainsi plus fréquemment chez les diabétiques de type 1 plus une absence de PIV (Fromy et al., 2012; Koitka et al., 2004).

Biomarqueurs systémiques et locaux

La prévention des escarres passe par une identification des personnes à risque à l'aide d'échelles d'évaluation (Norton, Waterlow, Braden pour les échelles anglo-saxonnes les plus connues). Or l'utilisation en routine hospitalière de ces échelles dérive sur une utilisation non pertinente des ressources matérielles et humaines (Schoonhoven et al., 2002). Un **biomarqueur** est un paramètre mesurable et quantifiable qui est le reflet de la présence ou de la gravité d'une pathologie. Ce sont des outils précieux pour le diagnostic, le suivi temporel et la prévention. Pour être pertinent, le biomarqueur doit être facile à collecter, stable pour une analyse rapide et économique, très spécifique et sensible.

Les résultats de différentes études cliniques dont le but est d'identifier des biomarqueurs prédictifs d'escarres sont regroupés dans le **tableau 5**. Ces données s'ajoutent aux résultats d'études animales qui ont mis en évidence l'utilisation de médiateurs de l'inflammation et du stress oxydants comme potentiel biomarqueurs (Minematsu et al., 2010).

Référence	Modèle (taille population)	Echantillon	Bio-marqueur	Type de contrainte (intensité maximale)	Durée d'ischémie	Durée de reperfusion	Technique de mesure	Moment d'analyse	Résultats principaux (*=résultat significatif)
(Bader et al., 2005)	Volontaire (13)	Sueur	Lactate Acide urique Xanthine Hypo-xanthine	Compression (80 mmHg)	1h	30 min	Essai enzymatique HPLC	Pendant contrainte et Post-reperf	↗ lactate durant ischémie, niveau basal durant la reperfusion ↗ hypoxanthine et xanthine durant ischémie ↘ *acide urique durant ischémie ↘ purines durant la reperfusion (acide urique* et hypoxanthine*)
(Bonnefoy et al., 1995)	Patients âgés alités avec PU (19) Patients âgés alités sans PU (12) Volontaires âgés sans PU (12)	Sérum	IL-1 IL-6 TNF Cortisol CRP	n/a	n/a	n/a	ELISA IMX ABBOT	n/a	PU vs non PU patients alités ↗* CRP et IL-6 Patients alités vs volontaires ↗* CRP et IL-6 Patients PU vs volontaires ↗* CRP et IL-6 Stade 3 PU (n=12) vs stade 4 PU (n=7) ↗* cortisol et IL-6
(Bronneberg et al., 2006)	EpiDerm (4)	Surnageant culture	IL-1 α	Compression (100 mmHg)	2 à 20h	3h	ELISA	Post-reperf	↗ IL-1 α en fonction de l'intensité de la contrainte appliquée*.
(Bronneberg et al., 2007)	EpiDerm (24)	Surnageant culture	LDH IL-1 α IL-1RA TNF- α IL-8 MIP-3 α GRO- α MCP-1	Compression (0-200 mmHg)	24h	n/a	Essai color ELISA	Post-contr	↗ LDH proportionnelle à la pression *entre 0 mmHg et \geq 100 mmHg. ↗ cytokines avec pression ↗ IL-1 α à \geq 75 mmHg* ↗ IL-1RA à \geq 75 mmHg* ↗ IL-8 à 75 mmHg et \geq 150 mmHg* ↗ TNF- α à \geq 100 mmHg* MCP1 non détecté Pas de variation MIP-3 α et GRO- α

(Bronneberg , 2007)	EpiDerm (24)	Surnageant culture	LDH IL-1 α IL-1RA	Compression (100 mmHg)	24h	n/a	Essai color ELISA	Post-contr	↗ IL-1 α et IL-1RA après exposition s-urine pdt 4h. *entre sans et avec s-urine à 0 et 100 mmHg pour IL-1 α et 0 et 50 mmHg pour IL-1RA ↗ LDH après exposition s-urine *à 0, 50 et 100 mmHg. Lésions histologiques cutanées après exposition s-urine à 0 et 100 mmHg.
(Bronneberg , 2007)	Patient stade 1 PU (5) Patient sans PU (31)	Sebutape	IL-1 α IL-1RA IL-8	n/a	n/a	n/a	ELISA	n/a	↗ IL-1 α entre zone ctrl patient/sacrum (intra patient). Grande variabilité, patient non apparié par âge. IL-1RA et IL-8 non détectable.
(Cornelissen et al., 2009)	EpiDerm (24)	Surnageant culture	LDH IL-1 α IL-1RA TNF- α IL-8	Compression (150 mmHg)	1 à 24h	n/a	Essai color ELISA	Post-contr	↗ LDH avec durée d'application *entre 0 mmHg et \geq 1h ↗ toutes les cytokines avec durée application *entre 0 mmHg et \geq 1h ↗ TNF- α à 4 et 6h puis \geq 16h*
(Edsberg et al., 2015)	PU + SCI (29) PU (9)	Exsudat de plaie	MMP-9 IL-1 β TIMP-1/2 FGF2 TGF-1 β	n/a	n/a	n/a	Milliplex	n/a	↘* MMP-9, IL-1 β , TIMP-1/2 pour SCI patients vs PU simple ↗* FGF2, TGF-1 β SCI patients
(Ferguson-Pell and Hagsawa, 1988)	Volontaire (9)	Sueur	Lactate Na $^+$	Compression (150 mmHg)	30 min	n/a	Essai enzymatique Spectrophotomètre	Pendant contrainte	↗ lactate* intra patient
(Heyningen and Weiner, 1952)	Volontaire (6)	Sueur	Chlorure Lactate	Compression (200 mmHg)	25 min	n/a	Titration Volhard-Harvey Méthode Friedmann Méthode Conway	Post-contr	↗ lactate intra patient ↘ chlorure intra patient

(Jiang et al., 2014a)	PU (21) Plaie aigue (14) Ctrl (6)	Biopsies cutanées	VEGF bFGF Caspase 3 IL-1 β TNF- α KDR FGFR1	n/a	n/a	n/a	Immunohistologie Q-RT-PCR	n/a	<p>↗* VEGF et bFGF de PU et plaie aigue vs Ctrl.</p> <p>↗* caspase 3 centre PU vs berges PU</p> <p>↗* IL-1β et TNF-α PU vs ctrl et plaie aigue</p> <p>↘* KDR PU vs ctrl</p> <p>↗* KDR et FGFR1 plaie aigue vs ctrl et PU</p>
(Knight et al., 2001)	Volontaire (14)	Sueur TcPO2	Lactate Urée	Compression (120 mmHg)	30 et 60 min	n/a	Essai enzymatique Radiometer	Pendant contrainte	<p>↘ TcPO2 avec la durée de contrainte.</p> <p>↗ lactate et urée (X2) intra patient</p> <p>Corrélation lactate et ↘TcPO2</p> <p>Corrélation urée et ↘TcPO2</p>
(Krishnan et al., 2016)	SCI (17) SCI PU (17)	Plasma Urine	IP-10 GM-CSF IFN- α	n/a	n/a	n/a	Milliplex	n/a	<p>Plasma : ↘* IP-10 & ↗* GM-CSF avec PU</p> <p>Urine : ↘* IFN-α</p>
(Loerakker et al., 2012)	SCI (8) Volontaires (7)	Sérum	Mb H-FABP CK CRP	n/a	n/a	n/a	Photomètre	n/a	<p>Variations diurnes des biomarqueurs en fonction de l'heure de prélèvement.</p> <p>↗ CK, CRP et H-FABP & ↘ Mb et ratio Mb/H-FABP volontaire vs SCI</p> <p>↗ CRP ++ pour SCI avec PU (n=1)</p>
(Polliack et al., 1993)	Volontaire assis sur un fauteuil roulant et alité (13)	Sueur	Lactate Urée Urate Chlorure Sodium Potassium	Compression (58 mmHg fauteuil & 40 mmHg lit)	55 min (fauteuil) 45 min (lit)	25 min	Essai enzymatique	Pendant contrainte Post-reperf	<p>Fauteuil : ↗* lactate, urée et urate durant ischémie (24 et 27%) retour basal durant reperf. ↗ sodium et chlorure. Pas de changement potassium</p> <p>Lit : ↗ chlorure, sodium et urée durant ischémie. Pas de changement lactate et urate</p>

(Polliack et al., 1997)	Patients réhabilitatio n (11)	Sueur	Lactate Urée Urate Chlorure Sodium Potassium	Compression (49 mmHg)	n/a	10h	Essai enzymatique	Pendant contrainte	Comparaison avec groupe volontaires sains. ↗ lactate 38% ↗ urée et urate 28% ↗ potassium 21% ↘ sodium 40% Pas de changement chlorure
(Rodriguez and Claus-Walker, 1988)	SCI (7) Volontaires (10)	Biopsies cutanées	Amino acides Enzyme lysine hydroxylase	n/a	n/a	n/a	Essai enzymatique Essai amino acide	n/a	↗*Hyp, pro, hyl et lysine entre 2 biopsies sensible et insensible chez même patient ↘ amino acides dans les biopsies insensibles vs biopsie contrôle chez SCI ↗ amino acides SCI vs volontaires ↘ ratio Hydroxyline/Lysine SCI vs volontaires
(Rodriguez et al., 1989)	SCI <6 moins (61) SCI >6 moins (24) Volontaires (8)	Urine	GGH GH	n/a	n/a	n/a	Essai amino acide	n/a	SCI >6 mois vs volontaire ↗ GH et (GGH)* SCI <6 mois vs volontaire ↗ GH et GGH SCI >6 mois avec complication cutané (20) vs volontaire ↗* GGH SCI <6 mois avec complication cutané (15) vs volontaire ↗* GGH SCI >6 mois avec complication osseuse (7) vs volontaire ↗* GH
(Wert et al., 2015)	Volontaire (10)	Sebutape	IL-1α Flux sanguin	Compression (29 mmHg) Cisaillement (14,5N)	30 min	2 min	ELISA Doppler	Post-reperf	↗ IL-1α* entre compression et compression + cisaillement ↗ flux sanguin* entre compression et compression + cisaillement

Tableau 5 : Caractéristiques de 19 études cliniques sur les biomarqueurs. Abréviations : n/a : non applicable ; s-urine : urine synthétique ; reperf : reperfusion ; post-contr : post contrainte mécanique ; color : colorimétrique sinon se référer à la liste des abréviations

En résumé, l'utilisation de la sueur comme mesure non-invasive est prometteuse. Il existe une **relation linéaire entre la variation de concentration de lactate dans les cellules épithéliales et la pression externe exercée sur la peau**. Le lactate est un biomarqueur déjà utilisé en clinique pour d'autres pathologies et il est sensible à l'**hypoperfusion tissulaire** (Andersen et al., 2013), voir **figure 30**. Les résultats principaux sont mis en forme sur la **figure 31**.

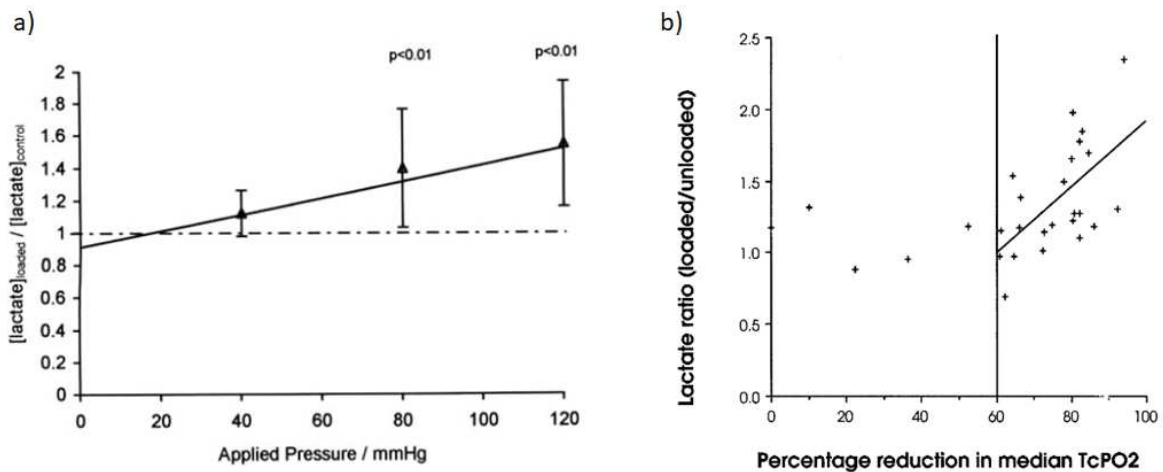


Figure 30 : Relations linéaires entre la variation de concentration de lactate de volontaires sains et a) la pression externe exercée sur la peau et b) le pourcentage de réduction de la pression transcutanée en dioxygène. D'après Bader et al, 2005

Les biomarqueurs référencés dans le **tableau 5** peuvent également être détectés au niveau **systémique** dans le sang ou l'urine de patient, deux biopsies liquides facilement accessibles en milieu hospitalier (Brancaccio et al., 2010). En effet, pour obtenir un volume suffisant de sueur pour analyse (généralement 50 μ L), la température ambiante est souvent augmentée ou les patches d'échantillonnage sont placés sur la peau pendant plusieurs heures. Ces deux méthodes de prélèvement augmentent la **macération**, le risque de lésions cutanées et peuvent altérer l'expression des biomarqueurs (Lee et al., 2014). Certains patients comme les blessés médullaires souffrent de troubles de la sudation et ne peuvent pas bénéficier de ce test. D'autres mesures non-invasives sont en cours de développement pour la détection de biomarqueurs comme la détection des composés organiques volatiles (Dini et al., 2013).

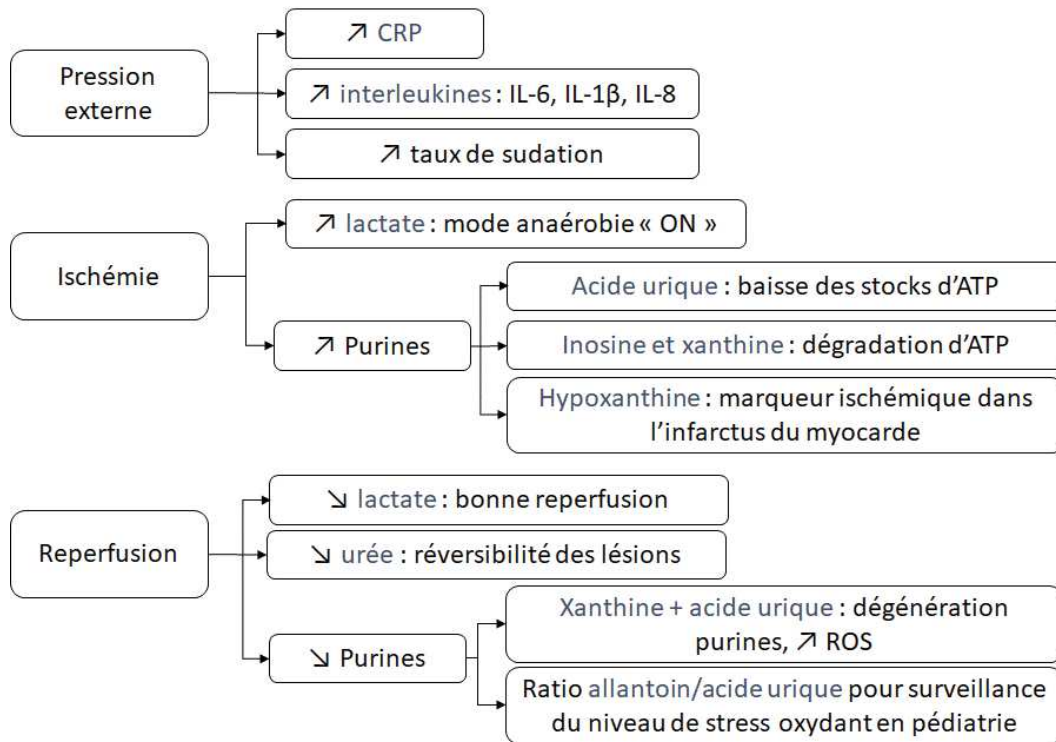


Figure 31 : Synthèse des variations de biomarqueurs présents dans la sueur après application d'une pression externe sur une peau humaine.

Résumé chapitre 2

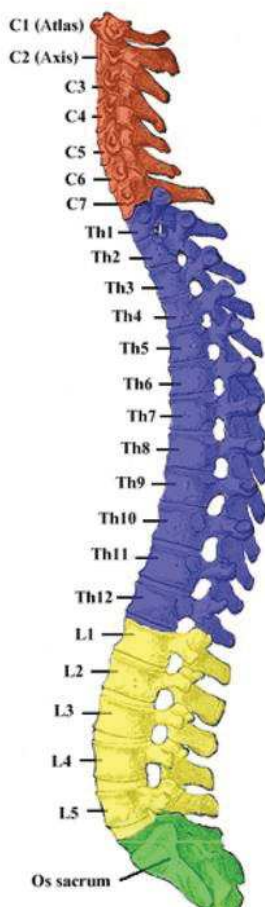
Le tissu musculaire n'est pas le seul organe affecté par le développement des escarres : la peau souffre également de l'application de pression prolongées ou de fortes intensités. Les mêmes hypothèses de développement sont avancées même si la peau plus résistante à l'ischémie et aux déformations mécaniques. Le derme papillaire est une zone charnière impactée par les stades précoces d'escarre. La transmission des contraintes mécaniques externes entre le tissu cutané et le tissu musculaire est encore mal comprise. La modélisation des déformations tissulaires par modèles d'éléments finis est l'outil le plus avancé pour répondre à ces interrogations. Néanmoins, ces travaux prennent difficilement en compte les paramètres de vasodilatation, de changement de température ambiante ou les variations des matrices de collagène, âge dépendantes.

A mesure que notre compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des escarres se développe, la recherche de marqueurs biologiques prédictifs de la destruction des tissus avance. Les mesures non-invasives (majoritairement sur volontaires sains) à partir de sueur ont mis évidence des variations de lactate en fonction de la pression exercée sur la peau et entre les phases d'ischémie et de reperfusion. Les interleukines et les purines sont d'autres éléments suffisamment sensibles pour détecter des variations entre une population porteuses d'escarres et un groupe contrôle, apparié à l'âge et au score de risque de développement d'escarre. Néanmoins, l'accès aux méthodes d'analyse des échantillons (chronophages et onéreuses) et leur spécificité doivent encore être précisées.

Chapitre 3 : Cas particuliers de la paraplégie, du diabète et de la cicatrisation

Le développement d'escarres est lié à une **immobilisation du patient**, qu'elle soit **induite** (généralement temporaire : coma, anesthésie) ou **neurologique**. Dans ce dernier cas, les patients affligés de **troubles moteurs et sensitifs** sont particulièrement vulnérables. L'incidence d'escarre chez une population de **blessés médullaires** (Brienza et al., 2018) et chez les **diabétiques** (Kang and Zhai, 2015) est variable selon les études mais toujours plus élevée que chez la population générale. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus en détails à ces deux comorbidités pour comprendre comment ces pathophysiologies exacerbent le risque de développement d'escarre.

Paraplégie : un état basal à haut risque



La paraplégie est une paralysie des deux membres inférieurs, résultant d'une atteinte de la moelle épinière et qui touche plus de 25 000 personnes en France. Elle est définie comme un déficit sensitif et/ou moteur, en fonction de l'atteinte musculaire. On distingue en termes de troubles moteurs :

- (1) La **motricité volontaire** qui se traduit par atteinte complète ou incomplète auquel cas on parle de parésie (comme une hémiparésie touchant le côté droit ou gauche uniquement).
- (2) La **motricité réflexe** est liée au tonus musculaire, deux classifications s'opposent : la paraplégie **flasque**, sans tonus, et la paraplégie **spastique** qui occasionne des contractures involontaires.

Des troubles neurovégétatifs peuvent subvenir si la lésion médullaire est située au-dessus de T6 (voir **figure 32** en bleu) : baisse de la tension artérielle, bradycardie, hypotension, hyperréflexie et troubles thermorégulateurs (Guesdon, 2010).

Figure 32 : Colonne vertébrale ©2015 Anatomy and Physiology Notes

Dues à une **mauvaise cicatrisation**, dont les causes sont développées un peu plus loin dans ce chapitre, les escarres de stade 3 et 4 doivent être traitées chirurgicalement. Les tissus morts doivent être réséqués au bloc opératoire, s'ensuit un comblement de la perte de substance avec une fermeture de la plaie par lambeau ou thérapie par pression négative associée à une greffe de peau (voir **figure 3**) (Kruger et al., 2013). Un suivi sur 12 ans de 73 patients rapporte que 6% des patients ont été admis de nouveau au bloc opératoire pour le traitement de leur escarre et 4,5% des patients ont vu leur escarre récidiver (Bogie and Bader, 2005). Sur de plus larges cohortes, le taux de complication des lambeaux varie entre 6 et 53% et le taux de récurrence entre 3 et 33% (Kruger et al., 2013). Le concept de récurrence est primordial dans le traitement des escarres chez le paraplégique, le délabrement tissulaire de chaque chirurgie est à prendre en compte dans l'évolution de la pathologie du patient. Chaque lésion musculaire ou cutané va fragiliser les tissus pour former des **cicatrices**, réduisant l'élasticité des fibres et augmentant les contraintes mécaniques (Sopher et al., 2010).

Une lésion médullaire entraîne, dans la première année qui suit son apparition, de nombreux changements physiologiques dans le tissu sous la lésion de la moelle épinière mais également au niveau systémique. Nous nous intéresserons dans ce chapitre uniquement aux modifications à plus long terme (1 an après le diagnostic de lésion médullaire), aussi appelé **paraplégie chronique** (Silva et al., 2014). Dans le tissu musculaire, le diamètre des fibres réduit significativement d'environ 3 fois, par rapport à un muscle sain. La composition des fibres musculaires passe d'une répartition variable de fibres de type I, IIa et IIb (en fonction du muscle) à une majorité de fibre de type IIA : des fibres à contraction intermédiaire, glycolytique. L'ultrastructure des fibres musculaires évolue, elle forme des projections contenant des mitochondries, présente un **RS dilaté** et de nombreuses gouttelettes lipidiques. Les muscles sous la lésion médullaire s'**atrophient**, réduisent en taille, présentent des **infiltrations de cellules adipeuses** et une **fibrose**. Tous ces éléments participent à la déstructuration des filaments musculaires. Les voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire sont représentées **figure 33**. Au sein de la cellule, des analyses morphologiques ont identifiées une **diminution significative du nombre et de la taille des mitochondries**, similaire à une **sarcopénie** (Scelsi, 2001). La **production de force** par unité de masse de fibres isolées sur un modèle expérimentale de lésion médullaire est significativement réduite (Frontera et al., 2006). On notera également qu'une dérégulation de la voie **Mitogene Activated Protein Kinase (MAPK)**, décrite au chapitre 1, participe à la dégénération neuronale dans la paraplégie (Kasuya et al., 2018).

Le diamètre et le type de fibres musculaire est étroitement corrélé avec le nombre de capillaires alimentant le muscle (Carry et al., 1986). Aussi, il est logique de constater une diminution du réseau capillaire dans les muscles de paraplégique situés sous la lésion médullaire. L'introduction d'un **entraînement** pour stimuler les muscles permet néanmoins de développer significativement le réseau

qui ne reviendra néanmoins pas aux valeurs d'un adulte sain (Petrie et al., 2014; Scelsi, 2001). La paraplégie au long terme s'accompagne de troubles vasomoteurs, d'une diminution de la capacité veineuse et des altérations structurelles des vaisseaux sanguins. Similairement aux diabétiques, l'épaisseur de la paroi artériolaire va s'épaissir et créer des **microangiopathies** (Siperstein et al., 1973).

La stase veineuse et les microangiopathies vont par ailleurs modifier le **système microlymphatique** d'où le risque de thrombose et la présence d'œdèmes des régions distales chez les blessés médullaires. Des analyses morphologiques de la peau des jambes d'un paraplégique démontrent une stase lymphatique, une augmentation de la diffusion à travers les capillaires et une altération de l'élimination des déchets métaboliques (Scelsi et al., 1995).

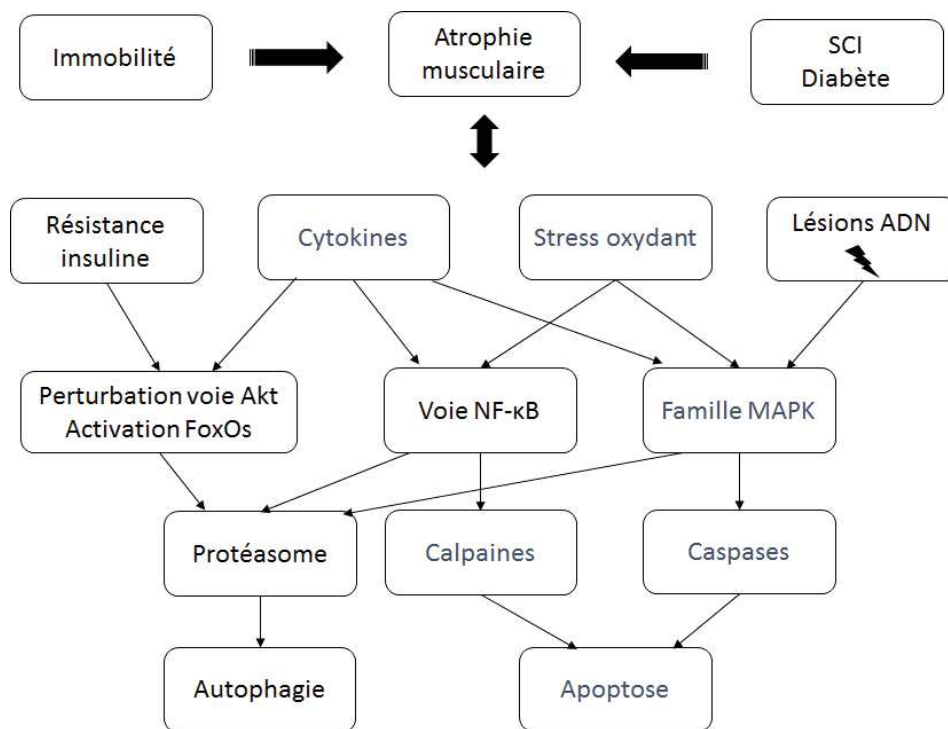


Figure 33 : Cascade non-exhaustive de voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire. D'après Fanzani et al, 2012

La structure musculaire, la vascularisation et le système lymphatique sont altérées sous la lésion médullaire des patients, exacerbant toutes voies de signalisation identifiées dans les chapitres précédents. Les changements morphologiques qui surviennent dans la paraplégie chronique sont semblables à d'autres pathologies comme la sarcopénie, l'insuffisance veineuse chronique ou le diabète. Or des dérèglements de l'homéostasie calcique ont été décrits dans ces pathologies (Frayse et al., 2006; Witherspoon and Meilleur, 2016) et on peut donc supposer qu'il existe un phénotype « leaky RyR » dans les muscles de paraplégiques (Andersson et al., 2011), voir **figure 34**.

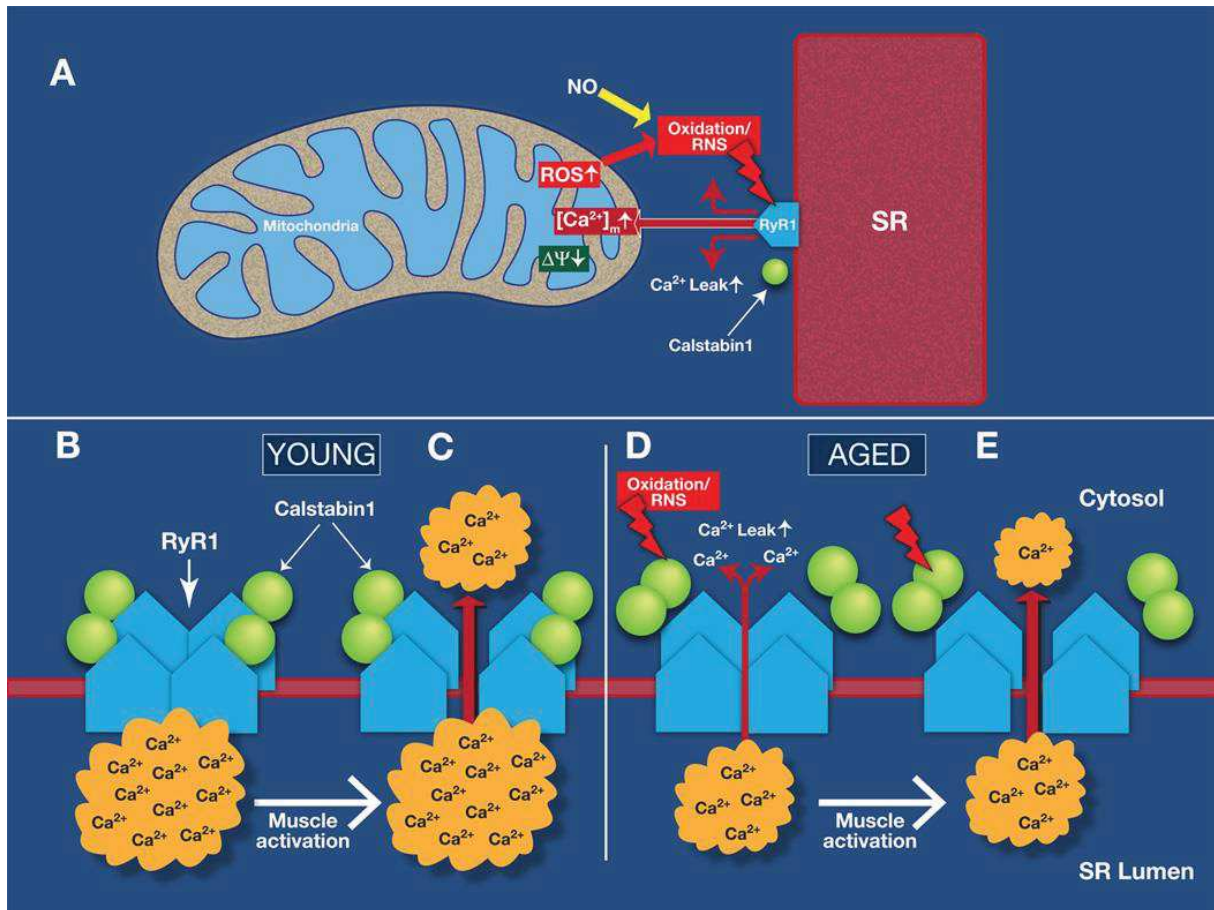


Figure 34 : Modèle de fuite calcique du RyR1 et de dysfonction mitochondriale dans le tissu musculaire squelettique âgé. Hypothétiquement, cette condition correspond aux muscles squelettiques de patients paraplégiques. D'après Andersson et al, 2011

Une récente étude animale sur un modèle de lésion médullaire a montrée pour la première fois que les muscles de rat non-innervés présentent une augmentation de l'expression du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase 4 (NOX4). NOX4 participe à la production de ROS dans le RS. Ce **déséquilibre oxydatif** favorise l'oxydation et la nitrosylation du récepteur de la Ryanodine (RyR) et dissocie le RyR1 de sa protéine régulatrice calstabin1 (Liu et al., 2017).

Diabète



Cas clinique

L'ulcère de pression ou pied diabétique ressemble à une escarre et se développe selon des mécanismes similaires. On distingue les pieds neuropathiques et neuroischémiques. Des pics de pressions locales se forment sous nos pieds qui supportent l'ensemble de notre poids. En l'absence de sensibilité, ces déformations induisent des lésions tissulaires, exacerbées par une mauvaise perfusion.

Figure 35 : Exemple de cas clinique d'un ulcère de pied diabétique. D'après Edmonds et Foster, 2006

Le **diabète** est une pathologie chronique caractérisée par une **hyperglycémie** (taux de sucre trop élevé dans le sang). En réponse à une augmentation de glucose dans le sang, après alimentation, les cellules β -pancréatiques sécrètent de l'**insuline**, une hormone qui permet l'entrée de glucose dans les cellules et *de facto* une diminution de la glycémie. En cas d'hypoglycémie, le **glucagon**, libère le stock de glucose du foie. Les diabétiques perdent cet équilibre entre insuline et glucagon, déséquilibrant leur glucose sanguin. Le diabète de type 1 est un diabète insulino-dépendant, généralement héréditaire. L'organisme détruit les cellules β pancréatiques et le corps ne peut plus synthétiser l'insuline. Les diabétiques de type 2 ne fabriquent pas assez d'insuline pour stabiliser leur glycémie et sont résistants à l'insuline, épuisant le pancréas. En 2009, 2,9 millions de français étaient diabétiques.

Le diabète n'est pas clairement défini comme un risque associé au développement d'escarre. Néanmoins, l'incidence des escarres est significativement plus élevée chez des diabétiques de type 1 (Shats and Kozacov, 1996) sans pour autant noter une différence d'incidence entre patients diabétiques de type 2 et patients non diabétiques : incidence de 30,4 vs 27,1% respectivement. Néanmoins, dans des **cohortes spécifiques**, comme dans les services de soins intensifs ou de patients chirurgicaux, ou les patients sont plus **vulnérables**, **l'incidence des escarres augmente chez les diabétiques** (Kang and Zhai, 2015; Nassaji et al., 2014; Slowikowski and Funk, 2010). Environ 70% des escarres se développent chez le patient diabétique de type 2 dans les services de soins intensifs (Serra et al., 2014).

Les diabétiques développent des **altérations de la vascularisation** qui se traduisent au long terme par une neuropathie, une atteinte cardiaque, une néphropathie, une hypocholestérolémie, une obésité, etc. L'hyperglycémie prolongée modifie la structure des fibres de collagène dans le tissu conjonctif et le tissu cutané (augmentation de l'épaisseur cutanée). Le diamètre des fibres est réduit et une déstructuration morphologique du réseau entraîne une **augmentation de la rigidité des tissus** (Gefen,

2003, 2010). La **perte de sensibilité** induit une diminution de la mobilité des patients et des déformations du tissu musculaire (voir **figure 33**) (Shahwan, 2015).

Le diabète est également connu comme dérégulateur de l'homéostasie calcique dans tous les types cellulaires du corps humain (Guerrero-Hernandez and Verkhatsky, 2014). Entre autre, comme illustré **figure 36**, il agit sur :

- (1) **Glut4** : une molécule transportant le glucose, qui réagit avec l'insuline et utilise le calcium.
- (2) les pompes **SERCA** : diminution importante du nombre et de l'activité des pompes calciques qui augmentent le stress du RS.
- (3) la **fuite calcique** du calcium du RS vers la mitochondrie, à travers le RyR1,
- (4) le **RyR1**. L'insuline induit directement un afflux de calcium depuis le RS vers le cytosol (Espinosa et al., 2004),
- (5) l'activation de l'enzyme **NOX** (NADPH oxydase) qui augmente la concentration de H_2O_2 (Mahadev et al., 2004a, 2004b). NOX 4 est complexée au RyR et son activation contribue à l'oxydation du RyR (Waning et al., 2015).

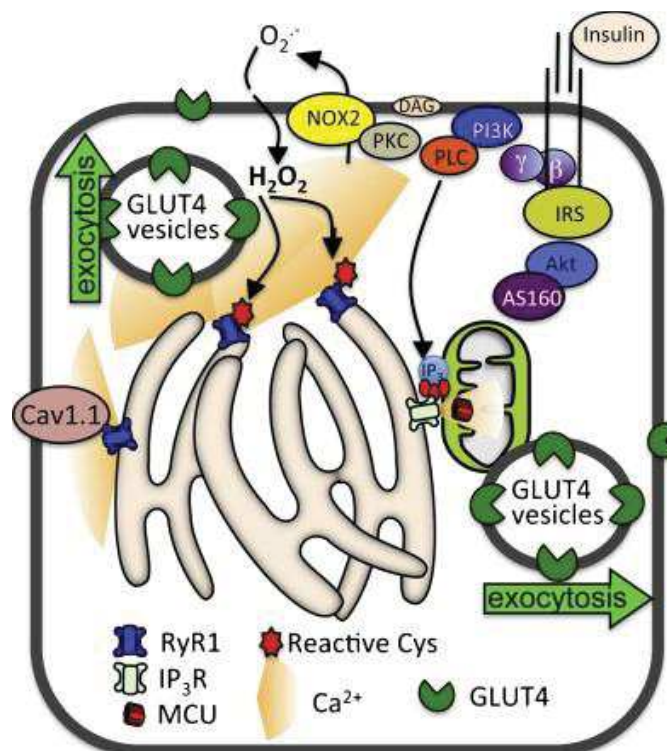


Figure 36 : Voies de signalisation impliquées dans l'augmentation du calcium intracellulaire suite à l'entrée d'insuline dans la cellule musculaire squelettique. D'après Contreras-Ferrat et al, 2014

L'oxydation et la S-glutathionylation du RyR1 sont mises en causes comme activateurs de l'afflux de Ca^{2+} induit par l'insuline (Contreras-Ferrat et al., 2014).

Un autre élément intéressant à prendre en compte dans cette revue est le **lien entre la paraplégie et le diabète**. Plusieurs études ont ainsi démontrées que les blessés médullaires sont plus susceptibles de développer un diabète de type 2 que la population générale (Cragg et al., 2013; Lai et al., 2014). Aussi chez 100 vétérans paralysés, 22% sont diagnostiqués diabétiques contre 6% de la population générale (Bauman and Spungen, 1994). Le lien entre la **sarcopénie** et la **sensibilité à l'insuline** est une piste pour expliquer cette relation (Srikanthan et al., 2010). L'atrophie musculaire atténue les mécanismes anti-inflammatoires et les fibres musculaires de type II (majoritaires dans les muscles de paraplégiques chroniques) sont plus résistants à l'insuline (Nader and Esser, 2001).

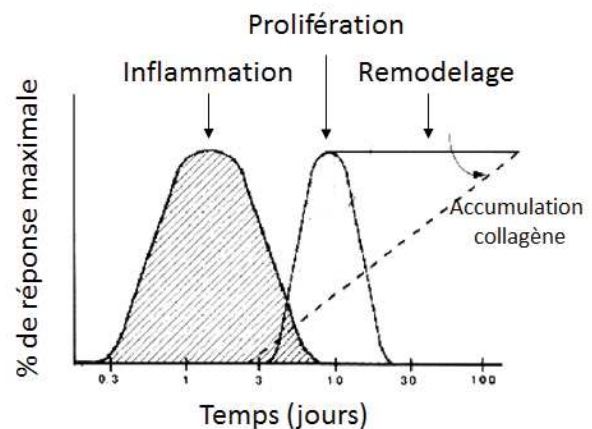
Le diabète est un critère qui peut être la goutte d'eau qui fait apparaître l'escarre. Les mécanismes décrits dans le chapitre 1 sont clairement impactés. On peut présupposer que la cinétique de développement d'escarre chez les diabétiques sera plus rapide et plus délabrant en termes de zones atteintes.

Cicatrisation

La cicatrisation est un mécanisme physiologique qui répare les lésions tissulaires. La plupart des organes ont la capacité de se réparer et/ou de se régénérer. Dans le cas des escarres la cicatrisation est généralement longue pour les patients paraplégiques et diabétiques, voir ci-après. Si la lésion n'est pas réparée sous 3 semaines, on parle de **plaie chronique**, en opposition aux **plaies aiguës** (souvent des lésions traumatiques qui ont une cicatrisation dite normale). La cicatrisation d'une plaie cutanée se divise en 3 phases distinctes dont la cinétique se superpose voir **figure 37** :

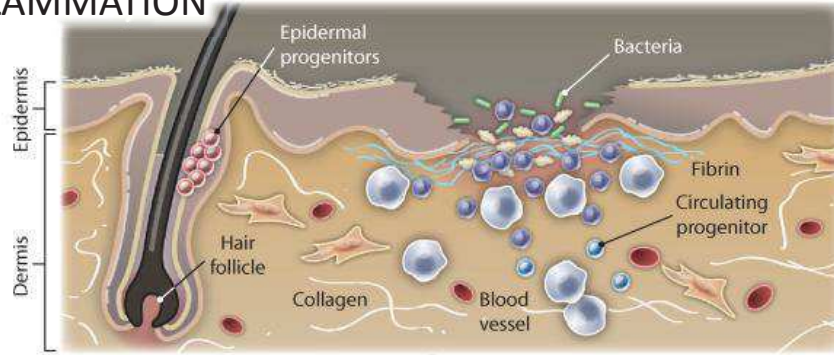
- (1) l'**inflammation**,
- (2) la **prolifération**,
- (3) le **remodelage**.

Figure 37 : Schéma de l'évolution des phases de cicatrisation normale dans le temps. D'après Rounier et al, 2001

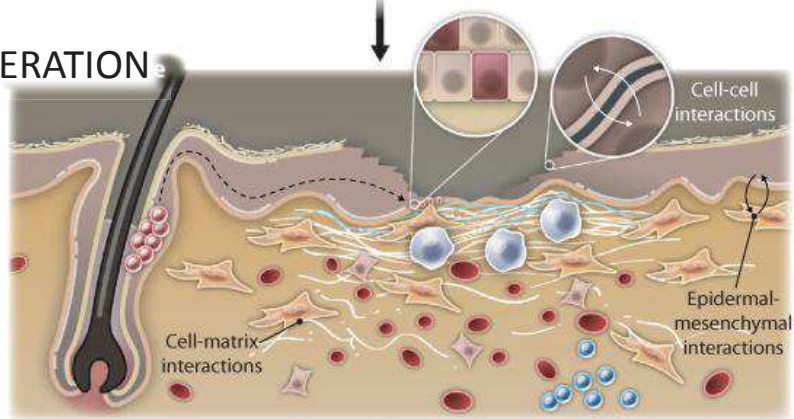


Les phases de cicatrisation normale sont illustrées **figure 38** et détaillées dans le **tableau 6**.

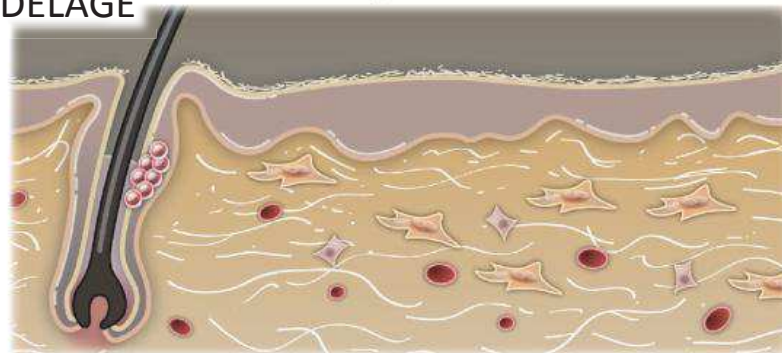
INFLAMMATION



PROLIFERATION



REMODELAGE









 Platelets	 Neutrophils	 Fibroblasts and myofibroblasts	 Keratinocytes	 Endothelial cells	 Macrophages
PDGF TGFβ EGF	IL-1 IL-6 TNFα VEGF	KGF PDGFR TGFβ TGFβR FGFs FGFRs IGF IL-1R VEGF TNFαR EGF SDF1R HGF	EGF EGFR IL-1 IL-1R TGFβ TGFβR TNFα KGFR MCP-1 KGFRs SDF1 SDF1R HGF	FGF FGFR VEGF VEGFR PDGF PDGFR VEGF VEGFR HGF HGFR FGF-2	IL-1 PDGFR IL-6 TGFβR TNFα VEGFR VEGF PDGFR EGF

Figure 38 : Phases de cicatrisation normale. D'après Eming et al, 2016

	Description
Inflammation	Coagulation sanguine pour former un caillot fibrino-plaquettaire. Libération de PDGF pour recruter les macrophages et fibroblastes. Activation de cytokines et interleukines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1) qui recrutent les monocytes environnants sur le site lésionnel où ils phagocytent les débris cellulaires (déterSION biologique). Sécrétion des facteurs de croissance (VEGF et PDGF) pour recruter les fibroblastes, transformer les neutrophiles en macrophages et former le tissu de granulation.
Prolifération	Rétraction du caillot au profit du tissu de granulation. Angiogenèse suite à la libération de VEGF et de β -FGF par les macrophages. Sécrétion des constituants de la matrice cellulaire (collagène). Dégradation de la matrice de collagène par les MMP sous la croûte de cellules mortes. Favorisation de la mobilité cellulaire durant la ré-épithélialisation. Migration et prolifération des cellules épidermiques en présence de facteurs de croissance (EGF, TGF- α et KGF). Création d'une nouvelle membrane basale.
Remodelage	Après fermeture de la plaie, lyse de la fibronectine et de l'acide hyaluronique (qui ont servi à la prolifération) au profit de fibres de collagène pour augmenter la résistance mécanique de la cicatrice. Restructuration de la matrice par renouvellement des molécules. Régression lente du tissu granuleux (qui peut prendre jusque 2 ans).

Tableau 6 : Différentes phases de cicatrisation normale

On considère que toute plaie risque de devenir chronique. En cas de surpopulation de neutrophiles et de macrophages ou en cas de sécrétion trop importante de facteurs pro-inflammatoires, la plaie peut stagner dans une phase inflammatoire. Des concentrations anormalement élevées d'IL-1 β , TNF- α et de **métalloprotéinases** (MMP) ont été relevées dans l'exsudat de plaies chroniques (Eming et al., 2014) et d'escarres (Ladwig et al., 2002). La concentration de protéinases et des ROS augmente et l'activité des facteurs de croissance diminue dans l'exsudat d'escarres (Wenk et al., 2001). Le rapport entre l'expression des métalloprotéinases (notamment MMP-9) et leurs inhibiteurs renseigne sur le devenir de la plaie : si le ratio diminue, la cicatrisation est contrôlée et en bonne voie de cicatrisation (Ladwig et al., 2002). Une régulation positive du processus inflammatoire est souvent associée à la présence de bactéries dans le lit de la plaie (Suleman and Percival, 2015). On notera que le diabète est listé comme un critère de suspicion importante de foyer infectieux d'escarre dans les recommandations de la NPUAP.

Des défauts d'angiogenèse peuvent venir perturber la cicatrisation. L'expression de β FGF et VEGF décroît avec la gravité de l'escarre (Yang et al., 2013) et des traitements cutanés avec β FGF accélèrent la cicatrisation via l'activation des voies PI3K/Akt/mTOR (Shi et al., 2016).

Les cellules de plaies chroniques prolifèrent moins et ont une morphologie proche des cellules sénescents (cellules au fonctionnement ralenti, se dégageant lentement). Aussi les fibroblastes réagissent moins à la présence de facteurs de croissance comme PDGF ou TGF- β , ne peuvent pas phosphoryler Smad2/3 qui empêche l'hypertrophie musculaire (Sartori et al., 2009) et activent la cascade MAPK via ERK1/2 (Kim et al., 2003). Si on considère le rôle de TGF- β , les cellules de plaies chroniques ont un comportement similaire aux cellules **hypoxiques** (perfusion en O₂ limitée) (Falanga et al., 2002; Gould et al., 2015).

Les cicatrices sont également des cicatrisations incomplètes. Leurs propriétés mécaniques diffèrent de la peau normale. La structure de la matrice est désorganisée et le contenu en élastine est inférieur, entraînant une plasticité importante en fonction du type de cicatrice : chéloïde (en cicatrisant, la peau a formé une excroissance du derme) ou hypertrophique (augmentation de l'épaisseur cutanée). Les modèles d'éléments finis sur cas cliniques prouvent que les contraintes de cisaillement sont maximales sur et autour des cicatrices les plus rigides (Levy et al., 2013; Sopher et al., 2010).

Pour compléter cette brève introduction de la problématique des plaies chroniques, le lecteur est référé aux revues suivantes (Demidova-Rice et al., 2012; Frykberg and Banks, 2015). Aujourd'hui, de la thérapie génique, en passant par différents analogues cutanés pour greffe ou de la thérapie à pression négative, les traitements des plaies constituent un marché formidable et en pleine expansion avec plus de 6,5 millions de patients aux Etats Unis (Wu et al., 2017). Les pansements sont bien sûrs au cœur du combat. Leur classification se fait en fonction de leur principaux composants (plus ou moins absorbant), antibactérien, perméable, atraumatique lors du retrait, etc (Westby et al., 2017). Le rôle d'un pansement dans la prise en charge d'une escarre est de :

- (1) protéger la plaie contre les infections et les chocs,
- (2) encourager la cicatrisation en maintenant la plaie dans des conditions d'humidité, de température et de pH optimales. Ainsi un pansement absorbant ou alginate évitera la macération et des pansements gras et hydratant éviteront l'assèchement des tissus péri-lésionnels.

Les principaux pansements utilisés sont appelés pansement primaires : ce sont des hydrocolloïdes, des interfaces et des alginates. Dans certains cas, un pansement dit secondaire pourra être appliqué, il s'agit d'un pansement à mettre par-dessus le pansement primaire pour compléter le rôle du pansement primaire (Aubert-Viard, 2014). Les pansements actifs sont des dispositifs médicaux où se

rencontrent la technologie d'un pansement et les composantes mécano-biologiques, aux propriétés antibactériennes ou antalgiques.

Les propriétés de certains matériaux sont intéressantes pour la cicatrisation. Ainsi le **graphène** qui est une monocouche de graphite, ou nanotube de carbone, est un matériau structuré en forme allotropique (« nid d'abeille ») composé d'atomes de carbone. Synthétisé en 2004, ses propriétés électriques, son inertie chimique, sa **biocompatibilité** et son **rôle antibactérien** en font un matériau d'avenir dans la médecine (Veliev et al., 2017). La rigidité du graphène en flexion est du même ordre de grandeur que celle de la membrane plasmique (1-2 eV) permettant au matériau d'interagir avec les composants de la cellule sans les endommager (Skoda et al., 2016). Sous forme native, son dérivé : l'oxyde de graphène influe sur la chaîne respiratoire mitochondriale et augmente la production de ROS, une propriété recherchée en oncologie (Li et al., 2012; Zhi et al., 2013; Hinzmann et al., 2014). Dans la circulation sanguine, il a des propriétés anticoagulantes mais participe à la libération de cytokines pro inflammatoires (Sasidharan et al., 2012). Néanmoins, des traitements de surface améliorent sa cytotoxicité et modifient les interactions avec les organelles. Le revêtement peut être adapté à l'utilisation recherchée. Succinctement, des nanofibres de graphène contenant du chitosane (un polysaccharide utilisé en médecine pour ses propriétés régénératrices), sur une base d'alcool polyvinyle ont été appliqués sur les plaies de souris et de lapin. A 15 jours, les plaies traitées avec les nanofibres de graphène associé au chitosane étaient complètement fermées à la différence des plaies traitées avec sans graphène, avec chitosane ou sans traitement. Les auteurs présentent des résultats similaires *in vitro* et avancent l'effet bénéfique des propriétés antibactériennes du graphène sur la cicatrisation cutanée (Lu et al., 2012).

Résumé chapitre 3

Avec une incidence de 15 à 30% d'escarre chez les paraplégiques (Gélis et al., 2009), les blessés médullaires sont particulièrement à risque de développer des escarres. L'atrophie musculaire et les altérations de la vascularisation et du flux lymphatique sont autant de voies de signalisation touchées qui exacerbent les lésions dans le tissu cutané et musculaire en réponse à une pression externe. De plus, il a été récemment prouvé que dans les muscles non-innervés de rat, une augmentation de l'expression de NOX4 (une NADPH oxydase permettant la production de ROS) induit (1) une nitrosylation et une oxydation du récepteur de la Ryanodine et (2) une dissociation de la calstabin1.

Il existe un lien entre paraplégie et diabète, aussi les blessés médullaires, dû à leur atrophie musculaire sont plus vulnérables à la mise en place d'une insulino-résistance. Elle participera à la dérégulation de l'homéostasie calcique des cellules musculaires et de la perfusion des membres inférieurs et contribuera au maintien d'un stress oxydant.

Les paraplégiques et les diabétiques ont des tissus plus rigides et donc moins à même de supporter les contraintes externes. Leur vascularisation au niveau macro et microscopique est impactée entraînant une dérégulation du système lymphatique. Le système oxydant est déséquilibré ce qui les rend sujets à des retards de cicatrisation. Les plaies stagnent dans la phase inflammatoire et augmentent le risque d'infections. Les patients porteurs d'escarre restent plus longtemps à l'hôpital, nécessitent des soins plus coûteux et leur taux de mortalité est plus élevé que la population sans escarre (Bauer et al., 2016).

Objectifs de la thèse

Cette revue de la littérature a mis en lumière les différentes hypothèses actuelles qui expliquent la survenue d'escarres dans le muscle squelettique ainsi que l'influence des tissus cutanés et sanguins et le cercle vicieux des comorbidités des patients à haut risque d'escarres. Plusieurs pistes physiologiques semblent se recouper, notamment l'influence du stress oxydant et une surcharge calcique intracellulaire.

Mon travail de thèse était d'identifier la relation entre contrainte mécanique et l'homéostasie calcique du muscle sous-jacent. Les objectifs de mon travail de thèse s'articulent autour de 3 points qui feront chacun l'objet de la mise en place d'un ou plusieurs modèles expérimentaux ou d'études cliniques.

Etude 1

Dans un nouveau modèle de compression sur la souris (qui s'inspire de données cliniques : voir lien avec étude 2), nous avons souhaité comprendre l'interaction entre une pression, de 50 et 100 mmHg appliquée sur les muscles abdominaux d'une souris vigile pendant 2 heures, et les voies de mort cellulaire. Une attention particulière a été portée sur l'homéostasie calcique et le récepteur de la Ryanodine dont l'expression et le fonctionnement ont été quantifiés.

Etude 2

Sur une cohorte de patients paraplégiques, porteurs d'escarres de stade 3 et 4, notre objectif principal était de corrélérer une pression (intensité et durée) à une modification post traductionnelle du récepteur de la Ryanodine dans les muscles paralysés. Secondairement, nous nous sommes intéressés à la micro-vascularisation locale au niveau des biopsies musculaires. Le cœur de cette étude était de faire un lien entre la pression externe, la vascularisation locale dans le derme et les éventuelles lésions musculaires chez un sujet à fort risque de développement d'escarre.

Etude 3

En complément de la recherche sur les stades précoces de développement d'escarre, développée sur les 2 premières études, ce dernier travail s'intéressait à l'impact d'un nouveau pansement à base d'une monocouche de graphène sur la cicatrisation cutanée. Pour mieux appréhender les différences entre les phases de cicatrisation sur nos modèles de plaie chronique et aiguë, nous avons développé une approche non-invasive basée sur la détection thermique par caméra infrarouge.

Matériels et Méthodes

Modèles humains

Etude clinique sur l'étiologie des escarres NCT0242046

Titre de l'étude : Quantification des seuils de pressions liés aux lésions tissulaires chez le patient alité paraplégique – Etude monocentrique contrôlée à 4 bras parallèles, randomisée

Contexte et justification : Il existe une relation inversement proportionnelle entre la durée d'application de la contrainte et l'amplitude de la pression exercée sur un tissu. Lorsque les tissus mous sont déformés, l'ischémie ralentit le métabolisme, ce qui fragilise les cellules et accélère leur apoptose. Le tissu musculaire est très touché par les ulcères de pressions car ces besoins métaboliques sont particulièrement élevés. Chez les patients, considérés à haut risque, la prévention repose sur une mobilisation régulière des points d'appui. Cependant, cette fréquence de mobilisation est définie à priori et n'est pas adaptée aux pressions réelles d'interface entre le corps du malade et sa surface d'appui. Il a été observé que les escarres apparaissent lorsque la pression extérieure exercée sur les tissus est supérieure à celle des capillaires sanguins (entre 25 et 32 mmHg) sans notion de durée d'application. En effet, les mécanismes physiopathologiques initiaux impliqués dans la formation des escarres sont méconnus. Afin de corrélérer, au cours du temps, les pressions d'interface avec un mécanisme physiopathologique potentiellement initiateur d'escarre on s'intéresse à l'expression du récepteur de la Ryanodine (RyR1) dans le tissu musculaire environnant le point de pression. Cette protéine se situe sur le réticulum sarcoplasmique, et permet la libération massive de calcium dans le cytoplasme nécessaire à la contraction musculaire. Nous faisons l'hypothèse, suite à un phénomène d'ischémie perfusion secondaire à un point d'appui, de la présence initiale d'un stress oxydant à la base d'un dysfonctionnement du canal RyR1 dans le muscle squelettique environnant. Nous pensons que les perturbations de l'homéostasie calcique qui va en résulter peuvent induire des phénomènes d'apoptose et de nécroses musculaires. Ces lésions musculaires vont alors générer une inflammation du tissu environnant, contribuant à entretenir et étendre l'escarre [4]. En évaluant les modifications biochimiques du RyR1, il sera possible de déterminer des paliers de contrainte mécanique pour lesquels les premiers effets délétères apparaissent au niveau cellulaire, centrés sur l'altération de l'homéostasie calcique. Bien que de nombreux facteurs aient déjà été identifiés dans la genèse d'une escarre, actuellement nous ne connaissons pas ce seuil critique de pression et de durée au-delà duquel les mécanismes initiateurs d'escarres peuvent se déclencher. Cette connaissance permettrait un suivi en temps réel des pressions d'interface, afin d'alerter le personnel soignant si la valeur seuil de pression, personnelle au malade, est atteinte. Ainsi, la mobilisation des points d'appui serait réalisée à une fréquence adaptée à chaque patient, afin de prévenir au mieux l'apparition d'escarre.

Objectif principal : Estimation de la corrélation entre l'intensité de la contrainte mécanique au niveau d'une zone non-innervée et le niveau d'altération post-translationnelle des récepteurs de la Ryanodine des cellules musculaires sous-jacentes, chez des patients alités paraplégiques.

Objectifs secondaires :

- Corréler les paramètres de la micro-vascularisation avec les altérations du RyR1.
- Comparer le niveau d'altération post-translationnelle des récepteurs du RyR1 des cellules musculaires entre les zones saines et des zones déjà altérées (escarres).
- Démonstration de l'intérêt d'un monitoring continu des pressions d'interface.

Méthodes : Il s'agit d'une étude mono-centrique, contrôlée à 4 bras parallèles et randomisée. On souhaite inclure 48 paraplégiques, admis au service de Plaies et de Cicatrisation du CHU de Montpellier pour escarre. A son admission, le patient est placé sur un matelas anti-escarre permettant un monitoring de l'ensemble des pressions d'interface. Suite à la mobilisation systématique du patient par le personnel médical, une seule biopsie musculaire sera effectuée au niveau du trochanter où la pression est repérée sur le monitoring, aux temps H0 ou H1 ou H2 ou H3 à partir du moment où le patient est installé sur le matelas (en fonction du bras de randomisation). A H24, au moment du geste chirurgicale sur l'escarre à traiter, le médecin prélèvera deux biopsies musculaires: une dans la zone de l'escarre à réséquer et une autre dans une région saine et innervée.

Déroulement : La période d'inclusion sera de trois années. Les patients seront suivis sur 24 heures, à partir de leur arrivée à l'hôpital jusqu'à la fin de la chirurgie pour retirer l'escarre.

Perspectives : Cette étude nous permettra de corréler une contrainte mécanique exercée sur un point de pression du patient avec des mécanismes initiaux impliqués dans la formation d'escarres. Ces données serviront à améliorer le monitoring des pressions d'appui afin qu'il puisse permettre par une mobilisation personnalisée du patient, de limiter l'apparition des phénomènes physiopathologiques initiaux potentiellement impliqués dans la formation d'escarre. Ce dispositif préventif innove par son suivi continu du patient sur de longues périodes alitées et permettra de limiter chez lui l'incidence des escarres.

Critères d'inclusion :

- Recueil du consentement signé par les patients,
- Age > 18 ans,
- Sexe : masculin ou féminin,
- Patients paraplégiques depuis au moins 6 mois,
- Indice de masse corporelle supérieur à 18,5 kg/m²

- Chirurgie planifiée dans le cadre d'un traitement d'escarre,
- Présence d'une escarre de stade III ou IV.

Critères de non inclusion :

- Pathologie cardiaque,
- Maladie de Duchenne,
- Démence,
- Présence d'une plaie tumorale,
- Artérite de stade IV non revascularisable,
- Cachexie,
- Impossibilité d'arrêt du traitement anti-coagulant 24 heures avant la biopsie initiale,
- Patient allergique à la xylocaïne,
- Patient ayant pris de l'aspirine ou des anti-inflammatoires dans les 3 jours précédant la biopsie
- Participation du sujet à une autre étude,
- Sujet non affilié à un régime de sécurité sociale, ou non bénéficiaire d'un tel régime,
- Femme enceinte ou allaitante, patient dans l'incapacité de donner son consentement, majeur protégé, personnes vulnérables (art. L.1121-6, L.1121-7, L.1211-8, L.1211-9).

Critère de jugement principal : La valeur de la pression d'interface sera évaluée grâce aux capteurs de pression du dispositif de cartographie de pression LX100 de XSensor[®] qui mesure en temps réel les différentes zones de pression entre le corps du patient et le matelas anti-escarre. Les valeurs de saturation en oxygène, la quantité d'hémoglobine dans le tissu et le flux sanguin seront obtenues grâce à l'O2C. Les modifications post traductionnelles des récepteurs à la Ryanodine seront analysées et quantifiées. Notre critère principal sera la corrélation entre 3 paramètres : les modifications post traductionnelles du RyR1, les pressions d'interface et les données sur la microvascularisation.

Etude clinique pression d'interface et micro-vascularisation NCT 03114245

Titre de l'étude : Corrélation entre variations des pressions et altérations de la micro-vascularisation chez le patient alité paraplégique

Contexte et justification : Très logiquement, Il existe une relation inversement proportionnelle entre la durée d'application d'une contrainte mécanique et l'amplitude de la pression exercée en conséquence sur la surface de contact. Lorsque les tissus mous sont déformés, une compression vasculaire apparaît. Les escarres apparaissent lorsque la pression extérieure exercée sur les tissus est supérieure à celle des capillaires sanguins (entre 25 et 32 mmHg) sans notion de durée d'application. Il en découle une ischémie des tissus et des phénomènes de reperfusion qui induisent un stress oxydant, fragilise les cellules et accélère leur apoptose.

Le tissu musculaire est le premier tissu lésé par les ulcères de pressions(Linder-Ganz et al., 2006), secondaire à des contraintes mécaniques. Les intensités de pressions appliquées sur le tissu musculaire au niveau des proéminences osseuses sont proportionnelles à celles appliquées sur le tissu cutané(Swain and Bader, 2002). Chez les patients à haut risque, la prévention repose sur une mobilisation régulière des points d'appui. Cependant, cette fréquence de mobilisation est définie selon des pratiques non évaluées objectivement et ne tenant pas compte des pressions réelles d'interface entre le corps du malade et sa surface d'appui. Les mécanismes physiopathologies initiaux impliqués dans la formation des escarres sont méconnus. De plus chez les patients paraplégiques, il existe un retard de cicatrisation(Guihan et al., 2016) dont les mécanismes ne sont pas encore clairement décrits dans la littérature.

Nous faisons comme hypothèse que ce retard de cicatrisation chez le sujet paraplégique peut être dû à une ischémie basale plus importante des zones sous la lésion médullaire. Ce défaut de micro-vascularisation serait dû à une valeur de pression seuil, occluant les capillaires sanguins, plus faible que pour les sujets non-paraplégiques.

Ainsi, afin de mieux prévenir les escarres chez ces patients paraplégiques, il nous paraît pertinent d'identifier les intensités et la répartition des pressions d'interface chez cette population à haut risque et de corréler ces contraintes mécaniques à une possible altération de la micro-vascularisation. En effet, la connaissance de ces nouvelles données, permettra une prise en charge personnalisée afin d'offrir la meilleure prévention possible d'apparition d'escarres.

Objectifs principal : Corréler l'intensité d'une contrainte mécanique au niveau d'une zone d'appui avec les caractéristiques de la micro-vascularisation locale chez une cohorte de patients paraplégiques.

Objectifs secondaires : Créer une base de données de pressions d'interface. Cette base de données servira à prédire, en fonction de la morphologie du patient, l'intensité des pressions qui s'appliquent en clinique.

Méthodes : Il s'agit d'une étude mono-centrique non-interventionnelle. Nous souhaitons inclure 50 patients paraplégiques, admis au service de Plaies et Cicatrisation du CHU de Montpellier.

Déroulement : Deux visites sont prévues : une de pré-inclusion et l'autre durant le séjour du patient à l'hôpital. Un capteur de pression sera placé sur le lit du patient pendant une heure, enregistrant les pressions d'interface. Au début et à la fin de l'enregistrement, une mesure de la micro-vascularisation sera effectuée au niveau des zones d'appui. La durée de l'inclusion sera de 2 heures. Cette étude est non-interventionnelle, le suivi sera réalisé dans le même temps que celui pour la chirurgie du patient.

Perspectives : Cette étude permettra de mieux appréhender la relation entre pressions d'interface et micro-vascularisation et ainsi proposer une meilleure prévention des escarres. Les données de pression d'interface auront une visée éducative pour le patient comme pour les soignants et constitueront une base de données de référence. Les paraplégiques souffrent d'un retard de cicatrisation, aussi l'étude de la micro-vascularisation nous permettra par une approche non-invasive, un moyen de prédire l'état ischémique des membres sous lésionnels à la lésion de la moelle épinière et guider le personnel soignant dans sa prise en charge afin de limiter les conséquences des points de pression.

Critères d'inclusion :

- recueil du consentement écrit éclairé,
- âge supérieur à 18 ans,
- obligation d'affiliation ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale,
- Sexe : masculin ou féminin,
- Patients paraplégiques depuis au moins 6 mois,
- Chirurgie planifiée dans le centre de compétences « Plaies et Cicatrisation ».

Critères de non inclusion :

- Démence,
- Artérite de stade IV non-revascularisable,
- Sujet non-affilié à un régime de sécurité sociale, ou non bénéficiaire d'un tel régime,
- Femme enceinte ou allaitante, patient dans l'incapacité de donner son consentement, majeur protégé, personnes vulnérables (art. L.1121-6, L.1121-7, L.1211-8, L1211-9),

- Participation du sujet dans une autre étude qui pourrait modifier la micro-vascularisation locale.

Critère de jugement principal : coefficient de corrélation entre une valeur d'intensité de pression mesurée en un point et le paramètre de la micro-vascularisation rHb.

Critères de jugement secondaire :

- les corrélations entre l'intensité de pression et d'autres paramètres de micro-vascularisation (SO₂ et flux sanguin),
- la variation des différents coefficients de corrélations entre le début de la mesure et après une heure d'alitement.

Sérothèque biomarqueurs d'escarres

Titre de l'étude : Détection des biomarqueurs sanguins liés à la présence d'une escarre chez le patient paraplégique

Contexte et justification : Les escarres sont des lésions d'origine ischémique qui apparaissent généralement au niveau des proéminences osseuses. Ces plaies sont associées à une compression prolongée des tissus mous et/ou à un cisaillement. Cette pathologie a des répercussions sur la qualité de vie du patient et, non-traitées, peut déclencher des épisodes de sepsis. Aujourd'hui les recommandations des experts insistent sur la prévention via une prise en charge rapide grâce à une identification des personnes à risque (Mission nationale d'expertise et d'audit hospitalier, 2009). Malgré ces mesures, 130 000 patients sont pris en charge, tous les ans, à domicile pour une escarre, en France. Une meilleure prévention des escarres, avant le développement de plaies nécessitant une chirurgie de fermeture, pourrait passer par l'identification précoce de biomarqueurs systémiques spécifiques à cette pathologie.

Objectif principal : Identifier des biomarqueurs potentiels spécifiques aux escarres dans le sérum de patients paraplégiques.

Méthodes : Etude monocentrique sur dossiers médicaux et utilisant la fraction non utilisée d'échantillons biologiques de patients paraplégiques, porteurs d'escarre, collectés dans le cadre du soin.

Déroulement : Les patients paraplégiques ont été pris en charge au CHU de Montpellier dans le cadre d'une chirurgie planifiée pour le traitement de leur escarre. S'ils répondent aux critères d'éligibilité de l'étude, la fraction non utilisée de prélèvement pourra être utilisée. Lors du prélèvement biologique prévu dans le cadre du soin, en amont de la chirurgie, une fraction du prélèvement sera alors récupérée par les investigateurs de l'étude. Sur les échantillons sanguins obtenus, les facteurs liés à une lésion musculaire squelettique seront dosés au laboratoire Inserm U1046.

Perspectives : Si les sérums des patients paraplégiques porteurs d'escarre présentent une augmentation d'un ou plusieurs biomarqueurs présélectionnés dans cette étude par rapport aux taux normaux, cette étude nous indiquera qu'une (ou plusieurs) molécule(s) circulante(s) est (sont) en lien avec le développement de l'escarre. Nous pourrions alors suivre l'expression de ce(s) biomarqueur(s) dans le temps chez des patients à risque d'escarre mais non porteurs d'escarres pour valider la spécificité de ce(s) biomarqueur(s) dans le développement précoce d'escarre. Une fois cette validation acquise, ce(s) biomarqueur(s) pourront être mesurés en routine chez les patients à risque de développement d'escarre afin d'améliorer la prévention de cette pathologie et d'adapter les

techniques de décharge aux patients. Par exemple, le soignant pourra contrôler que le changement d'appui du patient ou le choix du support est bien adapté via la dynamique de ce(s) biomarqueur(s).

Critères d'inclusion :

- Patients âgés de plus de 18 ans,
- Patients paraplégiques depuis au moins 6 mois,
- Chirurgie planifiée dans le centre de compétences « Plaies et Cicatrisation ».

Critères de non inclusion :

- Infection VIH, Hépatite B ou hépatite C connue,

Critère de jugement principal : Variations d'expression de biomarqueurs identifiés comme indicateurs de lésion du tissu musculaire squelettique : C-reactive protein (CRP), creatine kinase (CK), myoglobine (Mb), myosin heavy chain (MHC), lactate dehydrogenase (LDH), troponine, α -actine, heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) des sérums de patients par rapport aux valeurs normales, mesurées par ELISA.

Critères de jugement secondaire : Variations d'expression de cytokines et de metalloproteinases mesurées par Elisa et Multiplex des sérums de patients par rapport aux valeurs normales.

Modèles animaux

Escarres expérimentales

Buts :

	Ischémie	Ischémie / reperfusion
VALIDATION	Objectif 1 : Valider un modèle d'escarre par ischémie induite par une compression de la paroi abdominale par des aimants chez la souris.	Objectif 2 : Valider un modèle d'ischémie/reperfusion d'escarre induite par une compression de la paroi abdominal par des aimants chez la souris.
PHARMACO	Objectif 3 : Identifier l'effet d'un Rycal S107 sur les altérations musculaires et systémiques induites par un modèle d'escarre ischémique .	Objectif 4 : Identifier l'effet d'un Rycal S107 sur les altérations musculaires et systémiques induite par un modèle d'escarre d'ischémie/reperfusion .

Matériel :

- Souris C57/BL6j, mâles, 8 semaines,
- Aimant FE-S-10-03 (Supermagnete),
- Kit de tare (ependorfs avec un poids donné + papier bristol)
- Crème dépilatoire Veet®,
- Tubes capillaires microhématocrites,
- Pompes osmotiques ALZET 1007D

Solutions à préparer :

Bleu Evans		
	Concentration finale	Volume pour 1 mL
Bleu Evans 362220-0025 (Reactifs RAL)	1%	
PBS, pH 7,5		Qsp 1mL

PFA 4%		
	Concentration finale	Volume pour 80 mL
PFA 32% 15714 (Electron Microscopy Sciences)	4%	10 mL
PBS 1X eau DEPC		70 mL

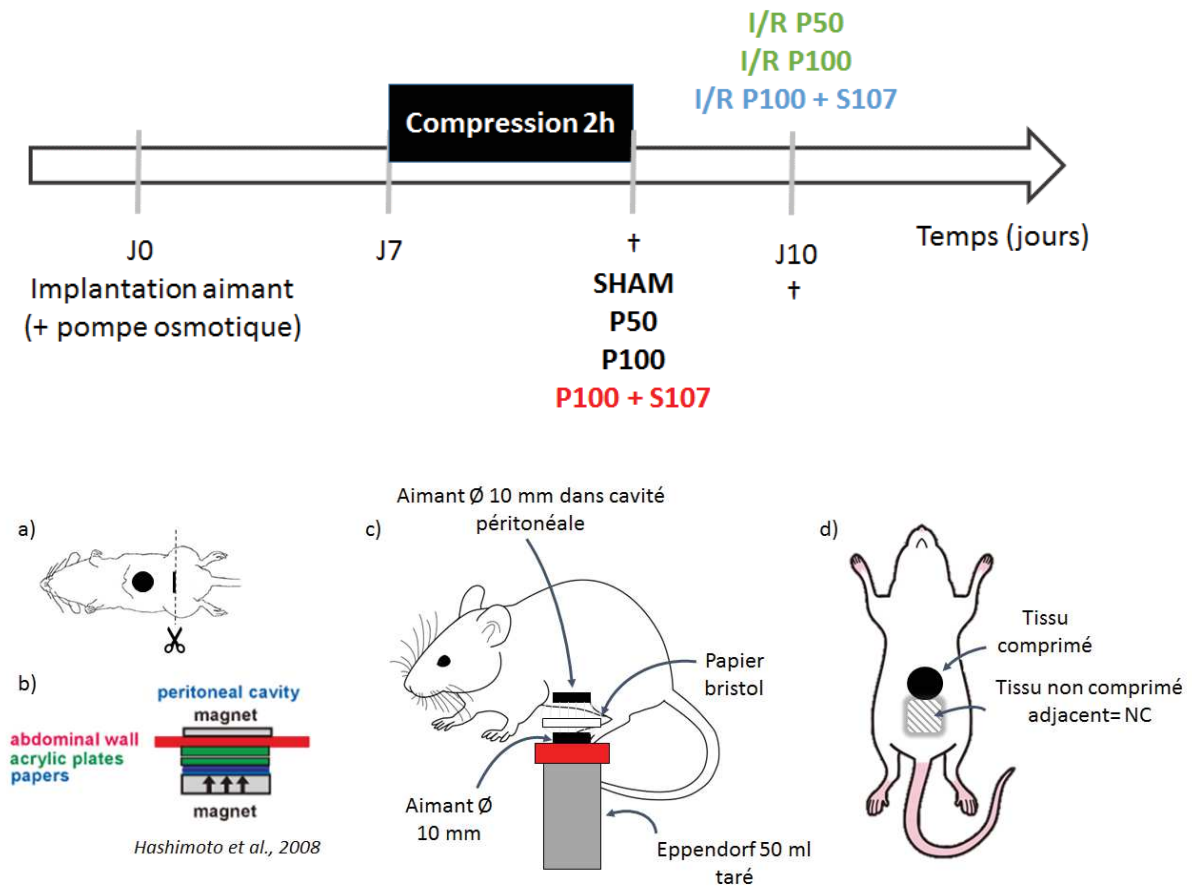
Protocole :

Figure 39 : Schématisation de a) la zone à inciser pour implantation de l'aimant ; b) le montage papier + aimants, d'après Hashimoto et al., 2008 ; c) la vérification de l'intensité de pression ; d) les zones musculaires d'intérêt à prélever.

1. Dépiler le ventre et la zone dorsale entre les omoplates des souris à J-1 avec de la crème dépilatoire Veet®.

Mise en place de l'aimant intrapéritonéal et de la pompe osmotique

2. **J0** : Anesthésier la souris avec de l'isoflurane 2%. Vérifier l'efficacité de l'anesthésie gazeuse en testant les mouvements réflexes de la souris endormie.
3. Désinfecter la zone à opérer,
4. Inciser la peau de la souris, écarter la paroi abdominale des organes internes et faire une incision pour ouvrir la cavité intrapéritonéale.
5. Avec une pince en plastique, déposer un aimant #FE-S-10-03 (Supermagnete), préalablement stérilisé à l'autoclave, dans la cavité intrapéritonéale. Faire attention à ne pas abîmer le système digestif.
6. Utiliser un instrument métallique pour déplacer l'aimant dans la cavité intrapéritonéale et l'empêcher de bouger le temps de la fermeture de la plaie.
7. Avec du fil de soie 6/0, fermer le muscle avec un point surjet.
8. Avec du fil de soie 6/0, fermer la peau en 4-5 points simples séparés.

Mise en place de la pompe osmotique, objectifs 3 et 4

9. Les pompes sont remplies la veille et placées à 37°C pour commencer à diffuser au moment de l'implantation. Selon les instructions du fabricant, 100 µL de sérum physiologique (SHAM) ou 100 µL d'une solution de Rycal S107 à 50 mg/kg/jour.
10. Placer l'animal sur le ventre et faire une boutonnière sur le côté droit de l'animal au niveau des omoplates,
11. Avec des ciseaux à bouts ronds, séparer le tissu cutané du tissu musculaire,
12. Placer la pompe osmotique délicatement, avec des gants propres, de l'autre côté de la colonne vertébrale,
13. Fermer la plaie cutanée avec 3-4 points simples séparés.
14. Désinfecter la/les plaie(s), arrêter l'anesthésie et surveiller l'animal jusqu'à son réveil complet. Les souris sont placées en cage individuelle.
15. Surveiller l'état des plaies et l'état de santé des souris quotidiennement,

Compression 2 heures

16. **J7** : Anesthésier la souris avec de l'isoflurane 2%. Vérifier l'efficacité de l'anesthésie gazeuse en testant les mouvements réflexes de la souris endormie.
17. Localiser l'emplacement de l'aimant dans la cavité intrapéritonéale et s'assurer qu'il n'est pas entre 2 anses de l'intestin.
18. Utiliser les tares (2 tares par intensité de pression) et jouer sur l'épaisseur de papier bristol pour calibrer la pression entre l'aimant interne et l'aimant externe. L'épendorf taré à la valeur supérieure doit tomber et celui à la valeur juste doit rester en place contre la peau de la souris.
19. Protéger la structure papier bristol + aimant avec de la gaze, en évitant de serrer. Placer un adhésif non compressif pour protéger le tout.
20. Arrêter l'anesthésie et surveiller l'animal pendant 2 heures.

Pour les objectifs 1 et 3

21. Prélever un échantillon sanguin (méthode rétro orbital ou intracardiaque), le laisser coaguler 20 min à TA, centrifuger 10 min 4°C, 2 000g. Le sérum (surnageant) est aliquoté et conservé à -80°C.
22. Sacrifier l'animal et récupérer les tissus musculaires en fonction de l'analyse souhaitée.
23. Le tissu cutané est nettoyé au spray RNase, coupé en 2 au milieu : la moitié est placée dans l'azote liquide puis à -80°C et l'autre moitié dans 1mL de RNAlater puis à -20°C.

Pour les objectifs 2 et 4

24. Retirer l'aimant externe pour reperfuser la zone pendant 3 jours.
25. **J10** : Prélever un échantillon sanguin (méthode rétro orbital ou intracardiaque), le laisser coaguler 20 min à TA, centrifuger 10 min 4°C, 2 000g. Le sérum (surnageant) est aliquoté et conservé à -80°C.
26. Sacrifier l'animal et récupérer les tissus musculaires en fonction de l'analyse souhaitée.
27. Le tissu cutané est nettoyé au spray RNase, coupé en 2 au milieu : la moitié est placée dans l'azote liquide puis à -80°C et l'autre moitié dans 1mL de RNAlater puis à -20°C.

Pour s'assurer de l'ischémie de la zone, on peut injecter en IP une solution de Bleu Evans 0,1% (Hamer et al., 2002) en fonction du poids de l'animal juste après avoir placé l'aimant externe. Deux heures de compression plus tard, on peut observer que la zone comprimée est restée blanche et que la reperfusion est graduelle sur environ 30 minutes.

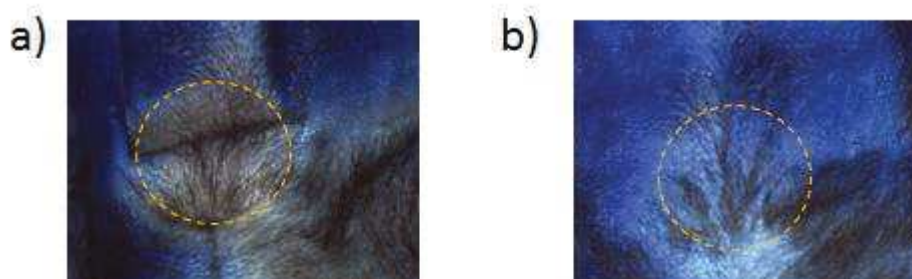


Figure 40 : Photo de la zone comprimée, injectée avec du Bleu Evans 1% a) au retrait de l'aimant externe ; b) 2 heures après le retrait. Le cercle en pointillés représente l'aimant externe pendant les 2h de compression

Cicatrisation chronique

But : Etude comparative en aveugle entre 2 pansements : un pansement hydrocellulaire avec une monocouche de graphène et un pansement hydrocellulaire seul sur un modèle de souris diabétique de type 1 qui présente un retard de cicatrisation décrit dans la littérature.

Matériel :

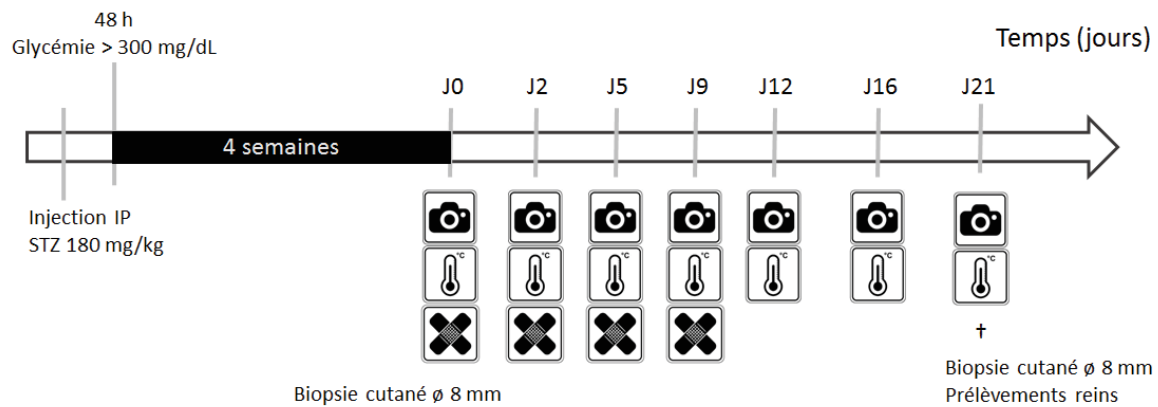
- Souris C57/BL6j, mâles, 5 semaines,
- Glycomètre,
- Streptozotocin (Abcam, S0130-500MG),
- Leica,
- Sonde rectale,
- Pansements à tester (groupe A et B),
- Crème dépilatoire Veet[®],
- Derma-roller 0,5mm 540 (TinkSky[®]),
- Colle chirurgicale Kwik-Sil[®],
- Anneaux anti-contractions,
- Caméra thermique Cedip MW infrared camera (Titanium 640x512 pixels)
- Multimètre,

Solutions à préparer :

Streptozotocine	
	Volume pour 1 mL
Streptozotocine S0130-500MG (Abcam) MW = 26.22 g/mol	30 mg
Sodium citrate pH 4,5	QSP 1 mL

La solution doit être préparé extemporanément : elle est stable 5 minutes à TA.

PFA 4%		
	Concentration finale	Volume pour 80 mL
PFA 32% 15714 (Electron Microscopy Sciences)	4%	10 mL
PBS 1X eau DEPC		70 mL

Protocole :

Appareil photo = photo Leica ; Jauge température = acquisition caméra thermique ; Pansement = changement de pansement

1. Préparation des anneaux anti-contractions en colle thermo fusible ($\varnothing_{\text{ext}} = 20\text{mm}$ et $\varnothing_{\text{int}} = 12\text{mm}$) et stérilisation.

Induction du diabète

2. Peser et mettre les souris à jeun pendant 6 heures, le matin de préférence.
3. Préparer la solution de streptozotocine à 30 mg/mL.
4. Injecter la solution à 180 mg/kg en IP.
5. Mesurer la glycémie des souris 48 heures post injection. Une glycémie supérieure à 300mg/dL indique le premier jour de diabète chez la souris.

Biopsie cutanée et mise en place du pansement

6. Après 4 semaines révolues de diabète, dépiler les souris à la crème Veet®
7. Le lendemain, anesthésier la souris à l'isoflurane 2%,
8. Désinfecter la zone,
9. Utiliser un punch de biopsie de 8 mm pour prélever le tissu cutané, l'utilisation de ciseaux fins peut être nécessaire pour découper la zone. Placer la biopsie dans du PFA 4% et incuber sur la nuit à 4°C.
10. Prendre une photo avec le Leica,
11. Relever la température de l'animal,
12. Lancer l'acquisition du film avec la caméra thermique,
13. Micro-perforer le pansement avec le derma-roller. Le pansement est découpé à une taille légèrement inférieure que l'anneau anti-contraction.
14. Après 2 minutes, placer le pansement avec de la colle KwikSil®,
15. Fixer l'anneau anti-contraction avec la colle,
16. Après 2 minutes, arrêter l'acquisition,
17. Surveiller la souris jusqu'à son réveil.

Suivi de la cicatrisation

18. Vérifier 2 fois par jour que le pansement et l'anneau ne sont pas décollés.

19. Anesthésier l'animal à l'isoflurane 2%,
20. Relever température rectale,
21. Lancer le film avec la caméra thermique, attendre 2 min,
22. Retirer anneau + pansement avec une pince, attendre 2 min,
23. Film en position stop,
24. Nettoyer la plaie avec une compresse stérile et du liquide physiologique,
25. Photographier la plaie avec le Leica,
26. Redémarrer l'acquisition du film thermique, attendre 2 min,
27. Couvrir la plaie avec un nouveau pansement microperforé puis l'anneau anti-contraction, attendre 2 min et arrêter le film,
28. Surveiller la souris jusqu'à son réveil.

Les phases de 2 minutes permettent de stabiliser la température pour obtenir des variations à la suite d'un stimulus (retrait du pansement, etc.). Le pansement et l'anneau sont maintenus jusque J12. Le suivi photographique de la cicatrisation et de la variation de la température est poursuivi jusque J21.

Sacrifice et prélèvements

29. Anesthésier l'animal à l'isoflurane 2%,
30. Relever température rectale,
31. Mesurer la glycémie et le poids,
32. Photographier la plaie au Leica,
33. Lancer le film avec la caméra thermique, attendre 2 min puis arrêter l'acquisition,
34. Prélever tissu cutané avec punch de biopsie de 8 mm. Placer la biopsie dans du PFA 4% et incuber sur la nuit à 4°C.
35. Sacrifier la souris et prélever les reins (un est placé dans du PFA 4% et l'autre est plongé dans de l'azote liquide).

Fixation des biopsies cutanées (Wang et al., 2013)

36. Laver 5 fois pendant 30 min les biopsies dans du PBS 1X (on peut les placer dans une plaque de 24 puits),
37. Incuber pendant 2h à TA dans du tampon sucrose 20%,
38. Incuber pendant 4h à TA dans du tampon sucrose 20%,
39. Couper la biopsie en deux par le milieu et placer les deux morceaux perpendiculaires au fond du cryomoule (côté coupé vers le bas),
40. Recouvrir d'OCT et congeler dans un bain d'isopentane, refroidi dans de l'azote liquide,
41. Envelopper dans du papier aluminium et conserver à -80°C.

Analyse de la taille de la plaie

42. Avec ImageJ, mettre la photo à l'échelle,
43. Tracer le contour de la plaie par 3 fois, relever les valeurs,
44. Calculer le % de fermeture de la plaie par rapport à la taille à J0.

Analyse des données de la caméra thermique

45. Sur le logiciel Altair, créer un outil de même dimension que le diamètre interne de l'anneau anti-contraction, conserver ce même outil pour toutes les souris.

46. Exporter les valeurs moyennes de cette zone en fonction du temps,
 47. Calculer la variation de température à chaque seconde d'enregistrement entre la valeur maximale atteinte à la fin de l'enregistrement (stabilisation de la température cutané superficielle) pour obtenir une courbe qui montre l'évolution de la température au moment du retrait du pansement.

Cicatrisation aigue

But : Etude comparative en aveugle entre 2 pansements : un pansement hydrocellulaire avec une monocouche de graphène et un pansement hydrocellulaire seul sur un modèle de souris saine.

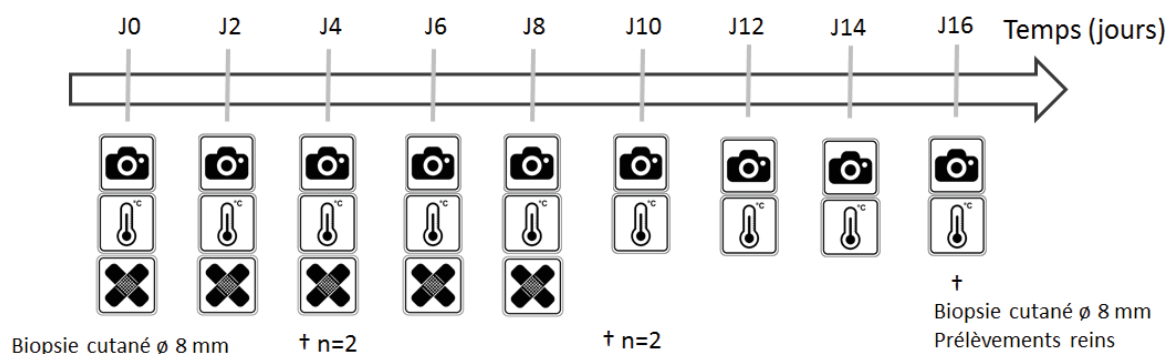
Matériel :

- Souris C57/BL6j, mâles, 9 semaines,
- Leica,
- Sonde rectale,
- Pansements à tester (groupe A et B),
- Bandes de pHmètrie,
- Multimètre,
- Crème dépilatoire Veet[®],
- Derma-roller 0,5mm 540 (TinkSky[®]),
- Colle chirurgicale Kwik-Sil[®],
- Anneaux anti-contractions,
- Caméra thermique Cedip MW infrared camera (Titanium 640x512 pixels)

Solutions à préparer :

PFA 4%		
	Concentration finale	Volume pour 80 mL
PFA 32% 15714 (Electron Microscopy Sciences)	4%	10 mL
PBS 1X eau DEPC		70 mL

Protocole :



Appareil photo = photo Leica ; Jauge température = acquisition caméra thermique ; Pansement = changement de pansement

Biopsie cutanée et mise en place du pansement

1. Dépiler les souris à la crème Veet[®]
2. Le lendemain, anesthésier la souris à l'isoflurane 2%,

3. Désinfecter la zone,
4. Photo à la caméra thermique,
5. Utiliser un punch de biopsie de 8 mm pour prélever le tissu cutané, l'utilisation de ciseaux fins peut être nécessaire pour découper la zone. Placer la biopsie dans du PFA 4% et incuber sur la nuit à 4°C.
6. Prendre une photo avec le Leica,
7. Relever la température de l'animal,
8. Lancer 2 min d'acquisition avec la caméra thermique,
9. Micro-perforer le pansement avec le derma-roller. Le pansement est découpé à une taille légèrement inférieure que l'anneau anti-contraction.
10. Placer le pansement avec de la colle KwikSil®,
11. Fixer l'anneau anti-contraction avec la colle,
12. Après 2 minutes, arrêter l'acquisition,
13. Surveiller la souris jusqu'à son réveil.

Suivi de la cicatrisation

14. Vérifier 2 fois par jour que le pansement et l'anneau ne sont pas décollés.
15. Anesthésier l'animal à l'isoflurane 2%,
16. Relever température rectale,
17. Lancer le film avec la caméra thermique, attendre 2 min,
18. Retirer anneau + pansement (mesure de conductance) avec une pince, attendre 2 min,
19. Film en position stop,
20. Nettoyer la plaie avec une compresse stérile et du liquide physiologique,
21. Photographier la plaie avec le Leica,
22. Relever le pH de la plaie avec le papier pH,
23. Redémarrer l'acquisition du film thermique, attendre 2 min,
24. Couvrir la plaie avec un nouveau pansement microperforé puis l'anneau anti-contraction, attendre 2 min et arrêter le film,
25. Surveiller la souris jusqu'à son réveil.

Les phases de 2 minutes permettent de stabiliser la température pour obtenir des variations à la suite d'un stimulus (retrait du pansement, etc.). Le pansement et l'anneau sont maintenus jusque J10. Le suivi photographique de la cicatrisation et de la variation de la température est poursuivi jusque J16.

Sacrifice et prélèvements

26. Anesthésier l'animal à l'isoflurane 2%,
27. Relever température rectale,
28. Mesurer la glycémie et le poids,
29. Photographier la plaie au Leica,
30. Lancer le film avec la caméra thermique, attendre 2 min puis arrêter l'acquisition,
31. Prélever tissu cutané avec punch de biopsie de 8 mm. Placer la biopsie dans du PFA 4% et incuber sur la nuit à 4°C.
32. Sacrifier la souris et prélever les reins (un est placé dans du PFA 4% et l'autre est plongé dans de l'azote liquide).

Fixation des biopsies cutanées (Wang et al., 2013)

33. Laver 5 fois pendant 30 min les biopsies dans du PBS 1X (on peut les placer dans une plaque de 24 puits),
34. Incuber pendant 2h à TA dans du tampon sucrose 20%,
35. Incuber pendant 4h à TA dans du tampon sucrose 20%,
36. Couper la biopsie en deux par le milieu et placer les deux morceaux perpendiculaires au fond du cryomoule (côté coupé vers le bas),
37. Recouvrir d'OCT et congeler dans un bain d'isopentane, refroidi dans de l'azote liquide,
38. Envelopper dans du papier aluminium et conserver à -80°C.

Analyse de la taille de la plaie

39. Avec ImageJ, mettre la photo à l'échelle,
40. Tracer le contour de la plaie par 3 fois, relever les valeurs,
41. Calculer le % de fermeture de la plaie par rapport à la taille à J0.

Analyse des données de la caméra thermique

42. Sur le logiciel Altair, créer un outil de même dimension que le diamètre interne de l'anneau anti-contraction, conserver ce même outil pour toutes les souris.
43. Exporter les valeurs moyennes de cette zone en fonction du temps,
44. Calculer la variation de température à chaque seconde d'enregistrement entre la valeur maximale atteinte à la fin de l'enregistrement (stabilisation de la température cutané superficielle) pour obtenir une courbe qui montre l'évolution de la température au moment du retrait du pansement.

Etudes des propriétés physiologiques

Préparation des microsomes

Protocole gracieusement fourni par le Dr Albano Meli, CRCN Inserm dans l'équipe de recherche.

But : Séparer par centrifugation différentielle les membranes du RS qui correspondent à une fraction isolée, riche en récepteur de la Ryanodine.

Matériel :

- Balance de précision,
- Centrifugeuse à 4°C,
- Doucer en verre,
- Ultracentrifugeuse Optima™ L-90K (Beckman Coulter),

Solutions à préparer :

Lysis buffer		
	Concentration finale	Volume pour 1 mL
Tris maleate pH 6,8 10mM	50 mM	Qsp 1mL
Na3VO4 200 mM	1 mM	5 uL
NaF 350mM	20 mM	175 uL
Cocktail inhibiteur 10X	1X	100 uL

Protocole :

1. Peser les échantillons de muscle conservé à -80°C,
2. Placer entre 60 et 150 mg de tissu dans un doucer en verre,
3. Ajouter du lysis buffer en fonction de la quantité de tissu (entre 300 et 600 µL), laisser incuber 2 min à 4°C,
4. Centrifuger l'homogénat tissulaire à 8 000g, 20 min, 4°C,
5. Récupérer le surnageant et le faire tourner dans l'ultracentrifugeuse à 32 000 rpm, 1h =, 4°C (rotor SW-60Ti),
6. Récupérer une partie du surnageant si la fraction cytosolique est intéressante sinon jeter le surnageant,
7. Suspendre les culots (membranes du RS isolées) avec un volume de tampon de lyse + sucrose (300 mM concentration finale) à ajouter (volume à adapter en fonction de la taille du culot),
8. Aliquoter, congeler rapidement dans de l'azote liquide et conserver à -80°C.

Technique d'enregistrement électrophysiologique de bilayer – bicouche lipidique plane

Protocole gracieusement fourni par le Dr Albano Meli, CRCN Inserm dans l'équipe de recherche.

But : Etudier les caractéristiques électrophysiologique du canal ionique RyR1 reconstitué *in vitro*.

Solutions à préparer :

Solution <i>cis</i> , pH 7,35 = cytosol	
	Concentration finale
EGTA	1 mM
Hepes/Tris	250/125 mM
KCl	50 mM
CaCl ₂	0,64 mM

Solution <i>trans</i> , pH7,35 = intérieur du RS	
	Concentration finale
Ca(OH) ₂	53 mM
KCl	50 mM
Hepes	250 mM

Protocole :

Formation de la bicouche lipidique

1. Déposer entre 0,3 et 1 µL de microsomes dans le compartiment *cis*,
2. Ajouter 400-500 mM de KCl dans le compartiment *cis* pour le rendre hypoosmotique et favoriser la fusion de la bicouche lipidique. Le gradient doit être de 500/50 mM entre les compartiments *cis/trans*.
3. Attendre jusqu'à fusion avec la bicouche lipidique (augmentation de l'amplitude de courant),
4. Perfuser le compartiment *cis* avec 10 mL de solution *cis*, pour revenir à 150 nM Ca²⁺,
5. Mesurer les courants à 0mV avec l'amplificateur BC-535D (Warner Instruments) et filtrés à 1kHz,
6. Acquérir les données avec l'interface Digidata 1550B et le logiciel Axoscope 10.7 (Molecular Devices) à la fréquence d'acquisition 4 KHz,
7. Ajouter du calcium dans le compartiment *cis* (de 150 nM à 10 µM final). La fréquence d'ouverture et de fermeture du ou des canaux doit graduellement augmenté avec la concentration calcique,
8. Ajouter de l'ATP sodium (5mM) dans le compartiment *cis* (de 150 nM à 10 µM final). La fréquence d'ouverture et de fermeture du ou des canaux doit graduellement augmenter avec la concentration d'ATP,
9. Ajouter 5µM de Ryanodine ou du rouge de Ruthenium pour fermer les canaux et vérifier ainsi la spécificité des canaux fusionnés avec la bicouche lipidique,
10. Analyser les traces avec le logiciel ClampFit 10.7 (Molecular Devices),
11. Déterminer la probabilité d'ouverture du canal, la durée d'ouverture et de fermeture du canal et la fréquence d'ouverture du canal.

Respiration mitochondriale – utilisation de l’oxygraphe Oroboros

Protocole gracieusement fourni par le Dr Claire Angelbaut –Prouteau (chercheuse postdoctorante dans l’équipe)

But : Vérifier l’intégrité de la membrane mitochondriale

Matériel :

- Oxygraphe Oroboros 2k,
- Centrifugeuse à 4°C,
- Trypsine 0,25%
- Homogénéisateur à hélices 441-0390 (WWR International),

Solutions à préparer :

Mir05 pH 7.1	
	Concentration finale
EGTA	0,5 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	3 mM
K Lactobionate	60 mM
Taurine	20 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
HEPES	20 mM
Sucrose	110 mM
BSA	1 mg/mL

Buffer A (Lanza and Nair, 2009), pH 7,2	
	Concentration finale
KCl	100 mM
Tris	50 mM
MgCl ₂	5 mM
ATP	1,8 mM
EDTA	1 mM

Protocole :

1. Lancer le logiciel OroborosDat Lab,
2. Connecter l’oxygraphe,
3. Laver les chambres 3 fois jusqu’à la hauteur du joint avec de l’eau distillée,
4. Injecter 2 mL de tampon Mir05 par chambre avec les chambres ouvertes et laisser l’oxygraphe stabiliser pendant 45 min,
5. Récupérer une partie des échantillons frais (non congelés) de souris dans des aliquots de 750 µL de buffer A à 4°C,
6. Jeter le buffer A, pipeter 500 µl de Trypsine (0,25%) dans chaque aliquot, incuber 2 min à TA,
7. Jeter la trypsine et laver le tissu avec 750 µL de buffer A à 4°C,
8. Potterisation 1 600 rpm jusqu’à obtenir une légère coloration du tampon buffer A,
9. Ajout de 100 µL d’homogénat dans chaque chambre d’oxygraphie,

10. Fermer la chambre (il ne doit plus y avoir de bulles),
11. Ajouter 20 μL de malate et 20 μL de pyruvate (tous les deux à 0.5M, conservé à 4°C, MW = 110.04 g/mol),
12. Attendre une stabilisation du flux en rouge,
13. Ajouter 20 μL d'ADP (préparer le jour même à 64.08mg/mL, MW = 427.20 g/mol),
14. Attendre une stabilisation du flux en rouge,
15. Ajouter 20 μL de cytochrome c (à 0.012 $\mu\text{g}/\text{mL}$ peser le minimum environ 1 mg qui donnera un peu moins de 100 μL)
16. Attendre une stabilisation du flux en rouge,
17. Ajouter 40 μL de succinate,
18. Attendre une stabilisation du flux en rouge.
19. Laver les seringues utilisées 3 fois à l'eau. Laver l'oxygraphe 3 fois avec de l'eau distillée, 1 fois avec de l'éthanol 70% (5 min max) et 3 fois avec de l'eau distillée,
20. Si l'ajout de cytochrome c n'augmente pas la respiration de plus de 30%, les membranes mitochondriales sont préservées et une analyse du cytochrome c dans les fractions cytosoliques et mitochondriales est possible,

Centrifugation différentielle

21. Centrifuger à 700 g le reste de l'échantillon pendant 10 minutes à 4°C et récupérer le surnageant,
22. Centrifuger à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C et dans le surnageant c'est le cytosol et dans le culot les mitochondries enrichies,
23. Laisser l'Oroboros dans de l'éthanol 70%, ne pas verrouiller les chambres.

Analyses biologiques

Isolement des fractions mitochondriale et cytosolique

But : Séparer la fraction mitochondriale de la fraction cytosolique et doser la quantité de protéines totales dans des échantillons de lysat musculaire pour normaliser l'expression de protéines cibles.

Matériel :

- Balance de précision,
- Centrifugeuse à 4°C,
- Homogénéisateur à hélices 441-0390 (WWR International),
- Kit dosage BCA #23227 (Thermo Scientific),
- Plate shaker,
- Incubateur 37°C,
- TECAN infinite M200PRO
- Pipette distributrice,

Solutions à préparer :

Buffer A (Lanza and Nair, 2009), pH 7,2	
	Concentration finale
KCl	100 mM
Tris	50 mM
MgCl ₂	5 mM
ATP	1,8 mM
EDTA	1 mM

Protocole :

1. A partir de tissu congelé, peser 24-25 mg de tissu, plonger le tissu dans de l'azote liquide,
2. Placer le tissu à homogénéiser dans le tube en verre à 4°C.
3. Ajouter 500 µL de buffer A. Incuber 30 sec puis passer au potter à 16 000 rpm,
4. Attendre la coloration du buffer A (moins de 30 secondes),
5. Récupérer la solution et jeter le tissu,
6. 1^{ère} centrifugation : 700 g (rcf) 10 min → récupérer le surnageant,
7. 2^{ème} centrifugation : 8000 g (rcf) 10 min → surnageant = fraction cytosolique / culot = fraction mitochondriale
8. Utiliser des cônes fins pour récupérer le surnageant et laisser uniquement le culot,
9. Possibilité de congeler les fractions (penser à aliquoter 10 µL de fraction cytosolique pour un dosage BCA),

Dosage BCA

10. Reprendre les culots de fraction mitochondriales avec 25µL de buffer A,
11. Prélever 2,5µL de l'échantillon mitochondrial re-solubilisé et le mettre dans 10µL d'eau distillée (dilution finale 1/5^{ème}),
12. Diluer les fractions cytosoliques 1 : 2 final avec de l'eau distillée,

13. Prélever 5µL d'échantillon ou de standards (conservés au -20°C) par puits (voir le plan de plaque 96 puits),
14. Ajouter 100 µL du mélange entre les solutions « A » et « B » (dilution 1 : 50 entre réactif A et B) à l'aide de la pipette distributrice,
15. Agiter la plaque sur un « plate shaker » pendant 30 secondes à RT,
16. Couvrir la plaque avec un film (repérer emplacement du 1^{er} puits) et incuber à 37°C pendant 30 min,
17. Faire refroidir la plaque à RT puis mesurer l'absorbance à 562 nm sur le TECAN.

Western blot

But : Evaluer le niveau d'expression de protéines cibles. Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaires et des anticorps primaires spécifiques les reconnaissent et permettre avec des anticorps secondaires de visualiser une fluorescence en fonction de la quantité de protéine présente dans l'échantillon. On utilise des protéines de dépôt pour normaliser les résultats.

Matériel :

- Balance de précision,
- Centrifugeuse à 4°C,
- Douncer en verre
- Kit dosage RC/DC (Bio-Rad),
- Spectrophotomètre,
- Système de migration SDS Page,
- Système de transfert liquide à froid.

Solutions à préparer :

Lysis buffer		
	Concentration finale	Volume pour 1 mL
Tris maleate pH6,8 10mM	50mM	Qsp 1mL
Na3VO4 200 mM	1 mM	5 uL
NaF 350mM	35mM	100 uL
Cocktail inhibiteur 10X	1X	100 uL

Sample buffer 4X pH 6,8	
	Volume pour 50 mL
Glycerol 99%	10 mL
SDS	2 g
Tris 1,5M	0,76 g
Bromophenol blue	
Beta mercapto ethanol	1%

Tampon de migration	
	Volume pour 1L
TG 10X	100 mL
SDS 20%	5 mL
Eau miliQ	Qsp 1L

Tampon de transfert	
	Volume pour 1L
TG 10X	100
Ethanol 100%	200
SDS 20%	5
Eau miliQ	Qsp 1L

Composition des gels continus d'acrylamide (x2 gels)			
	5%	15%	3%
Eau milliQ	11,35 mL	4,7 mL	6,875 mL
Acrylamide 37,5 :1 (30%)	3,3 mL	10 mL	825 µL
Tris 1,5M pH 8,8	5 mL	5 mL	
Tris 1,5M pH 6,8			277 µL
SDS 20%	100 µL	100 µL	80 µL
isopropanol	20 µL	20 µL	8 µL
APS 20%	100 µL	100 µL	80 µL
Temed	10 µL	10 µL	10 µL

Composition des gels discontinus d'acrylamide (x2 gels)			
	6%	20%	4%
Eau milliQ	5,4 mL	1,05 mL	4,95 mL
Acrylamide 37,5 :1 (30%)	2 mL	9,98 mL	0,825 mL
Tris 1,5M pH 8,8	2,5 mL	3,75 mL	
Tris 1,5M pH 6,8			207,8 µL
SDS 20%	50 µL	75 µL	60 µL
isopropanol	10 µL	15 µL	6 µL
APS 20%	50 µL	75 µL	60 µL
Temed	5 µL	7,5 µL	7,5 µL

Composition des gels gradients d'acrylamide (x1 gel)			
	2%	4%	20%
Eau milliQ	3,25 mL	3 mL	0,5 mL
Glycérol 100%	0,25 mL	0,25 mL	0,75 mL
Acrylamide 49 :1 (40%)	0,25 mL	0,5 mL	2,5 mL
Tris 1,5M pH 8,8	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
SDS 20%	25 µL	25 µL	25 µL
Propan2ol	5 µL	5 µL	5 µL
APS 20%	20 µL	20 µL	10 µL
Temed	6 µL	6 µL	4 µL

Protocole :

Extraction et dosage protéique

1. Peser le tissu à homogénéiser à la balance de précision en gardant l'échantillon au froid,
2. Calculer volume de lysis buffer (1 mg de tissu à homogénéiser dans 20 µL de lysis buffer),
3. Placer l'échantillon dans un potter (douncer) en verre de 1 mL dépoli,

4. Pipeter le volume de lysis buffer (20 μ L pour 1 mg, volume maximal de 600 μ L) et laisser agir sur le tissu dans la glace 2 min,
5. Homogénéiser le tissu dans le Douncer avec la tige « tight » jusqu'à coloration du lysis buffer,
6. Après environ 10 min de broyage, récupérer à la pipette le lysat de tissu dans un nouvel aliquot,
7. Centrifugation 20 min, à 4°C, à 8 000 g (rcf),
8. Récupérer le surnageant dans un nouvel aliquot et le doser avec le kit RCDC (réf) en suivant les instructions du fournisseur,
9. Calculer volume de lysat pour obtenir la quantité de protéines totales désirées (20, 50 ou 100 μ g en fonction des anticorps à utiliser),

Electrophorèse

10. Ajouter du sample buffer pour obtenir une concentration finale de 1 ou 2X,
11. Chauffer les échantillons pour dénaturation si nécessaire,
12. Déposer les échantillons sur les gels gradients,
13. Migration 1-2h (en fonction du maillage des gels) à 160V,
14. Transfert liquide à froid sur membrane de nitrocellulose 0,2 μ m 100 V pendant 1h,
15. Rinçage membranes PBS 1X (*rouge Ponceau & bleu de Coomassie possibles pour vérifier qualité du transfert*),
16. Saturation 45 min à TA dans blocking buffer / PBS 1X vav,
17. Incubation des anticorps primaire (dilués blocking buffer / PBS 1X vav) sur la nuit, à 4°C, avec agitation,
18. 3 lavages de 5 min dans PBS/tween 20 0,1%, avec agitation,
19. Incubation 1 h des anticorps secondaires au 1/10 000^{ème} dans le noir, avec agitation,
20. 3 lavages de 5 min dans PBS/tween 20 0,1%, avec agitation,
21. 1 lavage rapide dans PBS 1X, avec agitation,
22. Révélation Odyssey.

Oxyblot

But : Quantifier les modifications de carbonylation qui se produisent sous l'effet d'un stress oxydant.

Matériel : Kit Protein Oxidation Detection (Millipore Corporation)

Protocole : Utiliser le kit suivant les instructions du fabricant. Brièvement, linéariser 20 μ g de protéines avec du SDS. Faire réagir les groupement carbonyles avec le dinitrophénylhydrazine (DNPH) ou avec un contrôle négatif. La réaction est stoppée et le complexe est déposé sur gel d'acrylamide. Les protéines sont séparées, puis transférées et révélées avec un anticorps primaire anti-DNPH (1 /300ème, lapin, Millipore Corporation).

Immunoprécipitation du RyR1

But : Quantifier les modifications post traductionnelles du RyR et la relation avec ses protéines régulatrices

Matériel :

- Balance de précision,
- Potter en verre dépoli,
- Centrifugeuse à 4°C,
- Billes de sépharose (prot G pour AC souris et prot A pour AC lapin),
- Plaque chauffante à 40°C,
- Cuve de migration et générateur,
- Cuve de transfert et générateur,
- Système de révélation Odyssey (Li-COR Biosciences).

Solutions à préparer :

Lysis buffer		
	Concentration finale	Volume pour 1 mL
Tris maleate pH6,8 10mM	50mM	Qsp 1mL
Na3VO4 200 mM	1 mM	5 uL
NaF 350mM	35mM	100 uL
Cocktail inhibiteur 10X	1X	100 uL

Tampon RIPA		
	Concentration finale	Volume pour 1 mL
Tris HCl pH7,4 10mM	10mM	Qsp 1mL
NaCl 150 mM	150 mM	Qsp 1mL
Triton 10 %	1%	100 uL
NaF 350mM	5mM	14,2 uL
Na3VO4 200 mM	1 mM	5 uL
Cocktail inhibiteur 10X	1X	100 uL

Sample buffer 4X pH 6,8	
	Volume pour 50 mL
Glycerol 99%	10 mL
SDS	2 g
Triton 10 %	0,76 g
Bromophenol blue	
Beta mercapto ethanol	1%

Protocole :

23. Peser le tissu à homogénéiser à la balance de précision en gardant l'échantillon au froid,
24. Calculer volume de lysis buffer (1 mg de tissu à homogénéiser dans 20 µL de lysis buffer),
25. Placer l'échantillon dans un potter (douncer) en verre de 1 mL dépoli,
26. Pipeter le volume de lysis buffer (20 µL pour 1 mg, volume maximal de 600µL) et laisser agir sur le tissu dans la glace 2 min,

27. Homogénéiser le tissu dans le Douncer avec la tige « tight » jusqu'à coloration du lysis buffer,
28. Après environ 10 min de broyage, récupérer à la pipette le lysat de tissu dans un nouvel aliquot,
29. Centrifugation 20 min, à 4°C, à 8.000 g (rcf),
30. Récupérer le surnageant dans un nouvel aliquot et le doser avec le kit RCDC (réf) en suivant les instructions du fournisseur,
31. Calculer volume de lysat pour obtenir 180 ug de protéines totales,
32. Placer 150 ug de protéines totales avec QSP à 100 uL avec lysis buffer,
33. Laver les billes de sepharose 3 fois avec 1 mL de PBS 1X,
34. Preclear des échantillons avec ajout de 35 uL de billes de sepharose A par IP, incubation sur roue à 4°C pendant 1h,
35. Centrifugation 1 min, 800 g, 4°C pour culotter les billes de sepharose A, récupérer le surnageant dans un nouvel aliquot (*il est possible de décrocher les protéines des billes pour vérifier que le RyR n'est pas présent dans cette partie à cette étape*).
36. Ajouter 2-3 ug d'anticorps anti-RyR par IP, incubation 2 heures à 4°C,
37. Ajouter 35 uL de billes par IP, incubation 2 heures à 4°C ou sur la nuit à 4°C avec agitation,
38. Laver 2 fois les billes avec 1 mL tampon Ripa puis 1 fois avec 1 mL de lysis buffer (centrifugation 1 min, 800 g, 4°C puis aspiration du surnageant),
39. Décrochage protéines avec 20 uL de sample buffer 4X,
40. Dénaturation protéines 10 min à 40°C,
41. Centrifugation 1 min, TA, 8.000 g pour casser les billes et récupération de 20 uL de surnageant par IP,
42. Dépôt de 15 uL des IP sur un gel 4-20 % pour visualiser la calstabin et de 5 uL sur un gel fixe 6% pour visualiser uniquement le RyR,
43. Migration à 160 V pendant 1h30 – 1h45,
44. Transfert liquide à froid sur membrane de nitrocellulose 0,2 um 100 V pendant 1h,
45. Rinçage membranes PBS 1X (*rouge Ponceau & bleu de Coomassie possibles pour vérifier qualité du transfert*),
46. Saturation 45 min à TA dans blocking buffer / PBS 1X vav,
47. Incubation des anticorps primaire (dilués blocking buffer / PBS 1X vav) sur la nuit, à 4°C, avec agitation,
48. 3 lavages de 5 min dans PBS/tween 20 0,1%, avec agitation,
49. Incubation 1 h des anticorps secondaires au 1/10 000^{ème} dans le noir, avec agitation,
50. 3 lavages de 5 min dans PBS/tween 20 0,1%, avec agitation,
51. 1 lavage rapide dans PBS 1X, avec agitation,
52. Révélation Odyssey.

Dosage Milliplex

But : Quantifier simultanément plusieurs protéines cibles à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps. Le lysat cellulaire contenant les protéines cibles est isolé et un LUMINEX permet de compter les billes magnétiques de chaque protéines d'intérêt.

Matériel : LUMINEX et kit Milliplex

Protocole : Utiliser le kit suivant les instructions du fabricant. Brièvement, préparer une gamme de standards étalons et des contrôles, diluer les échantillons et les placer dans une plaque 96 puits.

Préparer les billes magnétiques, couplés aux anticorps et les ajouter aux échantillons. Après incubation sur la nuit, isoler le complexe billes + anticorps + protéines d'intérêt. Utiliser le LUMINEX pour estimer la concentration des protéines cibles.

Dosage ELISA

But : Quantifier les protéines cibles à l'aide d'anticorps recouvrant des plaques de 96 puits (ELISA).

Matériel : Kit Protein Oxidation Detection (Millipore Corporation)

Protocole : Utiliser le kit suivant les instructions du fabricant. Succinctement, déposer les échantillons dans les puits recouverts d'anticorps. Incuber puis ajouter l'anticorps secondaire se liant à l'antigène. Rincez pour éliminer les protéines non spécifiques et ajouter une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré pour révélation.

Analyses histologiques

Les analyses histologiques permettent d'apprécier quantitativement et qualitativement les biopsies musculaires réalisées. En fonction de la méthode de fixation des tissus (isopentane refroidi dans de l'azote liquide ou paraffine), deux méthodes de coupes ont été utilisées et les protocoles de coloration diffèrent :

- (1) Hématoxyline : colorant nucléaire violet,
- (2) Eosine : colorant cytoplasmique rose,
- (3) Bleu de l'aniline : colorant bleu des fibres de collagène.

Inclusion et coupe en paraffine

But : Préparer des coupes utilisables pour l'analyse histologique et certains anticorps spécifiques.

Matériel :

- Microtome Leica RM2125 RTS
- Automate inclusion paraffine EC350-1 (Myr)
- Automate inclusion STP 120 (Myr)

Solutions à préparer :

PFA 4%		
	Concentration finale	Volume pour 80 mL
PFA 32% 15714 (Electron Microscopy Sciences)	4%	10 mL
PBS 1X eau DEPC		70 mL

Protocole :

1. Disséquer les muscles de la paroi abdominale de la souris, tamponner l'excès de liquide sur du papier absorbant,
2. Placer le tissu dans une fiole en verre contenant 3 mL de PBS 1X dilué dans de l'eau DEPC,
3. Jeter le PBS et recouvrir le tissu avec du PFA 4% sous hotte. Incuber 1h, à RT sur un plateau oscillant,
4. Jeter le PFA, et incuber 4 fois 15 min avec du PBS 1X, à RT, sur plateau oscillant,
5. Laver l'échantillon avec une solution d'éthanol 25%, 30 min,
6. Laver l'échantillon avec une solution d'éthanol 50%, 30 min,
7. Laver l'échantillon avec une solution d'éthanol 75%, 30 min,
8. Placer l'échantillon dans une cassette d'histologie labellisée et placer les échantillons dans l'automate qui réalisera la fixation sur la nuit.
9. Inclure l'échantillon en en paraffine en prenant soin de respecter l'orientation du tissu (perpendiculaire au fond du moule pour réaliser des coupes transversales),
10. Conserver les blocs de paraffine à 4°C.

Coupes au microtome Leica RM2125 RTS

11. Couper transversalement les blocs de paraffine à une épaisseur de 8 µm,
12. Attraper la coupe avec des cures dents et la placer dans un bain marie remplie d'eau DEPC à 50°C.
13. Monter les coupes sur lame labellisée et laissé sécher les coupes sur une plaque à 52°C.
14. Conserver à 4°C.

Coloration Hématoxyline, éosine sur soupes en paraffine

Protocole gracieusement fourni par Annick Bourret du laboratoire de recherche

But : Visualiser le cytoplasme en rose et les noyaux cellulaires en violet pour étudier la structure du muscle

Matériel :

- Hotte extractrice,
- Cuves pour lames ou lamelles,
- Hématoxyline de Harris HHS16-500ML (Sigma),
- Etuve à 37°C,
- Four à 60°C,
- Eosine HT110116-500ML (Sigma),
- Histoclear,

Solution à préparer :

réactifs	X 5 lames - QSP 15 mL	X 10 lames - QSP 30 mL	X 15 lames - QSP 50 mL
PBS 10X (eau DEPC)	150 mL	200 mL	300 mL
Ethanol 75%, H ₂ O	11,25 mL éthanol absolu	22,5 mL éthanol absolu	37,5 mL éthanol absolu
Ethanol 50% PBS	7,5 ml éthanol absolu	15 mL éthanol absolu	25 mL éthanol absolu
Ethanol 25% PBS	3,75 ml éthanol absolu	7,5 mL éthanol absolu	12,5 mL éthanol absolu

Protocole :

1. Placer les lames la veille à l'étuve à 37°C pour parfaire le séchage et éviter les décollements,
2. Placer les lames au four 60°C, 30 min,
3. Refroidir TA, 10 min,
4. Placer les lames au four 60°C, 30 min,
5. Refroidir TA, 10 min,
6. Laver à l'histoclear, 20 min - 2 fois (sous sorbonne - gants),
7. Rincer rapidement à l'éthanol absolu,
8. Incuber 5 min dans éthanol absolu,
9. Incuber 5 min dans éthanol 75%,
10. Incuber 5 min dans éthanol 50%,
11. Incuber 5 min dans éthanol 25%,
12. Incuber 5 min dans PBS 10X,

13. Incuber 5 min avec hématoxyline de Harris (Sigma HHS16-500ML) filtrée avec un filtre de 0,2 µm,
14. Laver 10 fois à l'eau,
15. Incuber 5 min dans PBS 10X,
16. Incuber 5 min dans éthanol 25%,
17. Incuber 5 min dans éthanol 50%,
18. Incuber 5 min dans éthanol 75%,
19. Incuber 10 min avec éosine (Sigma HT110116-500ML),
20. Incuber 5 min dans éthanol 75% - 2 fois,
21. Incuber 5 min dans éthanol absolu - 2 fois,
22. Rincer rapidement avec de l'histoclear (sous sorbonne - gants),
23. Incuber 20 min avec histoclear (sous sorbonne - gants),
24. Monter la lame avec de le liquide de montage (entellan) + lamelle,

Conservation et coupe au cryostat

But : Préparer des coupes utilisables pour l'analyse histologique, immunohistologique et biochimique.

Protocole :

1. Refroidir un bécher d'isopentane dans de l'azote liquide, attendre l'apparition de cristaux blancs au fond du bécher,
2. Disséquer les muscles de la paroi abdominale de la souris, tamponner l'excès de liquide sur du papier absorbant,
3. Placer la biopsie sur une lame en verre et la plonger dans l'isopentane refroidi. La garder en mouvement continu à l'aide d'une pince pendant 90 secondes,
4. Récupérer le tissu et le conserver dans un cryotube labellisé dans de l'azote liquide puis à -80°C,

Coupes au cryostat HM 560

5. Ajuster la température de la chambre du cryostat à -20°C et celle du couteau à -22°C.
6. Coller l'échantillon suivant la direction de coupe souhaitée à la plateforme avec de l'OCT (Optimal Cutting Temperature Compound),
7. Réaliser la coupe à une épaisseur entre 8 et 10 µm,
8. Récupérer la coupe à l'aide d'une lamelle en verre en réalisant un choc thermique entre la température de la plaque et le doigt,
9. Eviter les décollements de tissu en plaçant les lamelles sur une plaque à 37°C,
10. Enrouler dans du papier aluminium les lames en prenant soin de chasser les bulles d'air, conserver à -80°C,

Coloration éosine/hématoxyline

11. A la place de l'étape 10, placer une goutte d'hématoxyline sur la coupe et incuber 2 min,
12. Laver la lamelle avec de l'eau courante pour retirer l'excédent d'hématoxyline,
13. Recouvrir la coupe d'éosine et incuber 30 secondes,
14. Rincer la lamelle dans des béciers d'eau courante,
15. Laisser la coupe sécher sur la plaque chauffante,
16. Monter la lamelle sur lames avec 50 µL de liquide de montage Entellan,
17. Vérifier l'orientation de coupe et analyser histologie du tissu avec une loupe ou un microscope,

18. Conserver les coupes à RT.

Coloration trichrome de Masson pour cryosections

Protocole gracieusement fourni par Gérald Hugon et Pierre Sicard du laboratoire de recherche

But : Visualiser le cytoplasme en rose et les noyaux cellulaires en violet et les fibres de collagène en bleu pour étudier la structure du muscle et l'éventuelle fibrose.

Matériel :

- Hématoxyline de Harris modifiée HHS16-500ml (Sigma)
- Accustain Trichrome Stain (Masson) kit HT15 (Sigma),
- Solution PFA 4%,
- Bousin's solution HT10132 (Sigma),
- EuKitt (milieu de montage contenant du xylène)
- Acide Acétique Glacial 0,1%

Protocole :

1. Placer les lames à RT,
2. Fixer les cryosections dans un bain de PFA 4%, à RT, 1h,
3. Incuber les cryocoupes une nuit à RT dans une solution de Bouin's pour intensifier la coloration et augmenter les contrastes des composants du tissu,
4. Laver les cryocoupes 2 minutes sous l'eau courante pour éliminer la couleur jaune puis laver à l'eau distillée milliQ,
5. Incuber dans hématoxyline de Harris pendant 3 min, éliminer la solution,
6. Laver à l'eau courante, 10 min, la coupe devient bleue puis rincer à l'eau distillée milliQ pendant 1 min,
7. Incuber en bain ou en gouttes pendant 5 min dans la solution de Biedritsch Scarlet-Acid Fuscine pour marquer les fibres en rouge. Éliminer la solution,
8. Laver 3 x 1 min avec de l'eau distillée milliQ,
9. Prépare la solution de phosphotungstic/Phosphomolybdic Acide pour l'étape suivante de coloration du collagène :
 - 1 volume de Phosphotungstic Acid solution (HT15.2)
 - 1 volume de Phosphomolybdic Acid solution (HT15.3)
 - 2 volumes d'eau distillée milliQ
10. Incuber en bain 10 min avec la solution puis éliminer sans sécher et sans rincer,
11. Incuber 5 min avec le bleu d'aniline,
12. Laver 3 fois 1 min avec eau distillée milliQ,
13. Tremper/rincer 2 secondes dans de l'acide acétique glacial à 0,1%,
14. Laver 2 fois 1 min avec de l'eau distillée milliQ,
15. Tremper/rincer 1 seconde dans des bains d'éthanol 70, 90 et 100%. Laisser sécher à l'air,
16. Monter sur lame avec une goutte de liquide de montage type Eukitt.

Immunofluorescence

But : Visualiser l'organisation des fibres musculaires en marquant le réseau d'actinine de biopsies musculaires.

Solution à préparer :

Blocking buffer		
	Concentration finale	Volume pour 1 mL
Goat sérum	1%	1 μ L
Triton 10%	0,2%	50 μ L
BSA 1%	0,1%	33 μ L
PBS 1X	1X	Qsp 1mL

Protocole :

1. Réhydrater les lames avec PBS1X,
2. Eliminer le PBS et fixer les cryocoupes avec du PFA 4% 10 min à RT, éliminer le PFA,
3. Laver les cryocoupes 2 fois 2 min avec du PBS,
4. Placer les cryocoupes dans une chambre humide et incuber 1 h avec du blocking buffer,
5. Placer une feuille de plastique sur les coupes pour éviter de sécher, fermer la chambre humide,
6. Incuber sur la nuit, à 4°C, avec 70 μ L d'anticorps primaire α actinin (sarcomeric) a7811 clone EA33, 1/600^{ème},
7. Laver 4 fois avec PBS 1X
8. Incuber 1 h, à RT, avec 90 μ L d'anticorps secondaire goat anti-mouse (488), 1/2000^{ème} dans du PBS BSA 0,5%,
9. Eliminer le film plastique, laver 4 fois 2 min avec PBS 1X
10. Sécher les lamelles,
11. Ajouter 1 à 2 gouttes de Mowiol® 4-88 81381 (Sigma) et monter sur lame.

Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart standard de la moyenne (SEM).

GraphPad Prism[®] a été utilisé comme logiciel d'analyses statistiques et pour monter les figures. La normalité des échantillons est évaluée avec un test de D'Agostino Pearson.

En fonction des données à comparer, nous avons utilisés :

- (1) Pour comparer 2 groupes : t test de *student* (valeur normales) ou Mann-Whitney
- (2) Pour comparer plus de 2 groupes : une analyse de la variance type ANOVA à un ou plusieurs facteurs. Pour éviter les faux positifs, un test post-hoc de *Bonferroni* est réalisé après le test ANOVA.

Le seuil de probabilité d'erreur est fixé pour $p < 0.05$.

Résultats

Les études présentées dans ce chapitre sont sous forme d'article scientifique en anglais accompagné d'une introduction et d'une conclusion en français.

L'étude 1 est actuellement soumise au Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.

L'étude 2 est composée des résultats préliminaires de nos études cliniques encore en cours de recrutement et l'étude 3 présente les résultats préliminaires d'une collaboration réalisée avec l'Institut Néel, durant ma 4^{ème} année de thèse sur le thème de la cicatrisation cutanée.

Etude 1 : RyR1, un nouvel acteur d'escarre

Introduction

Les escarres se développent selon le modèle d'une courbe sigmoïdienne en fonction de l'intensité de pression appliquée dans le temps (Leopold and Gefen, 2012). Les modèles d'escarres expérimentaux décrits utilisent généralement des compressions de forte intensité (> 250 mmHg) et/ou prolongée (>6 heures) (Salcido et al., 2007; Stekelenburg et al., 2005), ce qui n'est pas le reflet de la pratique clinique. Dans l'étude clinique, dont les résultats préliminaires sont décrits dans l'étude 2, les patients sont repositionnés toutes les 2 heures et la pression appliquée sur les zones à risque de développement d'escarre varie entre 30 et 150 mmHg. Nous nous sommes donc attachés à développer un modèle de souris utilisant deux intensités de compression : 50 et 100 mmHg sur une durée de 2 heures.

La littérature décrit sur des modèles de rat à 100 mmHg pendant 6 heures, une augmentation des cytokines inflammatoires (Sin et al., 2013; Siu et al., 2011), une activation des caspase initiateurs et effectrices et une diminution de l'autophagie (Teng et al., 2011a). D'autre part, un récent modèle *in vitro* de structure 3D de myoblastes de souris met en évidence une activation de la voie de mécanosenseurs MAPK, induisant une perméabilisation de la membrane cellulaire après 2 heures de compression (Wu et al., 2016). Comme décrit dans le chapitre 1, la cascade MAPK est associée à une dérégulation de l'homéostasie calcique cellulaire. Aussi dans ce papier nous nous intéressons à l'impact d'une compression sur la fonctionnalité et le remodelage du récepteur de la Ryanodine au travers d'un nouveau modèle de compression musculaire chez la souris.

Conclusion

Une compression statique de 50 ou 100 mmHg, induisant une ischémie de 2 heures sur notre modèle murin, induit une activation des caspases 8. Une augmentation du stress oxydant est relevée pour 100

mmHg ce qui entraîne un remodelage du RyR1 dans le muscle de la souris. L'hyperoxydation et S-nitrosylation mesurée entraîne une dissociation de la calstabin1 et une fuite calcique, quantifiée ici par une hausse de la probabilité d'ouverture du canal calcique. Après 3 jours, le remodelage et la dysfonction calcique ne se sont pas inversés. Un traitement d'une semaine avec du S107 permet de prévenir la dissociation de la calstabin1 et rétablir une homéostasie calcique. Nous émettons l'hypothèse que cette atteinte du RyR soit une étape préalable à la dégradation des muscles au cours d'une compression, étape initiatrice du développement d'escarre. La prévention pharmacologique de la fuite de RyR pourrait alors permettre de prévenir ou réduire le déclenchement d'escarre.

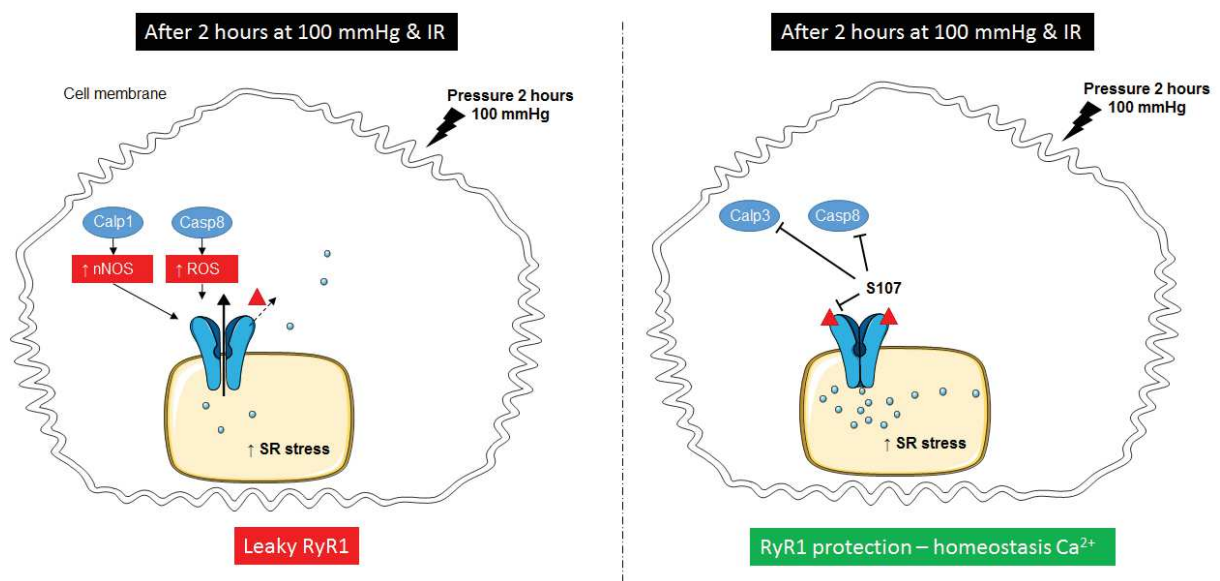


Figure 41 : Schéma bilan étude 1

Article

Title: RyR1 mediated calcium leak contributes to skeletal muscle damage in a mouse model of tissue compression

Short title: RyR1, a novel mediator of pressure ulcer

Marion Le Gall¹, Albano C. Meli^{*1,5}, Steve Reiken^{*2}, Albin Bernardin¹, Monia Souidi¹, Claire Angebault-Prouteau¹, Eric D. Agdeppa³, Stefan Matecki¹, Luc Téot⁴, Andrew R Marks², Alain Lacampagne^{1,5}

¹Phymedexp, Montpellier University, Inserm, CNRS, CHRU Montpellier, Montpellier France

² Department of Physiology and Cellular Biophysics, Clyde and Helen Wu Center for Molecular Cardiology Columbia University Vagelos College of Physicians and Surgeons, New York, USA.

³ Global Innovation Organization, Research and Development, Hill-Rom, Batesville, Indiana, USA.

⁴ Plastic Surgery in Wound Healing and Burns, CHRU Montpellier, Montpellier, France

⁵ LIA CNRS 1185, Montpellier, France

*Contributed equally to the work

Address for correspondence:

Dr. Alain Lacampagne

Phymedexp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214

CHU Arnaud de Villeneuve

371 Avenue du Doyen Gaston Giraud

34295 Montpellier, France

Email: alain.lacampagne@inserm.fr

Phone: +33 467 415 228 ; Fax: +33 467 415 242

Title: RyR1 mediated calcium leak contributes to skeletal muscle damage in a mouse model of tissue compression

Authors: Marion Le Gall, Albano C. Meli, Steve Reiken, Albin Bernardin, Monia Souidi, Claire Angebault-Prouteau, Eric D. Agdeppa, Stefan Matecki, Luc Téot, Andrew R Marks, Alain Lacampagne

Background: The tissues of a bedridden patient lying on a therapeutic surface are subjected to a mean pressure of 50 mmHg and a peak pressure of 100 mmHg around the sacrum, an area at high risk of pressure ulcers (PUs). Tissue compression has been associated with dysregulation of the cellular membrane of compressed tissues, impacting the cell homeostasis. This paper focuses on the effect of external strain on muscle where the first PU lesions are known to occur.

Methods: Abdominal muscles of C57BL6j mice were compressed at calibrated 0 (SHAM), 50 or 100 mmHg. After 2 hours of loading, blood and muscle biopsies were performed. Treatment of the mice with a rycal S107 that fixes ryanodine receptor mediated SR calcium (Ca^{2+}) leak was administrated via an osmotic pump for one week prior to the compression. To assess the reversibility of damage, other mouse groups were reperfused (IR) after 2h of compression. After 3 days post compression, blood samples and muscle biopsies were obtained and electrophysiological, biochemical and histologic analyses were performed.

Results: Compression of 100 mmHg (P100) for 2h resulted in SR Ca^{2+} leak (mean opening probability (P_o) 0.06 ± 0.03 for SHAM vs mean P_o of 0.31 ± 0.13 for P100), oxidative posttranslational modification of RyR1 ($p < 0.05$ for S-nitrosylation and oxidation ratio), and calstabin1 depletion from the RyR1 complex ($p < 0.05$). Caspase 8 activation occurred at P100 ($p < 0.05$) whereas caspase 3 and calpain 1/3 were unchanged. Treatment with rycal restored the binding between RyR1 and calstabin1 ($p < 0.05$) and significantly decreased caspase 8 activation. Cytokines were not altered following compression. IR resulted in similar changes in RyR1 leak (Mean P_o 0.68 ± 0.19 for IR), S-nitrosylation, and depletion of calstabin1. Rycal S107 prevented calstabin1 depletion from the RyR1 complex and RyR1 leak.

Conclusions: Taken together these findings show that tissue compression up to 100 mmHg causes a cellular oxidative state, activation of initiator caspase and SR Ca^{2+} leak. Those early modifications are not reversible up to 3 days of reperfusion but one week treatment with rycal S107 prior to compression prevents calstabin1 depletion and restore P_o to normal value.

Keywords: Pressure Ulcer, Pressure Injury, Ryanodine Receptor, Rycal, calcium homeostasis.

INTRODUCTION

A pressure ulcer (PU) or pressure injury is a localized damage to the skin and underlying soft tissue, usually over a bony prominence or related to a medical device use ¹. It occurs as a result of either intense or prolonged pressure or pressure in combination with shear. The tolerance of soft tissue for mechanical strain depends on intrinsic and extrinsic parameters such as microclimate, patient's nutrition, perfusion and co-morbidities ². PUs are classified in different stages (score 1 to 4) according to the level of tissue damage. Stage 1 is intact skin with non-blanchable redness and stage 4 is full thickness skin, fat and muscle tissue loss, damaging bones and tendons. A PU is a debilitating condition affecting more than 2.5 million US patients every year (in comparison more than 735,000 Americans suffer from heart attack annually) ^{3,4}. PU wounds impact the *health-related quality of life* (HRQoL) causing pain and affecting patients psychologically, financially, and socially ⁵. PUs are difficult to heal and have a high recurrence rate: More than 25% in the highest risk population such as spinal cord injury (SCI) patients ^{6,7}. Therefore, prevention is still best achieved using mobilization, every 2 to 3 hours, of the tissue under pressure and the use of medical devices to minimize mechanical strain from area at risk of PUs. However, the etiology of the disease needs to be better understood in order to propose preventive strategies and develop biomarkers to assess risk and tissue damage before skin breakdown ⁸.

It now appears that PUs do not develop superficially at the skin level but deeper at the level of the subcutaneous skeletal muscle tissue ^{9,10}. These findings suggest a relationship between pressure intensity and duration such that the number of dead cells will be the highest between the indentation and the bone in muscle tissues. Several hypotheses have been investigated: Ischemia, ischemia reperfusion (IR), mechanical deformation or lymphatic fluid pressure but, it is more likely that a combination of these factors contributes to PU development ¹¹.

In clinical trials, patients subjected to PUs suffer from several comorbidities and extracting the effect of one parameter in a cohort of patients is extremely complicated or even impossible ¹². Therefore, animal models remain a good alternative. However, existing models of PU involve either high pressure intensity (> 250 mmHg) or long compression (> 6 hours) to study wound development ^{13,14}. They are not clinically relevant because they do not provide insight as to early pathophysiological mechanisms. Activation of apoptotic pathways has been reported in rat muscles undergoing 100 mmHg static compression followed by release of inflammatory markers ¹⁵⁻¹⁷. Caspases 3 and 8 are activated after one compression of 6 hours as well as FoxO3, downregulating transcription of autophagy genes ¹⁸. Applying 100 mmHg of static compression for 6 hours, on two consecutive days resulted in muscle histologic damage with an upregulation of apoptotic proteins and a downregulation of the autophagy pathway.

Moreover, *in vitro* experiments using a 3D model of mouse skeletal myoblasts showed activation of the mechanosensor Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) cascade and cellular membrane permeabilization impairing cellular homeostasis after 2 hours of compression¹⁹. In light of these data, we hypothesized that even at low static compression of 100 mmHg applied for a short duration 2 hours, early events in muscle tissue may already developed and cause muscle cell apoptosis.

Activation of the MAPK cascade has been reported to be the result of Ca^{2+} in the cytosol^{20,21}. However, this Ca^{2+} elevation could be linked to activation of the Ryanodine Receptor (RyR), the largest intracellular ion channel which mediates Ca^{2+} release from the reticulum sarcoplasmic (SR) into the cytosol. Ryanodine Receptor isoform 1 (RyR1) channel is a homotetramer ion channel comprised by 4 RyR1 protomers of 565 kDa each. Each RyR1 protomer has more than 100 free cysteines which can be S-nitrosylated or oxidized under pathological conditions. Moreover, the opening and closing of the Ca^{2+} channel are tightly dependent of a 12 kDa stabilizing protein: Calstabin1, with a ratio of 4 calstabin1 proteins for 1 RyR1 protein. Depletion of calstabin1 coincided with a rise of the channel opening probability and a Ca^{2+} leak. Using those relevant literature insights, we can suppose that there may be a dysregulation of either the Ca^{2+} homeostasis or the RyR function during a muscle compression.

The present study focused on identifying the cellular pathways involved in PU etiology at clinically relevant pressure. To that, we developed for the first time a model of short (i.e. 2 hours) compression at 100 mmHg to evaluate the proximal response of skeletal muscle. We used a new mouse model in which we reproducibly strained the abdominal muscles with magnets at 100 mmHg for 2 hours on vigil animals. We evaluated the consequences of this compression on subcutaneous muscle proteins involved in apoptosis; autophagy; microanatomy; intracellular calcium homeostasis in muscles (i.e. structural and functional remodeling of the Sarcoplasmic reticulum calcium channel ryanodine receptor) as well as circulating inflammatory cytokines. Understanding how the muscle tissue behave after 2 hours of compression is clinically relevant as it is the minimum duration between 2 repositioning of patients in hospital settings. However, after patient repositioning, the muscles under strained suffer from IR which can further deregulate the cell metabolism. Therefore, we also checked the muscle tissue calcium homeostasis 3 days after the initial compression of 2 hours at 100 mmHg.

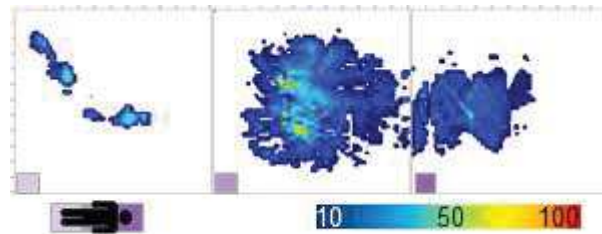
MATERIALS & METHODS

Animal model

All the experiments were conducted in accordance with a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Languedoc–Roussillon (n° 6441-2016081614209697). The pressure intensities used were based

on an undergoing clinical trial measurement (Clinical trial reference NCT02412046). Indeed, we applied similar pressure intensities than for a paraplegic patient lying supine on a therapeutic bed: 50 and 100 mmHg²² (figure SD1).

Fig. SD1 Interface pressure in a bedridden paraplegic at the sacrum area. Representative interface pressure intensity mapping of a patient lying on a therapeutic mattress. The mean interface value of the high risk of PU area (i.e. sacrum) is around 50 mmHg and the peaks are located around the ischial tuberosities at 100 mmHg value



Male C57BL/6j mice (Janvier Labs, France) were 9 weeks-old with a body weight of 23-25 g. Mice abdominal hair was shaved the day before the surgery. We adapted our protocol from Hashimoto et al²³. Briefly, a magnet (FE-S-10-03, Supermagnete, Germany) was implanted in the peritoneal cavity of each mouse under anesthesia (3% Isoflurane). 7 days later, static compression of 50 mmHg (P50) or 100 mmHg (P100) were applied with a similar magnet positioned on the abdominal skin, pinching the abdominal muscles (figure SD2). We ensure an accurate and reproducible pressure intensity between the magnets with two calibration weights for each pressure intensity (100 mmHg and 101 mmHg or 50 and 51 mmHg). The magnet was protected with a non-compressive dressing and the mice were conscious during the 2 hours of compression in order to overcome the undesirable effects of anesthesia. After 2 hours of compression, retro-orbital blood samples and skeletal abdominal muscles were collected. The muscles between the magnets and the surrounding muscle tissue (NC) were separately quick frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen, then stored at -80°C for biochemical and bilayer analysis. The muscles of some animals were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 minutes, washed in PBS, gradually dehydrated in ethanol and embedded in paraffin for histological analysis.

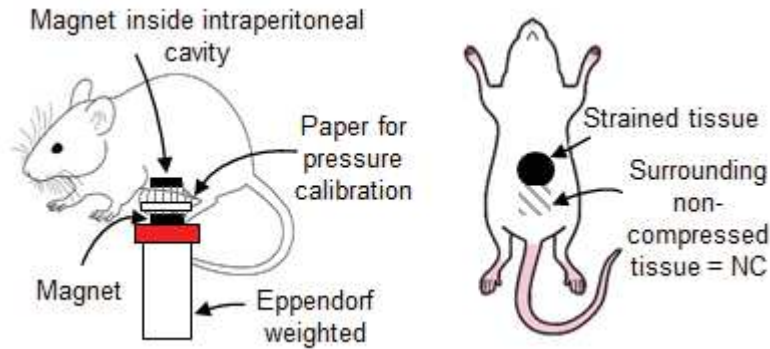


Fig. SD2 Setting of the magnets to create a reproducible straining regimen at a control value. (a) First magnet is surgically implanted inside the peritoneal cavity; the second magnet is located at the skin level. Using calibrated weight to reach a compression of 100 and 101 mmHg makes sure the compression intensity we used is reproducible. The 100-mmHg calibrated weight should be lifted and the 101 mmHg should not. If the compression is too high, use of Bristol paper will increase distance between the 2 magnets and lower the pressure intensity pinching the tissues. (b) Location of the 2 area of interest. We presupposed that non-compressed (NC) zone could be use as either a positive control or help to understand how the surrounding tissue react to the mechanical strain.

For the ischemia-reperfusion (IR) model, the external magnet on a subgroup of animals was removed after 2 hours. These mice were sacrificed 3 days after the compression and skeletal muscle abdominal tissues were resected. A part of the muscles was quick frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and stored at -80°C while the other part was fixed in PFA 4% then infiltrated and embedded in paraffin.

For mice treated with rycal S107 or physiological saline, the treatment was provided via osmotic pumps. During the surgery for magnet intraperitoneal implantation, osmotic pumps (Alzet Model 1007D, $0.5\mu\text{L/h}$, 7 days, Charles River) filled with physiological saline or S107 (50 mg/kg/day onto physiological saline) were implanted subcutaneously on the dorsal surface of each mouse after gentle shaving. Blood and abdominal muscles were harvested. The muscle tissues were quick frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and store at -80°C until analysis.

Immunoblotting

Skeletal abdominal tissue was isotonicly lysed with a douncer in 0.4 mL of lysis buffer containing 10mM Tris maleate pH 6.8, 35 mM NaF, 1% Triton, 1mM Na_3VO_4 and protease inhibitors. 50 μg of proteins or 100 μg for caspase 8 are separated using SDS-PAGE electrophoresis then transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After incubation with blocking buffer (LI-COR, Biosciences), membranes were blotted overnight with primary antibodies (Supplement table). The immunoblots were developed and quantified with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Biosciences).

Previous experiment, using intraperitoneal injection of Evans blue dye (1% volume relative to body mass), confirmed that the blood circulation was completely stopped between the magnets. When the compression was removed, the area is unstained and reperfusion of skin and underlying muscles takes more than 10 minutes.

Histological assessment

Eight μm paraffin transverse sections of abdominal muscles were cut using a microtome (RM2125 RTS, Leica). Tissue sections were stained with hematoxyline (HHS16, Sigma) and eosine (HT110116, Sigma) then mounted with xylene embedding medium (Entellan, Electron Microscopy Sciences). Eight μm transverse sections of muscles frozen in isopentane cooled down in liquid nitrogen were cut using a cryostat (HM560, Microm). Tissues sections were stained with Masson's Trichrome (HT15-1KT, Sigma) staining.

Total protein carbonylation

Carbonyl groups of whole lysates containing 20 μg of proteins are derivatized by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine as per manufacturer's instruction (Oxyblot Protein Oxidation Detection kit, Millipore Corporation). Proteins are separated using SDS-PAGE electrophoresis then transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After incubation with blocking buffer (LI-COR, Biosciences), membranes were incubated overnight with rabbit anti-Dinitrophenyl. The immunoblots were developed and quantified with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Biosciences).

Single-Channel Recordings

SR vesicles containing RyR1 were fused to planar lipid bilayers formed by painting a lipid mixture of azolectin (Sigma) at 45 mg/ml in decane; across a 200- μm hole in polysulfonate cups (Warner Instruments) separating 2 chambers. The *trans* chamber (1.0 ml), representing the intra-SR (luminal) compartment, was connected to the head stage input of a bilayer voltage clamp amplifier. The *cis* chamber (1.0 ml), representing the cytoplasmic compartment, was held at virtual ground. Symmetrical solutions used were follows 1 mM EGTA, 250/125 mM Hepes/Tris, 50 mM KCl, 0.64 mM CaCl_2 , pH 7.35 as *cis* solution and 53 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 50 mM KCl, 250 mM Hepes, pH 7.35 as *trans* solution. The concentration of free Ca^{2+} in the *cis* chamber was calculated with WinMaxC program (version 2.50; www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html). SR vesicles were added to the *cis* side and fusion with the lipid bilayer was induced by making the *cis* side hyperosmotic by the addition of 400-500 mM KCl. After the appearance of potassium and chloride channels, the *cis* side was perfused with the *cis* solution. Single-channel currents were recorded at 0 mV by using a Bilayer Clamp BC-535 (Warner Instruments), filtered at 1 kHz using a

Low-Pass Bessel Filter 8 Pole (Warner Instruments), and digitized at 4 kHz. All experiments were performed at room temperature (23°C). Data acquisition was performed by using Digidata 1550B and Axoscope 10.7 software (Life Tech.). The recordings were analyzed by using Clampfit 10.7 (Life Tech.) and Prism (ver. 7.0, GraphPad).

Immuno-precipitation

Skeletal abdominal tissue was isotonicly lysed with a douncer in 0.6 mL of lysis buffer containing (50 mM Tris maleate, pH 6.8, 35 mM NaF, 1.0 mM Na₃VO₄ and protease inhibitors) 150 µg of proteins were incubated with 500 µL of RIPA buffer (10 mM Tris·HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5.0 mM NaF, 1.0 mM Na₃VO₄, 1 % Triton X-100, and protease inhibitors) and 2 µg of anti-RyR antibody (5029) 1 hour at 4°C. We added 30 µL of protein A Sepharose beads (Sigma) to the immune complexes and let the samples incubate overnight at 4°C. Beads were collected by centrifugation and washed with RIPA buffer. Sample buffer (20% Glycerol, 140 mM SDS, 1.5% Tris 1,5M and 0.01% bromophenol blue) eludes the proteins. They were separated using SDS-PAGE electrophoresis then transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After incubation with blocking buffer (LI-COR Biosciences), membranes were blotted overnight with primary antibodies (Supplement table). The immunoblots were developed and quantified with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Blood analysis

Serum from mouse blood was retrieved after 10 min, 2000 g centrifugation then store at – 80 °C. Inflammatory cytokines IL-1 beta IL-6, MCP1, IP-10, IL-9 and TnF-alpha were measured by Multiplex (Milliplex® MAP, Millipore) as per manufacturer's instruction. The analytes were detected by Luminex Multiplex assay.

Mitochondria respiration

The respiratory rates were measured on tissue homogenate, lysed in the respiratory buffer (1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 mM Tris and 1.8 mM ATP at pH 7.2) and permeabilized by incubation with trypsin (0,25%). The respiratory rates of 100 µL of tissue homogenate were recorded at 37°C in 2 ml glass chambers using a high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros). Malate (5 mM) and pyruvate (5 mM) were added to provide NADH to complex I. Due to the activation of different malate shuttles, the complex II was not activated. Indeed, the citrate and the alpha-ketoglutarate were depleted by antiport transport with malate. So, the addition of malate and pyruvate defined the respiration driven by the complex I used to compensate the physiological proton leak. Activation of ATP synthesis was induced by the addition of 1.5 mM ADP. Thus, we obtained the respiration driven by the complex I coupled to the ATP synthesis. Cytochrome c (10µM) was added to check the integrity of outer mitochondrial membrane. The addition of succinate (10 mM) allowed a reconstitution of Tricarboxylic Acid cycle

function with the activation of the succinate dehydrogenase (SDH). Thus, maximal respiration of the mitochondrial chain induced by the competition of the respiration driven by the complex I and II was determined. All experiments were performed at 37°C.

Statistical analysis

Statistical analyses were realized with Prism (ver. 7.0, GraphPad). Data are presented as mean \pm standard error of mean. When appropriate, one-way ANOVA was used to compare mouse groups with correction for multiple comparison. Significance was fixed at p value < 0.05 .

RESULTS

1. Leaky Ryanodine Receptor channel caused by static compression is prevented with Rycal S107

We first hypothesized that tissue compression leads RyR1 channels impairment due to posttranslational modifications. We thus investigated the functional properties of RyR1 Ca^{2+} channels within skeletal muscles compressed for 2 hours at 100 mmHg using the planar lipid bilayer technique. The opening probability (P_o) and opening frequency (F_o) significantly increased (mean P_o of 0.06 ± 0.03 ($n=6$) for SHAM vs 0.31 ± 0.13 ($n=7$) for P100) in muscle under strain at 150 nmol/L (nM) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, a low cytosolic calcium concentration, without impacting the surrounding muscle (P100 NC) (Figure 1a-c). Interestingly, while P100 channels exhibited higher P_o under relaxation compared to SHAM, they also displayed further openings with low-amplitude subconductance states which were associated with increased numbers of open and closed events at 150nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Figure 1.a). When treated with S107, a Rycal compound known to stabilize the closed state of RyR1 stabilizing the binding between RyR1 and calstabin1²⁴, P100 channels exhibited SHAM-like properties with low P_o and F_o and regular amplitude histograms (Figure 1a-c).

Single-channel data were in accordance with biochemistry. RyR1 channels from muscle under compression (P100) are significantly S-nitrosylated (mean ratio 0.09 ± 0.05 for SHAM ($n=5$) vs 1.39 ± 0.38 for P100 ($n=4$)), oxidized (mean ratio 0.11 ± 0.09 for SHAM ($n=4$) vs 19.7 ± 8.12 for P100 ($n=4$)) and calstabin1 depleted (mean ratio 4.09 ± 0.43 for SHAM ($n=5$) vs 0.64 ± 0.14 for P100 ($n=5$)) (Figure 1d-f). Calstabin1/RyR1 ratio was significantly increased between P100 and P100 + S107 (mean ratio 2.78 ± 0.30 ($n=5$)). One-week treatment with S107 was sufficient to prevent the calstabin1 depletion in P100 + S107 mouse model. We report no drug effect in surrounding tissue (P100 NC + S107). Posttranslational modifications were not prevented by drug treatment.

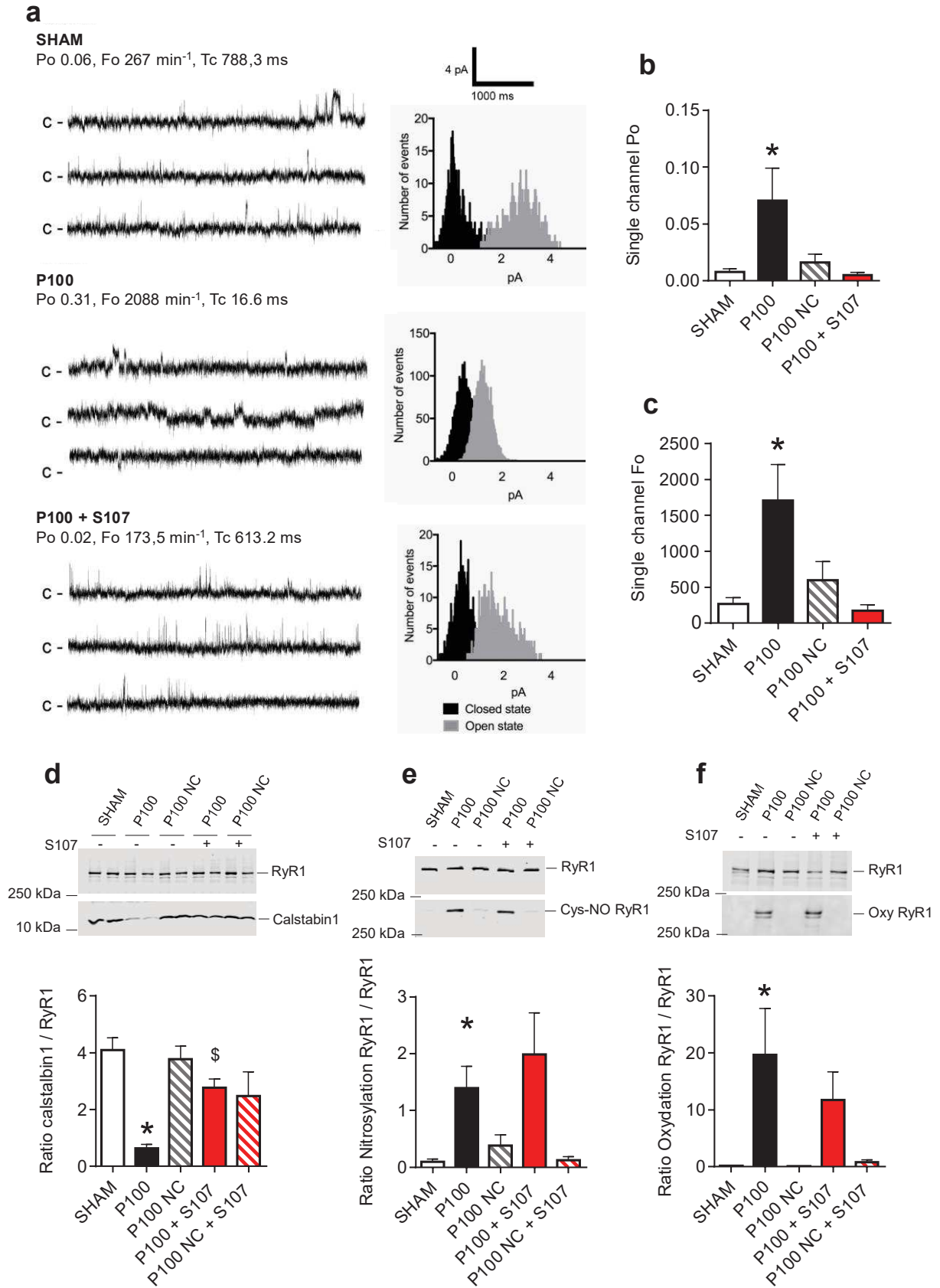


Fig.1 2 hours compression (100 mmHg) induces a RyR1-mediated SR Ca²⁺ leak (a) Representative single channel current traces of RyR1 SHAM, P100 and P100 + S107 at 150 nmol/L (nM) cytosolic [Ca²⁺]. Channel openings are shown as upwards deflections; the closed (c-) state of the channel is indicated by horizontal bars in the beginning of each tracing. Amplitude histogram of a representative SHAM RyR1 channel with 2 distinct peaks

corresponding to fully open (~4 pA) and closed (0 pA) states of the channel. (b) Quantification of opening probability (P_o) under 150 nM cytosolic $[Ca^{2+}]$ of SHAM, P100 compressed and non-compressed (NC), with and without drug S107, (c) quantification of opening frequency (F_o). (d) Representative immunoblot of immunoprecipitated Ryanodine Receptor type 1 (RyR1) and quantification from SHAM, P100 compressed and non-compressed (NC), with and without drug S107 of calstabin1 expression bound to RyR1, (e) of RyR1 nitrosylation, (f) of RyR1 oxidation. The muscles treated with S107 are indicated with +. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 4$ animals/group. * $p < 0.05$ vs SHAM

2. Initiator caspase cleavage caused by static compression

Apoptosis and autophagy pathways are tightly linked. Their activations contributed in PU models, focusing at different pressure intensity regimen^{18,19,25–29}. From an undergoing clinical trial, we extracted pressure intensities between the sacrum area skin surface and the therapeutic support of the patient: 50 mmHg is a mean value and 100 mmHg (see figure SD1) is a peak pressure intensity located over bony prominences. We raised the following question: how do the muscle protein expression involved in apoptosis (calpains, caspase and ATF6) and autophagy (Beclin1, LC3) change at 50 (P50) and 100 mmHg (P100) compression? To answer, we studied the compressed muscle directly between the magnets and the non-compressed surrounding muscle tissue (NC) on the same animal. No difference was detected in Calpain 1 expression (Figure 2.a) and Calpain 3 cleavage (ratio cleaved Calpain signal over total Calpain signal) (Figure 2.b). Caspase 3 cleavage was significantly increased between P100 NC and P100 NC + S107 (Figure 2.c). Caspase 8 cleavage was significantly upregulated in P100 compared to SHAM group (mean ratio 0.17 ± 0.01 for SHAM ($n=17$) vs 0.98 ± 0.22 for P100 ($n=13$)) (Figure 2.d). Rycal S107 treatment significantly decreased the caspase 8 cleavage in P100 and P100 NC muscle when compared with the untreated group. While ATF6 is known to be involved in SR stress^{25,26}, there was no difference of cleavage ratio between our groups (Figure 2.g). Given the evidence of an increase of caspase 8 cleavage, no cytochrome c release from the mitochondria (Supplementary Data SD3b) and caspase 3 activation, static compression of 100 mmHg only triggered early steps of apoptosis. One-week S107 treatment returned caspase 8 cleavage to SHAM level but enhanced caspase 3 cleavage level of P100 NC. Interestingly, we reported a significant increase of carbonylated protein concentration between P100 and P100 NC (Supplementary Data SD3c). When looking at autophagy proteins, Beclin1 expression did not shift between conditions (Figure 2e). S107 compound significantly reduced the conversion from LC3 I to LC3 II, that was slightly increased by tissue compression (Figure 2f). Thus, either autophagosome number rose or the drug blocked the autophagic degradation of LC3 II. There was no difference in mitochondria oxygen consumption between our groups hence mitochondria function was not impacted yet after 2 hours at 100 mmHg (Supplementary Data SD1a). No histological change was seen yet after 2 hours of compression (Supplementary Data SD4).

At 50 mmHg, Calpain 1 expression was downregulated in animals sustaining compression P50 and P50 NC compared to SHAM level (Supplementary Data SD5.a). No change was detected in Calpain 3 or caspase 3 cleavage between our groups (Supplementary Data SD5.b-c). Caspase 8 cleavage was still upregulated in P50 and P50 NC compared to SHAM group (Supplementary Data SD5.d). Moreover, Beclin 1 was downregulated while LC3 II to LC3 I conversion ratio rose in P50 and P50 NC compared to SHAM. When applying 50 mmHg, autophagy proteins were downregulated thus there was a decrease of autophagosome formation. Interestingly, similar proteins expression is reported in muscle directly strained and surrounding tissue. On the other hand, there is no increase of carbonylated protein expression at 50 mmHg.

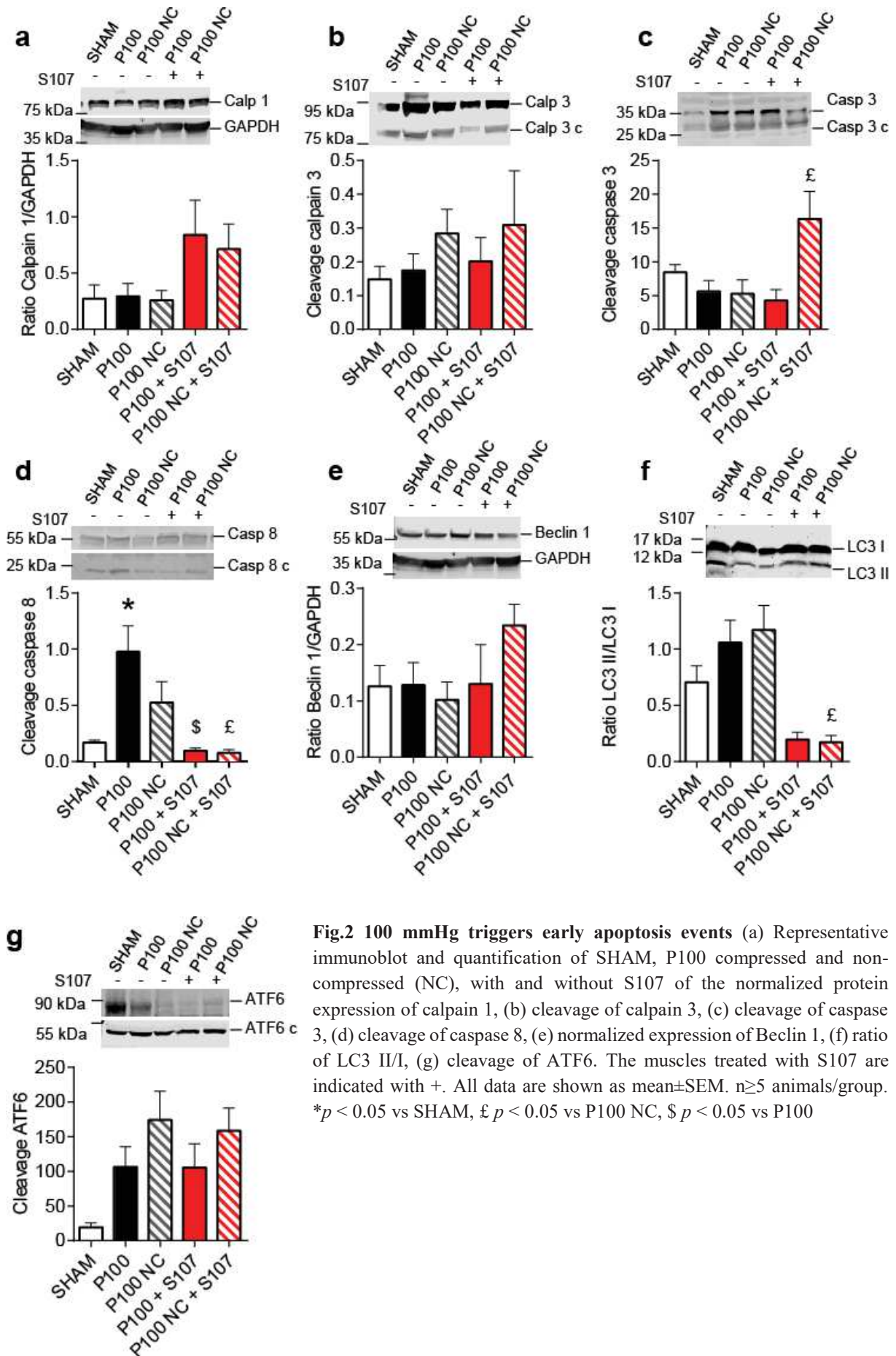


Fig.2 100 mmHg triggers early apoptosis events (a) Representative immunoblot and quantification of SHAM, P100 compressed and non-compressed (NC), with and without S107 of the normalized protein expression of calpain 1, (b) cleavage of calpain 3, (c) cleavage of caspase 3, (d) cleavage of caspase 8, (e) normalized expression of Beclin 1, (f) ratio of LC3 II/I, (g) cleavage of ATF6. The muscles treated with S107 are indicated with +. All data are shown as mean±SEM. n≥5 animals/group. **p* < 0.05 vs SHAM, £ *p* < 0.05 vs P100 NC, \$ *p* < 0.05 vs P100

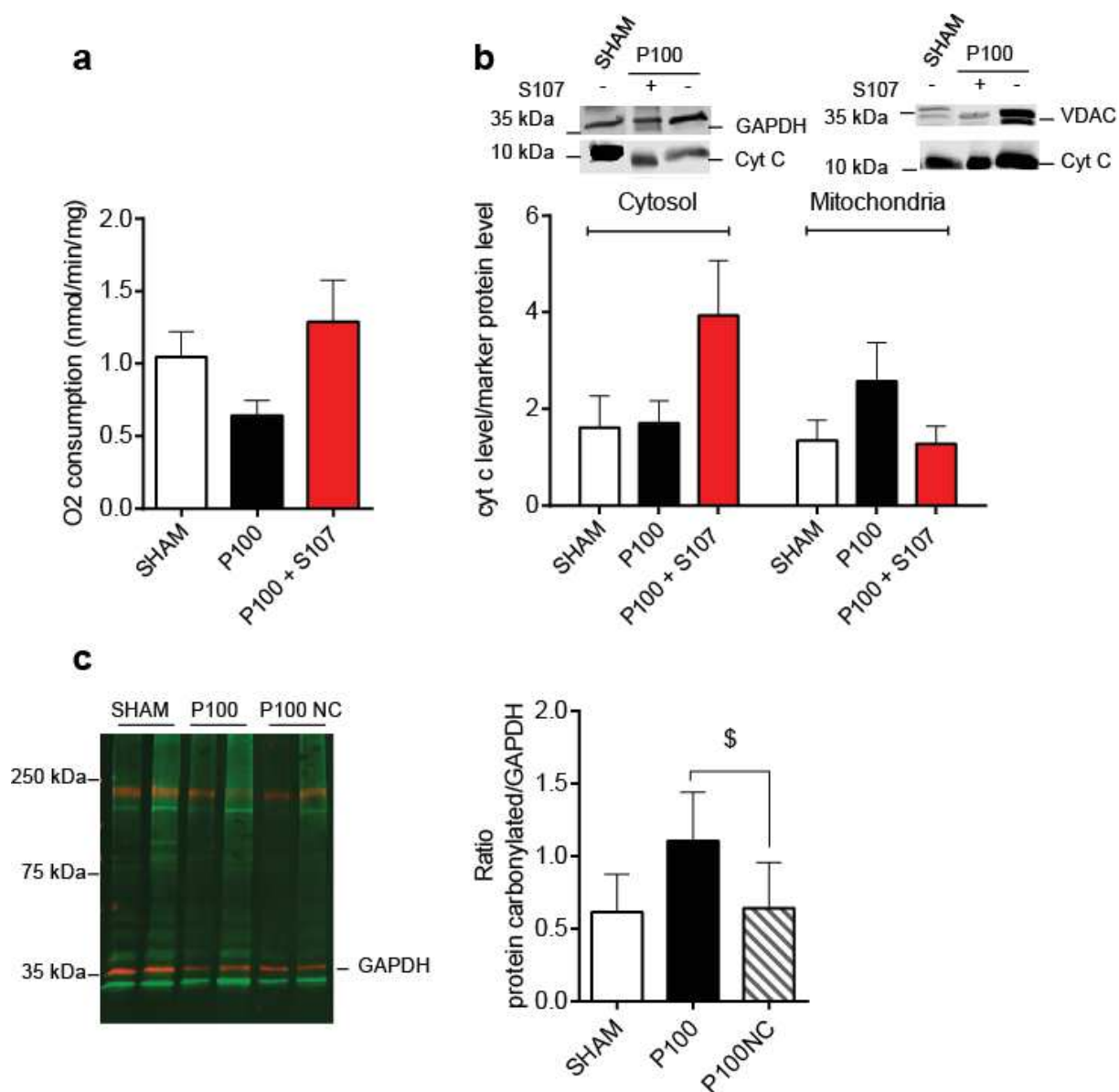


Fig. SD3 100 mmHg increases oxidative state without damaging the mitochondria (a) Bar graph summarizing the oxygen consumption of the mitochondria in SHAM, p100 and P100 + S107. (b) Representative immunoblot and quantification of SHAM, P100 and P100 + S107 of the normalized protein expression of cytochrome c in cytosol and mitochondria fraction. (c) Representative immunoblot and quantification of SHAM, P100 and P100 + NC of the normalized expression of carbonylated proteins. The muscles treated with S107 are indicated with +. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 4$ animals/group. \$ $p < 0.05$ vs P100

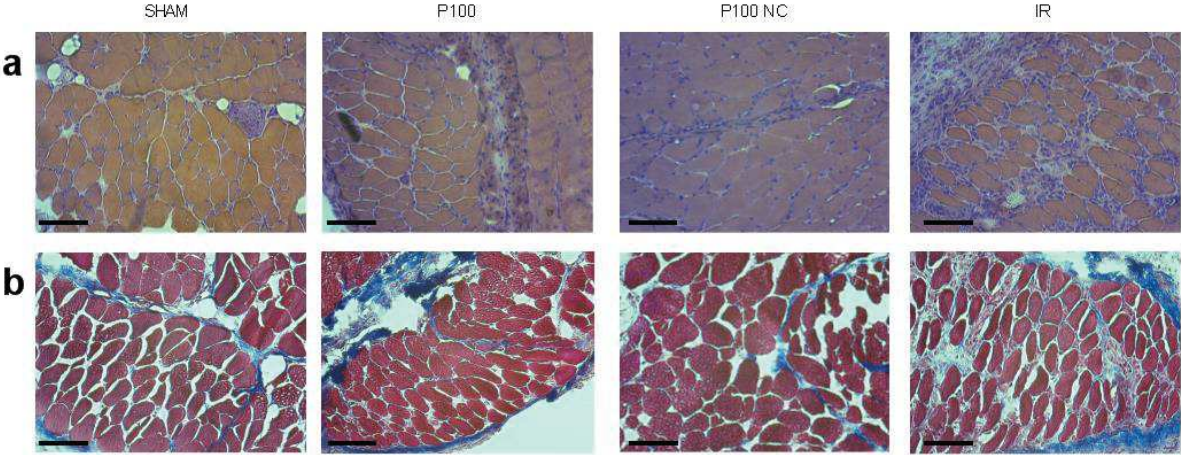


Fig.SD4 No ultrastructure modification at 100 mmHg (a) Representative H&E staining of SHAM, P100, P100 NC and IR muscle slides, (b) Masson's trichrome staining. Scale bar = 100 μ m

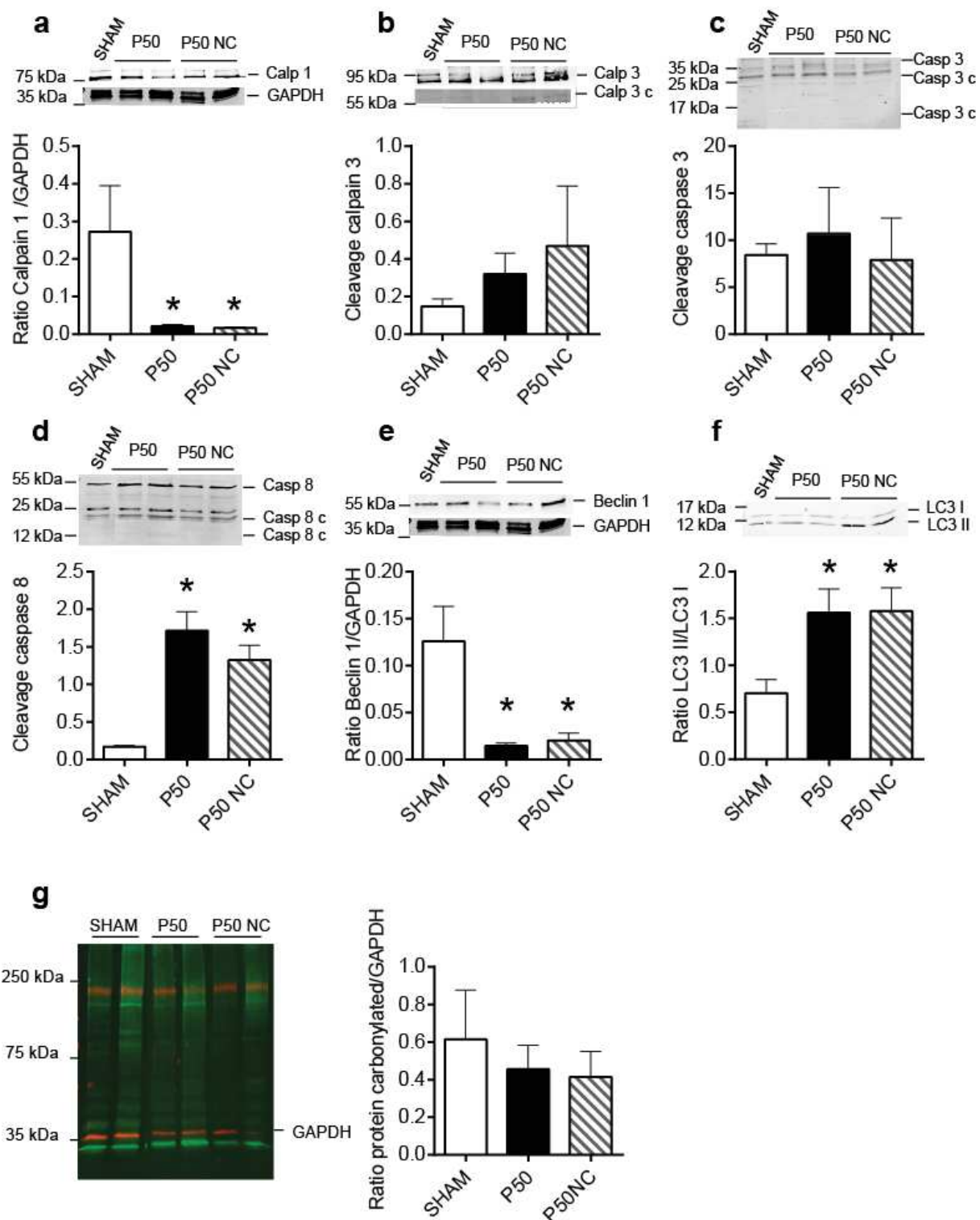


Fig. SD5 50 mmHg leads to modest autophagy downregulation (a) Representative immunoblot and quantification of SHAM, P50 compressed and non-compressed (NC) of the normalized protein expression of calpain 1, (b) cleavage of calpain 3, (c) cleavage of caspase 3, (d) cleavage of caspase 8, (e) normalized expression of Beclin 1, (f) ratio of LC3 II/I, (g) normalized expression of carbonylated proteins. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 4$ animals/group. * $p < 0.05$ vs SHAM

3. Two-hours compression does not affect the main pro-inflammatory cytokines

To assess the systemic state of the animals after compression at 100 mmHg or 50 mmHg, serum samples were screened for inflammatory interleukins. There was no change of pro-inflammatory IL-1 β , MCP-1, IL-9, TnF- α or anti-inflammatory IL-6 interleukins between our groups (Figure 3 and Supplementary Data SD6). Thus, two hours of compression was not enough to detect any modification of the most used cytokines in mouse serum. Another hypotheses is a 100 mmHg pressure intensity only have a local effect on muscle and modifications are too low for our detection method.

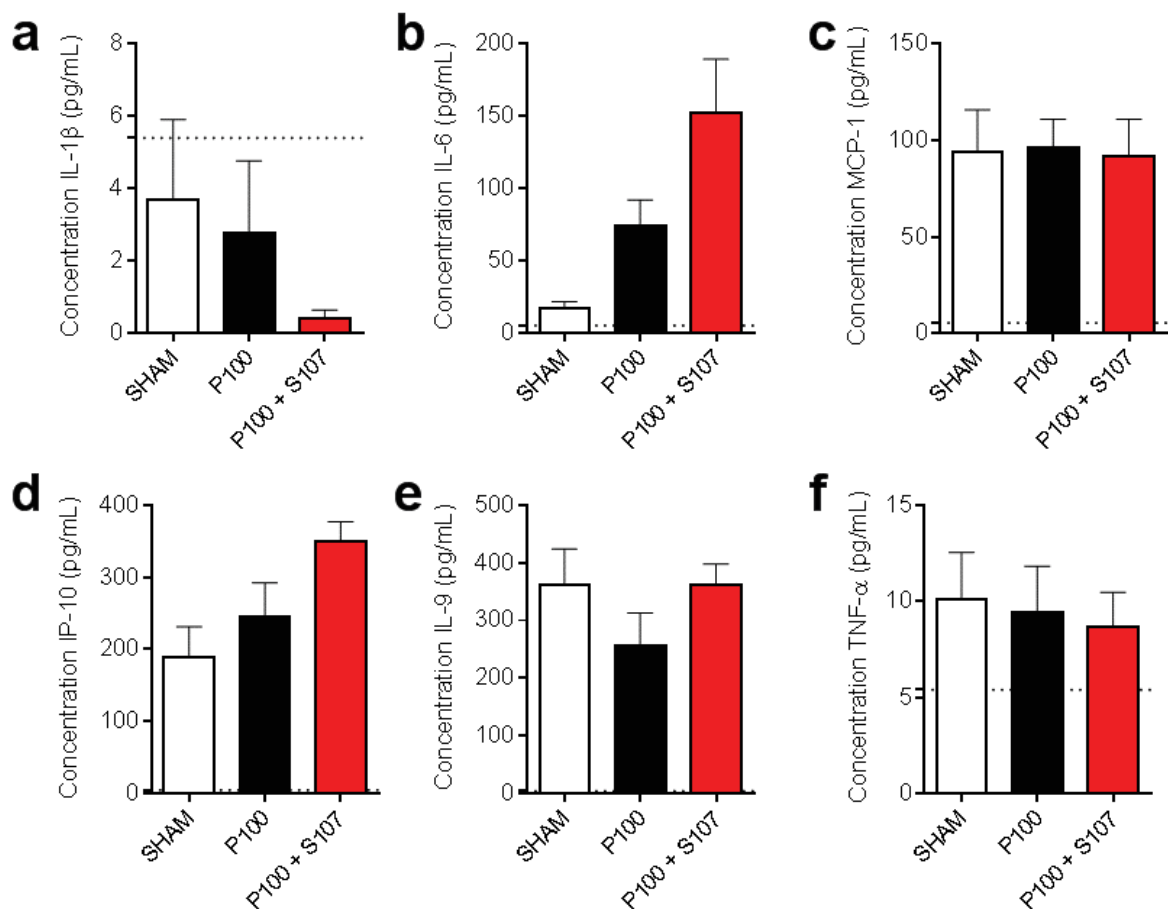


Fig.3 100 mmHg does not change cytokines expression at (a) Bar graph summarizing the results of Milliplex experiments in mouse serum from SHAM, P100 and P100 + S107 of IL-1 β concentration, (b) IL-6, (c) MCP-1, (d) IP-10, (e) IL-9, (f) TNF- α . Dot bar is the limited detection level of the interleukins. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 5$ animals/group. * $p < 0.05$ vs SHAM

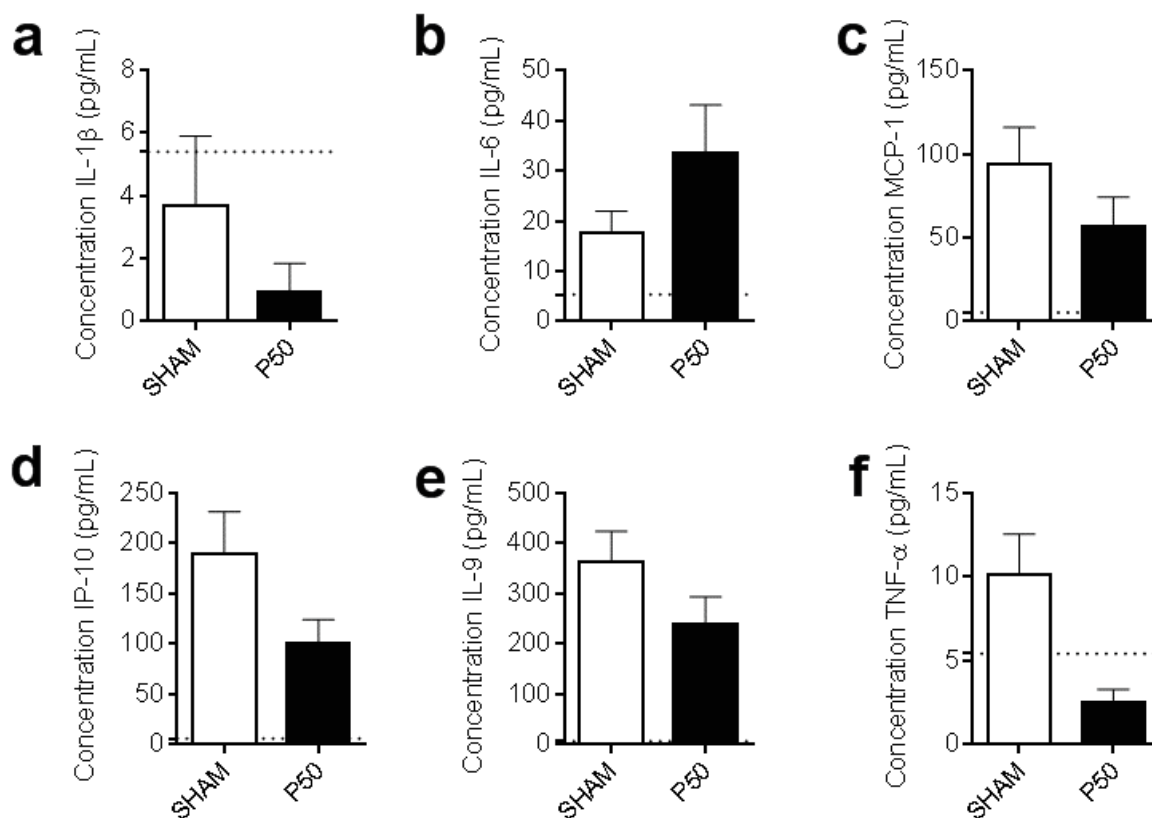


Fig. SD6 No change in cytokines expression at 50 mmHg (a) Bar graph summarizing the results of Milliplex experiments in mouse serum from SHAM and P50 of IL-1 β concentration, (b) IL-6, (c) MCP-1, (d) IP-10, (e) IL-9, (f) TNF- α . Dot bar is the limited detection level of the interleukins. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 5$ animals/group. * $p < 0.05$ vs SHAM

4. Calcium imbalance in IR model is prevented by S107 compound

A pressure intensity of 100 mmHg was applied during 2 hours on mouse muscle to recreate the mobilization protocol for PU prevention in clinical settings. After the compression, unloading the area under strained induced a potentially damaging reperfusion of the underlying tissue. The magnet creating the compression was removed and we evaluated RyR1 biochemistry and function of the muscles 3 days post-compression. Using single-channel measurements, RyR1 channels from Ischemia Reperfusion (IR) group displayed subconductance states with substantial number of events in the amplitude histogram (Figure 4a) similarly to observations after ischemia only. The P_o at 150 nM of Ca^{2+} was significantly higher in IR compared to SHAM (mean P_o 0.06 ± 0.03 for SHAM ($n=6$) vs 0.68 ± 0.19 for IR ($n=6$)) (Figure 4.b). There was a modest rise of F_o in IR vs SHAM ($p=0,056$, $n=6$) (Figure 4.c). Treatment with S107 was able to preserve the P_o and F_o to SHAM-like values (figure 4bc) and reduce the number of subconductance states associated with IR (Figure 4.a). Additionally, biochemical analysis detected a calstabin1 depletion from RyR1 (mean ratio 4.09 ± 0.43 for SHAM ($n=5$) vs 0.79 ± 0.22 for IR ($n=6$)). This

depletion could be due to posttranslational modifications: RyR1 S-nitrosylation (mean ratio 0.10 ± 0.05 for SHAM (n=5) vs 5.04 ± 1.33 for IR (n=5)) and oxidation (mean ratio 0.11 ± 0.09 for SHAM (n=4) vs 10.32 ± 0.42 for IR (n=4)) rose in IR compared to SHAM group. Rycal S107 treatment prevented calstabin1 depletion (mean ratio 3.29 ± 0.92 (n=4)) without modifying the posttranslational modification and recover the Po to SHAM level.

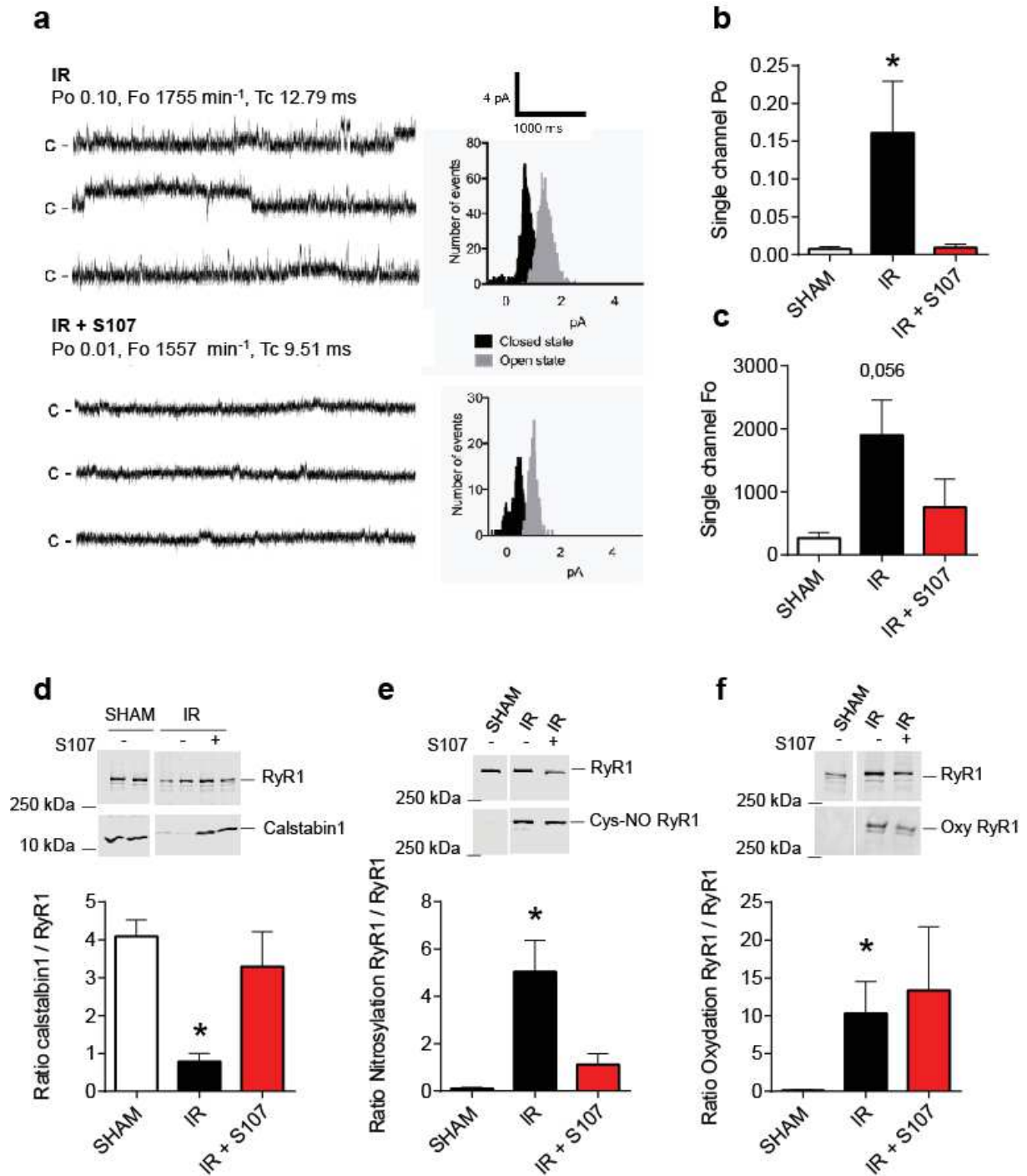


Fig.4 2 hours compression (100 mmHg) followed by reperfusion induces a persistent RyR1-mediated SR Ca²⁺ leak (a) Representative single channel current traces of RyR1 Ischemia Reperfusion (IR) and IR+S107 at 150 nmol/L (nM) cytosolic [Ca²⁺]. Channel openings are shown as upwards deflections; the closed (c-) state of the channel is indicated by horizontal bars in the beginning of each tracing. Amplitude histogram of a representative SHAM RyR1 channel with 2 distinct peaks corresponding to fully open (~4 pA) and closed (0 pA) states of the channel. (b) Quantification of opening probability (Po) under 150 nM cytosolic [Ca²⁺] of SHAM, IR and IR+S107, (c) quantification of opening frequency (Fo). (d) Representative immunoblot of immunoprecipitated RyR1 and quantification from SHAM, IR, IR + S107 of calstabin1 expression bound to RyR1, (e) of RyR1 nitrosylation, (f) of RyR1 oxidation. The muscles treated with S107 are indicated with +. All data are shown as mean ± SEM. n≥5 animals/group. * *p* < 0.05 vs SHAM

DISCUSSION

Several models regarding the etiology of PUs has been advanced by different authors to understand the inner mechanism of wound etiology. We designed our own mouse model to fit what is seen in clinical practice and lacking in the literature. In clinical trials, 100 mmHg and 50 mmHg are respectively peak and mean pressure intensities over areas at risk of PUs^{22,27}. Moreover, current guidelines, based on experts opinions, recommend to move the patient's point of support at the frequency of 2 to 3 hours^{2,28}. Therefore, the novel focus of this work was to understand the effect of a single 2 hours compression at 50 and 100 mmHg.

Earlier findings showed that changes in Ca^{2+} homeostasis detected in several pathophysiological conditions are precursor of muscle damages^{29,30}. Thereby, we evaluated the RyR1 biochemical regulation and function. There was a rise of Po at 150 nM cytosolic Ca^{2+} in compressed muscle between the magnets at 100 mmHg. So, in a condition mimicking resting calcium conditions, there was a SR Ca^{2+} leak into the cytosol compared to SHAM group. Frequency opening increased 6-fold between P100 and SHAM groups. Muscles non-compressed (P100 NC) from the same animal behave similarly to SHAM suggesting that the pressure intensity applied for 2 hours only affected the muscle locally. Subconductance states were observed for P100 channels which were reported in leaky RyR channels in several pathophysiological contexts. Treatment with S107 drug for one week decreased the Po and Fo to SHAM levels. Single channel recording results were in accordance with biochemical analysis indicating abnormal remodeling or RyR1 macromolecular complex. RyR1 immunoprecipitation showed a rise of S-nitrosylated RyR1 and oxidized RyR1 compared to SHAM in P100 associated with depletion of calstabin1 in P100. Other studies conducted by our group and others substantiate that RyR1 unbound to calstabin1 leads to a Po rise and a SR Ca^{2+} leak³¹⁻³³. As expected, mouse treatment with S107 prevented calstabin1 depletion and improved the Po without modifying the nitro or oxidized state of the RyR1. Thus, this paper demonstrates that a static compression of 100 mmHg applied for 2 hours results in a Ca^{2+} leak that is prevented by a treatment with S107.

Excess of intracellular Ca^{2+} increases oxygen species (ROS) production because of overstimulation of enzymatic synthesis by xanthine oxidase³⁴. Indeed, carbonylated proteins expression in muscle compressed at 100 mmHg were higher. This oxidative stress impacts the SR function and increased the RyR1 oxidation. ROS also play a role in caspases and calpains deregulation. We exposed an upregulation of early events in extrinsic apoptosis pathway such as initiator caspase 8 cleavage at 50 and 100 mmHg. Similar results have been disclosed with longer 100 mmHg compression model^{15-18,23,35}. Initiators caspases were activated, but apoptosome linked to caspase 9 activation was not formed yet¹⁸, possibly because of anti-inflammatory proteins such as Akt activation which

could suppress CHOP upregulation post SR stress⁴⁰. In our model, only caspase 8 is cleaved suggesting a type II cell death: the mitochondria membrane permeability is not impacted as the O₂ consumption remains stable and no release of cytochrome c or caspase 3 activation was recorded^{34,37-39}. At 50 mmHg, calpain 1 expression is significantly decreased compared to SHAM thus, this downregulation may be the result of a Ca²⁺ concentration rise⁴⁴.

Regarding the autophagy associated proteins, we did not find shift of Beclin 1 or LC3 conversion ratio at 100 mmHg, consistently with model of 4 hours compression¹⁸. Interestingly at 50 mmHg, Beclin 1 expression was downregulated and LC3 ratio increased. The conversion of LC3 I (cytosolic form) to LC3 II (membrane bound) is an indicator of autophagy^{45,46}. Decrease of Beclin1 expression is associated with a boost of apoptosis but upregulation of the LC3 ratio is a sign of autophagy activity. Therefore, at 50 mmHg the cell compensates between caspase 8 activity, leading to an increase signal of extrinsic apoptosis that the mitochondria is buffering¹⁸. Finally, we showed that treatment with S107 decreased the LC3 conversion ratio for P100 NC similarly than P100 supporting the role of RyR1 mediated calcium leak in the autophagy process. Conversion from LC3 I to LC3 II decline could reflect an autophagy blockage or a downturn of autophagosome formation⁴⁵.

Muscle damage is known as a function of pressure intensity and strain duration; however, on a biochemical side, the pathways involved in compression at 50 mmHg and 100 mmHg seem different, highlighting the complex reactions that explain why some patients will more likely develop PU than others. Calcium imbalance, ROS production, autophagy and extrinsic apoptosis are closely involved at early stages of pressure damage in skeletal muscle sustaining static pressure.

More recently, research is ongoing on several PU predictive biomarkers^{47,48}. Our screening of interleukins in the serum after 2 hours of compression is also of interest in this research field as we described a muscle damage without skin breakdown as an analog of Deep Tissue Injury, a PU stage associated with discoloration of the skin and damage to the underlying tissues (fat tissue and muscle and bones similar to stage 3 or 4). We did not detect any significant change between SHAM group and P100. Results are not consistent in the literature due to models diversity^{25,26,49-52}. The concentration of interleukins of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α tends to fall with time after 12 hours, 1 day and 3 days post compression. While they found a significant increase of IL-1 β mRNA, the interleukin concentration in subcutaneous tissue is lower than the SHAM group, similarly to our results. Surprisingly, TNF- α concentrations in the present study were below threshold level while linked interleukins IL-6 and MCP-1 are detected. To further understand the kinetic of chemokines on early steps of muscle damage, more

anti-inflammatory as pro-inflammatory interleukins should be studied in the future at different time points. A relevant biomarker needed to be detected from standard medical routine such as blood or urine sampling, meanwhile, the biomarker expression should be upregulated early enough to be of use and protect the patient tissues⁴⁷. With this objective in mind, our mouse model is a good tool for biomarker screening. Nonetheless, differences between rodents and human physiology should always be taken into account when translating the results to clinical trial¹³.

To further understand the early mechanism of muscle damage in PU development, we studied another mouse model of Ischemia Reperfusion (IR), 3 days after 2 hours of compression at 100 mmHg. We hypothesized that the reperfusion could, by analogy with IR in the heart, contribute to additional damages of the muscle. Previous investigations on IR PU rodents model noted a 1.6-fold increase of caspase 8 activation and 2.2-fold upregulation of caspase 3 after 6 hours of compression and one day of reperfusion¹⁶⁻¹⁸. They detected a significant increase of DNA fragmentation; thus their model is further down in apoptosis pathway and show a nuclei rise in interstitial area (2.2-fold compared to control). But, like in our model, ultrastructure modifications did not settle after one cycle of compression. In fact to visualize ultrastructure damage with H&E staining, the pressure intensity was either up to 243 mmHg during 4 hours^{10,53} or multiple IR cycles were applied.

By analogy to a previous study showing that in the heart caspase 8 activation and subsequent RyR2 dysfunction contribute to the lesion of reperfusion³², we postulate in the present study that RyR1 may act as a proximal actor in PU development after tissue compression. We were able to detect a Po rise of the RyR1 channel, prevented with S107 treatment. Similar to the posttranslational modification of P100 (without reperfusion), RyR1 was significantly depleted from calstabin1, S-nitrosylated and oxidized in our IR model. The hypernitrosylation of the Ca²⁺ channel contributed to calstabin1 dissociation from RyR macromolecular complex³¹, destabilizing the channel and creating a SR Ca²⁺ leak. Increase of NO production was also reported in another PU models¹⁵ but requiring multiple IR cycles^{26,54}. The early activation of apoptosis and Ca²⁺ dysregulation appear related to ischemia rather than to reperfusion. Indeed, the major RyR1 alterations are directly detected after the 2h of compression. Previous results showed evidence of a threshold between 70 and 100 mmHg, which will shift the cell NO balance. It is also worth noting that application of compression requires anesthesia of the animal for duration longer than 2 hours. However, anesthesia is a well-known bias regarding reperfusion³⁴ and can explain discordance between the mechanical threshold resulting in necrosis or apoptosis of muscle cells¹⁰.

In the present study, animals never developed a full thickness PU, even after a follow up of 5 days after 2 hours of 100 mmHg compression. Other studies in literature also demonstrate that a single compression on a healthy animal is not enough to create the wound at low pressure intensity^{10,42,54}. However, as in clinical settings, no sign of tissue breakdown does not mean that the muscle tissue underneath is not impacted as we show in this study. The Ca²⁺ dysregulation in the muscle directly strained after 2 hours of compression continued up to 3 days on our IR model. Subcutaneous and skin tissue is able to withstand longer and higher pressure than muscle in anaerobic condition⁹.

Data provided by preceding studies of different pathologies support that Rycal S107 treatment avoids calstabin depletion from RyR and subsequent Ca²⁺ leak³⁶⁻³⁸. In the present study, acute treatment (1 week,) prevented the RyR1/calstabin1 binding loss. Therefore, Rycal S107 is an acute treatment worth investigating in patient at high risk of PU as prevention (for instance before any surgery where the risk of PU development increases because of the patient sedation). As Rycal S107, caspase inhibitors and estrogens affect intracellular Ca²⁺ homeostasis⁵⁵ and have already been documented as PU prevention therapy^{17,56,57}, another clue of where we need to look in the future for PU prevention and treatment.

CONCLUSION

In the present study, we showed that early PU damage appears in muscle below the skin compression. It involves caspase 8 activation after 2 hours of static compression at 50 or 100 mmHg. ROS production is upregulated in muscle directly compressed after 2 hours at 100 mmHg. Moreover, this local inflammatory state leads to the depletion of Calstabin1, the stabilizing protein of RyR1 the major intracellular Ca²⁺ channel. Thus, the compression induces a SR Ca²⁺ leak early in the muscle before ultrastructure damage and systemic cytokines changes. IR model highlighted the persisting Ca²⁺ leak after 3 days of reperfusion. Rycal drug treatment prevents calstabin1 depletion and SR Ca²⁺ leak in ischemia and IR model and would be an interesting tool for PU prevention.

Conflict of interest

A. R. M. is a board member and owns shares in ARMGO Pharma Inc., which is targeting RyR channels for therapeutic purposes. E. D. A. is the Executive Director, Global Innovation Organization, Hill-Rom.

Acknowledgement

Thanks to Annick Bourret, Valerie Scheuermann, Pierre Sicard and Patrice Bideaux for their technical support with Milliplex experiments, biochemistry and mouse model implementation respectively. Thanks to Kristoffer Mack for his help processing the samples.

Supplemental table: antibody details

Antibody (clone)	Dilution	Host	Manufacturer	Reference
ATF6 (F7)	1:1 000	Mouse	Santa Cruz	Sc-16659
Beclin 1	1:1 000	Rabbit	Cell Signaling	3738
Calpain 1	1:1 000	Mouse	Abcam	Ab49652
Calpain 3	1:100	Mouse	Leica	CALP-2C4
Calstabin 1	1:1 000	Goat	Santa Cruz	Sc-6173
Calstabin 1	1:2 500	Rabbit	Santa Cruz	Sc-28814
Caspase 3	1:1 000	Rabbit	Santa Cruz	Sc-7148
Caspase 8	1:500	Rabbit	Santa Cruz	Sc-7890
Cytochrome C	1:1 000	Mouse	Abcam	Ab110325
Dinitrophenylhydrazine	1:300	Rabbit	Millipore	S7150 Oxyblot kit
GAPDH	1:60 000	Mouse	Abcam	Ab8245
LC3	1:1 000	Rabbit	Cell Signaling	4108
RyR 1 (5029)	1:5 000	Rabbit	Custom made	None
RyR 1 (C34)	1:1 000	Mouse	Abcam	Ab2868
S-Nitroso-Cysteine	1:1000	Rabbit	Sigma	N5411
VDAC	1:1 000	Mouse	Abcam	Ab14734

1. Kayser SA, VanGilder CA, Ayello EA, Lachenbruch C. Prevalence and Analysis of Medical Device-Related Pressure Injuries: Results from the International Pressure Ulcer Prevalence Survey. *Adv Skin Wound Care* 2018;**31**:276–285.
2. National Pressure Ulcer Advisory Panel, European Pressure Ulcer Advisory Panel, Pan Pacific Pressure Injury Alliance. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide*. Cambridge Media: Osborne Park. Emily Haesler: Western Australia; 2014<http://www.npuap.org/wp-content/uploads/2014/08/Quick-Reference-Guide-DIGITAL-NPUAP-EPUAP-PPPIA-Jan2016.pdf>. Accessed 22 March 2018.
3. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R *et al*. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2017;**135**:e146–e603.
4. Berlowitz D, Carol Lukas VanDeusen, Victoria Parker, Niederhauser A, Silver J, Logan C *et al*. Preventing pressure ulcers in hospitals: A toolkit for improving quality of care. <https://www.ahrq.gov/sites/default/files/publications/files/putoolkit.pdf>. Accessed 22 July 2018.
5. Gorecki Claudia, Brown Julia M., Nelson E. Andrea, Briggs Michelle, Schoonhoven Lisette, Dealey Carol *et al*. Impact of Pressure Ulcers on Quality of Life in Older Patients: A Systematic Review. *J Am Geriatr Soc* 2009;**57**:1175–1183.
6. Bates-Jensen BM, Guihan M, Garber SL, Chin AS, Burns SP. Characteristics of Recurrent Pressure Ulcers in Veterans With Spinal Cord Injury. *J Spinal Cord Med* 2009;**32**:34–42.
7. Wurzer P, Winter R, Stemmer SO, Ivancic J, Lebo PB, Hundeshagen G *et al*. Risk factors for recurrence of pressure ulcers after defect reconstruction. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2018;**26**:64–68.
8. 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**:016007.
9. Daniel RK, Priest DL, Wheatley DC. Etiologic factors in pressure sores: an experimental model. *Arch Phys Med Rehabil* 1981;**62**:492–498.
10. Linder-Ganz E, Engelberg S, Scheinowitz M, Gefen A. Pressure-time cell death threshold for albino rat skeletal muscles as related to pressure sore biomechanics. *J Biomech* 2006;**39**:2725–2732.
11. Loerakker, S. *The relative contributions of muscle deformation and ischaemia to pressure ulcer development*. 2011 doi:10.6100/ir716284.
12. Lenche N, Katerina D, Nikolchev A, Lidija P, Biljana P-Z, Milenko K. The influence of comorbidity on the prevalence of pressure ulcers in geriatric patients. *Glob Dermatol* 2016;**3**:319–322.
13. Salcido R, Popescu A, Ahn C. Animal models in pressure ulcer research. *J Spinal Cord Med* 2007;**30**:107–116.
14. Stekelenburg A, Oomens C, Bader D. Compression-Induced Tissue Damage: Animal Models. In: *Pressure Ulcer Research*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2005. pp. 187–204.
15. Sin TK, Pei XM, Teng BT, Tam EW, Yung BY, Siu PM. Oxidative stress and DNA damage signalling in skeletal muscle in pressure-induced deep tissue injury. *Pflugers Arch* 2013;**465**:295–317.
16. Siu PM, Teng BT, Pei XM, Tam EW. Proteasome inhibition alleviates prolonged moderate compression-induced muscle pathology. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;**12**:58.
17. Teng BT, Tam EW, Benzie IF, Siu PM. Protective effect of caspase inhibition on compression-induced muscle damage. *J Physiol* 2011;**589**:3349–3369.
18. Teng BT, Pei XM, Tam EW, Benzie IF, Siu PM. Opposing responses of apoptosis and autophagy to moderate compression in skeletal muscle. *Acta Physiol Oxf Engl* 2011;**201**:239–254.
19. Wu Y, van der Schaft DWJ, Baaijens FP, Oomens CWJ. Cell death induced by mechanical compression on engineered muscle results from a gradual physiological mechanism. *J Biomech* 2016;**49**:1071–1077.
20. Wehrens XHT, Marks AR. *Ryanodine Receptors: Structure, function and dysfunction in clinical disease*. Springer Science & Business Media; 2006.
21. Kolaj M, Zhang L, Renaud LP. L-type calcium channels and MAP kinase contribute to thyrotropin-releasing hormone-induced depolarization in thalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016;**310**:R1120–1127.
22. Swain I. The Measurement of Interface Pressure. In: Bader DL, Bouten CVC, Colin D, Oomens CWJ, editors. *Pressure Ulcer Research*. Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg; 2005. pp. 51–71.
23. Hashimoto M, Kurose T, Kawamata S. Comparison between a weight compression and a magnet compression for experimental pressure ulcers in the rat. Histological studies and effects of anesthesia. *Arch Histol Cytol* 2008;**71**:303–316.
24. Bellinger AM, Reiken S, Dura M, Murphy PW, Deng S-X, Landry DW *et al*. Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: A molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:2198–2202.

25. Kurose T, Hashimoto M, Ozawa J, Kawamata S. Analysis of Gene Expression in Experimental Pressure Ulcers in the Rat with Special Reference to Inflammatory Cytokines. *PLoS One* 2015;**10**:e0132622.
26. 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**:1838–1851.
27. Gefen A, Weihs D. Cytoskeleton and plasma-membrane damage resulting from exposure to sustained deformations: A review of the mechanobiology of chronic wounds. *Med Eng Phys* 2016;**38**:828–833.
28. Jagannathan NS, Tucker-Kellogg L. Membrane permeability during pressure ulcer formation: A computational model of dynamic competition between cytoskeletal damage and repair. *J Biomech* 2016;**49**:1311–1320.
29. Jiang L, Dai Y, Cui F, Pan Y, Zhang H, Xiao J *et al.* Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing. *Spinal Cord* 2014;**52**:145–151.
30. Allen D, Seo J. ER Stress Activates the TOR Pathway through Atf6. *J Mol Signal* 2018;**13**:1.
31. Hillary RF, Fitzgerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J Biomed Sci* 2018;**25**:48.
32. Peterson MJ, Gravenstein N, Schwab WK, van Oostrom JH, Caruso LJ. Patient repositioning and pressure ulcer risk--monitoring interface pressures of at-risk patients. *J Rehabil Res Dev* 2013;**50**:477–488.
33. Hagiwara S, Ferguson-Pell M. Evidence supporting the use of two-hourly turning for pressure ulcer prevention. *J Tissue Viability* 2008;**17**:76–81.
34. Nowycky MC. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* 2002;**115**:3715–3716.
35. Santulli G, Nakashima R, Yuan Q, Marks AR. Intracellular calcium release channels: an update. *J Physiol* 2017;**595**:3041–3051.
36. Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L *et al.* Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 2009;**15**:325–330.
37. Fauconnier J, Meli AC, Thireau J, Roberge S, Shan J, Sassi Y *et al.* Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:13258–13263.
38. Matecki S, Dridi H, Jung B, Saint N, Reiken SR, Scheuermann V *et al.* Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**:9069–9074.
39. Gissel H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann N Y Acad Sci* 2005;**1066**:166–180.
40. Cui F-F, Pan Y-Y, Xie H-H, Wang X-H, Shi H-X, Xiao J *et al.* Pressure Combined with Ischemia/Reperfusion Injury Induces Deep Tissue Injury via Endoplasmic Reticulum Stress in a Rat Pressure Ulcer Model. *Int J Mol Sci* 2016;**17**:284.
41. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;**19**:107–120.
42. Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000;**92**:1–6.
43. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”? *IUBMB Life* 2005;**57**:85–90.
44. Murphy RM, Snow RJ, Lamb GD. μ -Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;**290**:C116–122.
45. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* 2007;**3**:542–545.
46. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S *et al.* Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;**8**:3882–3891.
47. Bader D, Oomens C. The Potential of Biomarkers in the Early Detection of Pressure Ulcers. In: Romanelli M, Clark M, Gefen A, Ciprandi G, editors. *Science and Practice of Pressure Ulcer Management*. Springer London: London; 2018. pp. 1–15.
48. Loerakker S, Huisman ES, Seelen HAM, Glatz JFC, Baaijens FPT, Oomens CWJ *et al.* Plasma variations of biomarkers for muscle damage in male nondisabled and spinal cord injured subjects. *J Rehabil Res Dev* 2012;**49**:361–372.
49. Hagiwara S, Ferguson-Pell MW, Palmieri VR, Cochran GV. Pressure sores: a biochemical test for early detection of tissue damage. *Arch Phys Med Rehabil* 1988;**69**:668–671.
50. Hemmes B, de Wert LA, Brink PRG, Oomens CWJ, Bader DL, Poeze M. Cytokine IL1 α and lactate as markers for tissue damage in spineboard immobilisation. A prospective, randomised open-label crossover trial. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017;**75**:82–88.
51. Makhsous M, Lin F, Pandya A, Pandya MS, Chadwick CC. Elevation in the serum and urine concentration of injury-related molecules after the formation of deep tissue injury in a rat spinal cord injury pressure ulcer model. *PM R* 2010;**2**:1063–1065.

52. Stojadinovic O, Minkiewicz J, Sawaya A, Bourne JW, Torzilli P, de Rivero Vaccari JP *et al.* Deep tissue injury in development of pressure ulcers: a decrease of inflammasome activation and changes in human skin morphology in response to aging and mechanical load. *PloS One* 2013;**8**:e69223.
53. 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**:77–83.
54. Jiang L, 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**:55–60.
55. Suman M, Giacomello M, Corain L, Ballarin C, Montelli S, Cozzi B *et al.* Estradiol effects on intracellular Ca(2+) homeostasis in bovine brain-derived endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2012;**350**:109–118.
56. Bonne C. Potential efficiency of antioxidants to prevent pressure ulcers. A neglected hypothesis. *Med Hypotheses* 2016;**91**:28–31.
57. Margolis DJ, Knauss J, Bilker W. Hormone replacement therapy and prevention of pressure ulcers and venous leg ulcers. *Lancet Lond Engl* 2002;**359**:675–677.

Etude 2 : L'alitement prolongé chez les paraplégiques induit la dissociation de la calstabin1 du RyR

Introduction

Forts du lien établi entre pression et remodelage du récepteur de la Ryanodine sur notre modèle animal (étude 1), nous nous sommes intéressés à une cohorte de paraplégiques porteurs d'escarres. Les altérations musculaires et vasculaires associées à une paraplégie chronique (supérieure à un an) sont potentiellement responsable d'un niveau de stress oxydant cellulaire et d'une dégradation des fibres musculaires. Ces fragilités pourraient alors avoir un impact sur le niveau de pression (en termes de pression et de durée) que le muscle paralytique est capable de supporter avant les premières lésions. Le but de cette étude est de corrélérer une contrainte mécanique aux modifications posttraductionnelles du RyR1 chez le muscle paralysé de paraplégiques alités dans un contexte clinique.

Conclusion

Les résultats préliminaires de cette étude prouvent l'existence d'une hypoxie dans les régions sous la lésion médullaire. Le tissu proche de l'escarre et le muscle paralysé présentent une augmentation de la nitrosylation et de la phosphorylation du RyR1, associé à un décrochage de la calstabin1 au RyR1. Des biomarqueurs sériques potentiels tels que la troponine T ont été identifiés dans des tests de routine chez des patients déjà porteurs d'escarre mais d'autres recherches sont nécessaires afin de sélectionner une combinaison de marqueurs capables de prédire l'apparition de l'escarre. Finalement, au niveau des muscles non-innervés, la pression appliquée sur la peau du patient est corrélée au ratio de dissociation calstabin1/RyR1. Ce résultat très prometteur pourrait servir pour identifier précisément le seuil de pression avant lequel les premières lésions musculaires apparaissent chez un patient alité entre 2 mobilisations du patient (fréquence de mobilisation toutes les 2-3 heures recommandées par les sociétés savantes comme la NPUAP) même si l'impact exact de la paraplégie doit être réévalué.

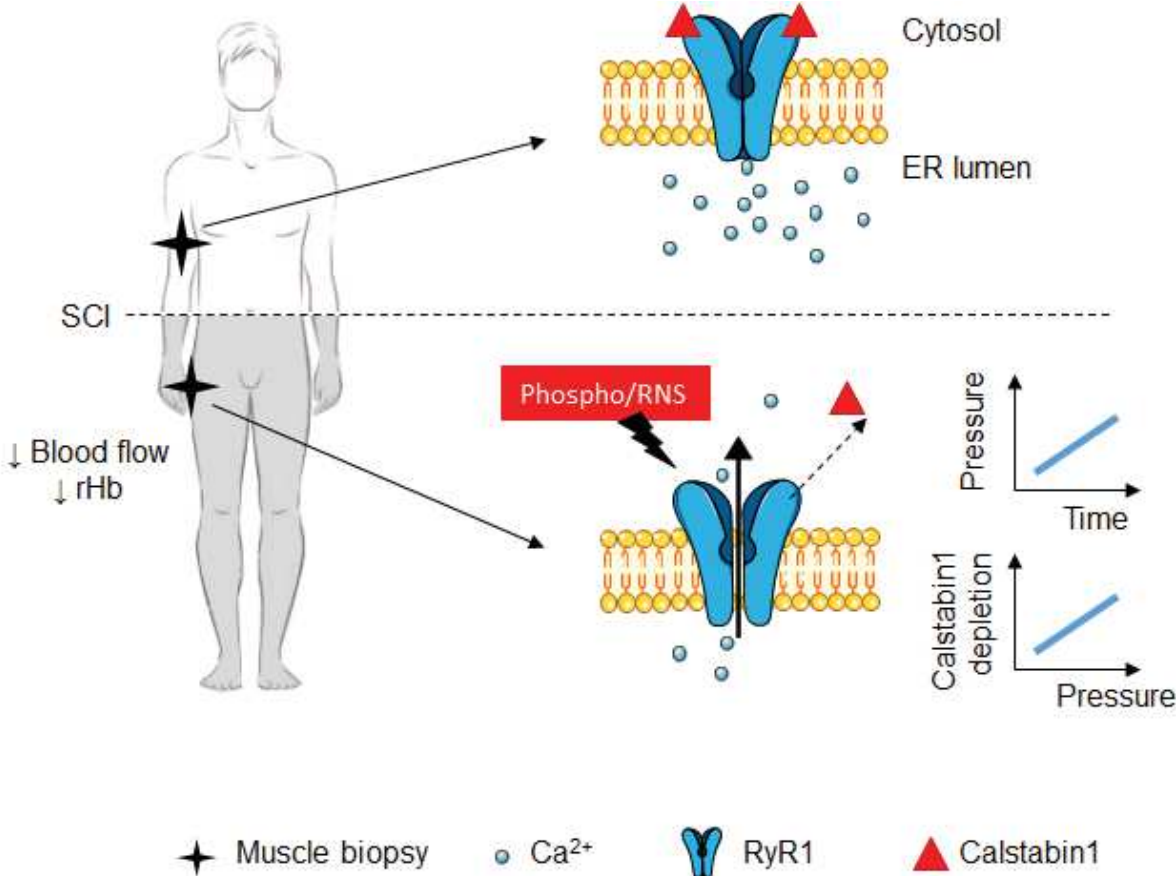


Figure 42 : Schéma bilan étude 2

Article

Title: Depletion of calstabin1 from RyR1 in skeletal muscle of bedridden spinal cord injury correlates with pressure applied on their skin: a new insight on pressure ulcer etiology

Short title: RyR1/calstabin1 interaction, the key in PU development?

Marion Le Gall^{1,5}, Steve Reiken², Eric D. Agdeppa³, Stefan Matecki^{1,5}, Andrew R Marks², Luc Téot⁴, Alain Lacampagne^{1,5}

¹Phymedexp. Montpellier University. Inserm. CNRS. CHRU Montpellier. Montpellier France

² Department of Physiology and Cellular Biophysics. Clyde and Helen Wu Center for Molecular Cardiology Columbia University College of Physicians and Surgeons. New York. USA.

³ Innovation Research and Development. Hill-Rom. Batesville. Indiana. USA.

⁴ Plastic Surgery in Wound Healing and Burns. CHRU Montpellier. Montpellier. France

⁵ LIA CNRS 1185. Montpellier. France

Address for correspondence:

Dr. Alain Lacampagne

Phymedexp. Inserm U1046. CNRS UMR 9214

CHU Arnaud de Villeneuve

371 Avenue du Doyen Gaston Giraud

34295 Montpellier. France

Email: alain.lacampagne@inserm.fr

Phone: +33 467 415 228 ; Fax: +33 467 415 242

Abstract

Introduction: Spinal cord injury (SCI) injury and pressure ulcers (PU) are tightly related as immobility combined to muscle atrophy and redox imbalance will deregulate Ca^{2+} in paralyzed skeletal muscle even when they are unloaded. Recently, implication of RyR1 remodeling in SCI have been documented in rat¹. Therefore, the main purpose of this paper is to investigate the link between interface pressure applied to the skin and the RyR post translational modification occurring in deep muscle tissue.

Methods: Muscle biopsies from an ongoing clinical trial (#NCT0242046) are biochemically analyzed. Just before sampling, measurement of local micro-vascularization related parameters and interface pressure (IF) are recorded (during 3 hours for the IF). Each patient undergoes 3 biopsies, one on a paralyzed muscle (NI), one on a healthy muscle (I) and one in the bed sore area requiring surgery (E).

Results: The local micro-vascularization of paralyzed muscles is significantly altered ($p < 0.05$ for rHb I vs NI and $p < 0.001$ for flow/PAS ratio NI vs I) and RyR1 in paralyzed muscle is hyperphosphorylated and hypernitrosylated ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively, NI vs I) and calstabin1 is depleted ($p < 0.05$, NI vs I). RyR1's stabilizing protein dissociation is also significantly correlated with the mean and peak IF of the sacrum ($p = 0.023$). On the other hand, no correlation between posttranslational RyR1 modification and micro-vascularization parameters or time spent bedridden was identified, highlighting the importance of pressure intensity more so than duration of pressure.

Conclusions: RyR1 remodeling is doubly impacted in paralyzed skeletal muscle of SCI. At basal level, the oxidation state will enhance redox posttranslational modifications in paralyzed muscle. But those muscles are also withholding our weight during sitting and lying down and are therefore mechanically strained. Compression even at low pressure intensity (30 mmHg) deplete the binding between RyR1 and calstabin1 in the paralyzed muscles, leading to a leaky RyR1 and Ca^{2+} homeostasis dysregulation.

Keywords: Type 1 Ryanodine receptor, Calstabin1, spinal cord injury, pressure ulcer, atrophy

Introduction

Spinal cord injury patients (SCI) are a high risk population of pressure ulcer (PU) development with an incidence reported between 15 to 30%² and a recurrence between 3 to 33%³. In chronic SCI, i.e. more than one year after the injury, skeletal muscles underneath the medullary lesion atrophy. The muscle fiber's diameter is reduced up to 3-fold its initial value and the fiber will switch to a fast glycolytic state, decreasing the fatigue resistance of the tissue^{4,5}. The structure of the cell is impacted with fibrosis, adipocyte cell infiltration but also dilated sarcoplasmic reticulum (SR), lipid droplets in the cytosol and a decrease of the number of mitochondrion⁵. In parallel, muscle atrophy also deregulate blood and lymph vascularization of muscles below SCI^{5,6}, which, all in one, is impacting the force production^{7,8} and *de facto* the excitation-contraction coupling (ECC). Impact of the ECC system involves calcium (Ca²⁺) homeostasis dysregulation.

Recently, clinical trial on a small cohort reported that the muscles below SCI are highly fatigable in an electrostimulation protocol using low force stimulation with a fatigue index decrease by 80% compared to able bodied patients and subsequently downregulation of genes involved in oxidative stress and Ca²⁺ balance⁷. More specifically, the Ryanodine receptor (RyR) mRNA was repressed in SCI. The RyR is the largest intracellular ion channel. RyR1, the skeletal muscle isoform, enables the Ca²⁺ release from the RS to the cytosol triggering the muscle contraction in the ECC process⁹. The RyR1 macromolecular complex has a cytosolic and RS lumen domain, it is formed by 4 RyR1 subunit proteins of 565 kDa. S-nitrosylation and oxidation are reported in different pathologies and SCI rodent model¹ as each RyR1 subunit have more than 100 free cysteines¹⁰⁻¹². The posttranslational modification can deplete the RyR1 stabilizing protein of 12 kDa, the calstabin1 or FKBP12. Four calstabin1 proteins are associated to one RyR1 and in case of dissociation, the opening probability of the channel will increase creating a leaky RyR phenotype¹³.

Ca²⁺ imbalance seems to play a role in PU development and muscle lesion^{14,15}. PU etiology is still not fully understood, pressure applied to the skin at either high intensity or prolonged through time will impact the underlying muscle, resulting in intracellular reactive oxygen production (ROS) and leading to cell death. However, we do not know if a pressure threshold exists, which could be used to prevent PU development.

Therefore, there are several reasons for inquiring into the role of posttranslational RyR1 modification in skeletal muscle of SCI patients. The core objective of this paper was to correlate the posttranslational RyR alteration with interface pressure applied on patient bedridden in skeletal muscle at risk of PU.

Materials & methods

Study participants

The on-going clinical trial was conducted in accordance with the world Medical Association Guidelines for research in human, and approved by the institutional board of the Montpellier University Hospital (protocol #NCT0242046). All subjects provided written informed consent to participate in the study. 3 muscle biopsies are performed per patient from a non-innervated (NI) area (fascia latae), an innervated (I) area (biceps) and tissue near the PU (E). The study design (fig.S1), include 4 groups of paraplegic patient with an existing PU needing surgery,

distributed in group H0, H1, H2 and H3 depending on the duration (0, 1, 2 or 3 hours respectively) between the moment they lie down on their therapeutic mattress and the biopsy in non-innervated muscle. Innervated and PU biopsies are obtained during surgery. Each biopsy were quickly frozen in liquid nitrogen. Before each biopsy, measurements of the micro-vascularization detailed below were performed on the skin.

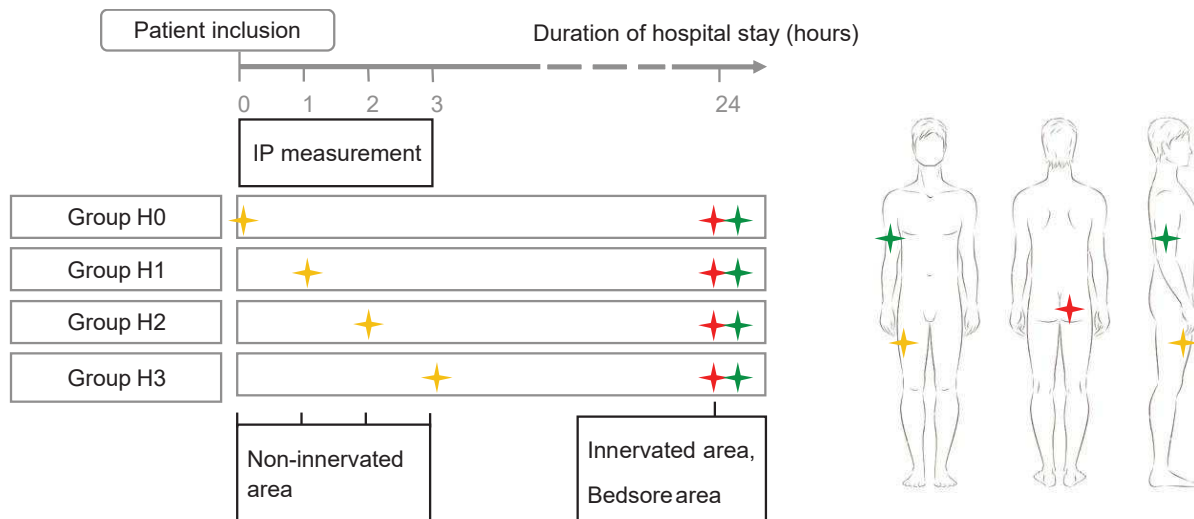


Fig.S1 Protocol for measurements with location of the biopsies The patient arrives the day before the scheduled surgery. The patient is lying on the therapeutic bed where a metrologic device XSensor is situated. Measurement are recorded during 3 hours. At 0, 1, 2 or 3h of bedrest the patient undergoes local, non-invasive, vascularization assessments then a muscle biopsy on the non-innervated area (fasciae latae). At surgery, the following day, muscle biopsies of the healthy biceps and of the pressure ulcer subcutaneous tissue is retrieved.

Immuno-precipitation

Muscle biopsies were isotonicly lysed with a douncer in 0.6 mL of lysis buffer containing (50 mM Tris maleate, pH 6.8, 35 mM NaF, 1.0 mM Na₃VO₄ and protease inhibitors) 150 µg of proteins were incubated with 500 µL of RIPA buffer (10 mM Tris·HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5.0 mM NaF, 1.0 mM Na₃VO₄, 1 % Triton X-100, and protease inhibitors) and 2 µg of anti-RyR antibody (5029) 1 hour at 4°C. We added 30 µL of protein A Sepharose beads (Sigma) to the immune complexes and let the samples incubate overnight at 4°C. Beads were collected by centrifugation and washed with RIPA buffer. Sample buffer (20% Glycerol, 140 mM SDS, 1.5% Tris 1,5M and 0.01% bromophenol blue) eludes the proteins. They were separated using SDS-PAGE electrophoresis then transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After incubation with blocking buffer (LI-COR Biosciences), membranes were blotted overnight with primary antibodies (Supplement table 2). The immunoblots were developed and quantified with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Histological assessment

Eight μm transverse sections of muscles frozen in isopentane cooled down in liquid nitrogen were cut using a cryostat (HM560, Microm). Tissue sections were stained with hematoxyline (HHS16, Sigma) and eosine (HT110116, Sigma) then mounted with xylene embedding medium (Entellan, Electron Microscopy Sciences).

Interface pressure measurement

Three LX100 pads are used as interface pressure mapping system (Xsensor™ Technology Corporation) with 2304 pressure sensors each, mounted within a thin vinyl mat. The pads are laid down on the therapeutic mattress and cover with a bedsheet before the patient lie down on the bed. Non-invasive, continuous interface pressure measurement is recorded automatically during 3 hours on a computer with one measure per second. Data acquisition was performed by using the software X3Medical (ver. 6.0, Xsensor™ Technology Corporation). The recordings were analyzed by using X3Medical (ver. 6.0, Xsensor™ Technology Corporation), macro on Excel (Microsoft Office) and Prism (ver. 7.0, GraphPad).

Micro-vascularization related parameter measurement

O2C (Oxygen To See) is a medical device (LEA Medzintechnik) is Doppler flowmeter combined with a tissue spectrometer. A probe is positioned 1 minute on the skin of the patient to measure non-invasively local micro-vascularization related parameters as oxygen saturation (SO₂), the amount of hemoglobin (rHb) and blood flow at the venous part of the capillaries at each location of interest. Values are reported on a case reform form (CRF).

Statistical analysis

Statistical analyses were realized with Prism (ver. 7.0, GraphPad). Data are presented as mean \pm standard error of mean. When appropriate, one-way ANNOVA was used to compare patient samples with correction for multiple comparison. Spearman correlation was used to assess the correlation between two parameters. Significance was fixed at p value < 0.05 .

Results & discussion

The results presented in this section remain preliminary as the clinical trial mentioned is still ongoing (21 patients included over 48 scheduled). The patient demographics are synthesized in table 1. The patients are primarily male with a large range of age. The majority of the PU existing on patients are of grade 4 with suspicion of bone contact. Patient either came to surgery for a medical debridement of their wound, consisting of removing all dead tissue and performing bone and soft tissue biopsies for anapathology and bacteriology assessment before flap surgery. The biological information about the blood results of the enrolled patient are stated in table 2.

1. Ischemic non-innervated muscles below SCI

Vascularization of SCI patients are altered: micro-angiopathies and venous stasis are reported¹⁶. Depending for how long the paraplegia is settled, vasomotor alterations, decrease of venous capacity and structural alteration of blood and lymphatic vessels can create an hypoxic area below the SCI^{5,17}. We measured no difference in SO₂ between our groups (figure 1a) and neither in absolute flow (fig 1c) so the venous capacity of this patient's cohort

is within physiological range, which may be due to the fact that we excluded patients with either arteritis or cardiac pathology. However, there is a significant decrease between hemoglobin amount in non-innervated area (NI) (anatomical location are illustrated in fig 1e) compared to innervated (I) muscle (fig 1b) ($p=0.0178$ between I vs NI and $p=0.0504$ between bed sore vs NI, $n \geq 19/\text{group}$). The arterial diastolic pressure (PAS) of the patients, measured by a nurse the same day, is reported in the patient medical file. The ratio of blood flow on PAS is significantly decreased in both bed sore area and NI muscles compared to I (fig 1e) ($p=0.0061$ between I vs NI and $p=0.015$ between bed sore vs I, $n \geq 19/\text{group}$). A disturbance of blood flow combined with a decrease of rHb but a correct SO_2 support the hypothesis of tissue hypoxia below the SCI which may create ischemia and subsequent ischemia-reperfusion (IR) when medical staff will come to mobilize the patient points of support every 2 to 3 hours^{18–20}. However, measurement of local micro-vascularization may vary depending on skin temperature and emotional state of the patient. As we studied paraplegic patients with a potential thermoregulation disorder, we assessed the skin temperature of the anatomical points of interest. We also matched the value of the 3 samples per patient because the majority of them regularly took anticoagulation drugs event if they did not at least 24 hours before being enrolled of the study (non-inclusion criteria).

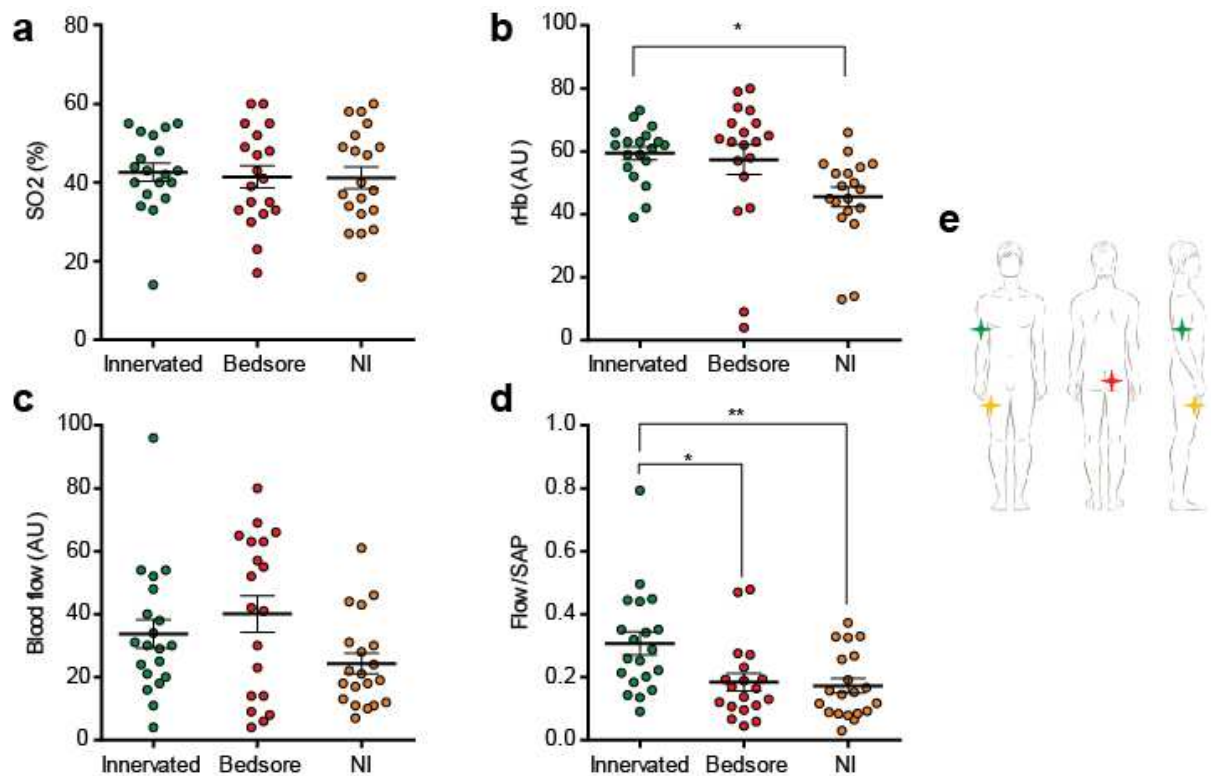


Fig 1 Decrease of rHb and blood flow / PAS ratio below the SCI Quantification in scatter plot of micro-vascularization measurements using O2C® at room temperature from Innervated (I). Bed sore (E) and Non-innervated (NI) area. (a) Oxygen saturation (SO_2), (b) hemoglobin quantity (rHb), (c) blood flow, (d) ratio blood flow/ systolic arterial pressure (SAP), the pressure is recorded while patient is seating down. (e) Localization of the muscle biopsies and micro-vascularization local measurement. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 20$ patients/group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs I

2. Post-translational modification of the RyR1 in skeletal paralyzed muscles

Each patient biopsy was matched to the other biopsies to have an internal control per patient and decrease the results variability. Calstabin1 is significantly depleted in bedsores tissues and NI muscles (mean ratio 4.0 ± 0.0 for I vs 2.21 ± 0.7 for NI and 0.57 ± 0.2 for E, $n=18/\text{group}$), fig 2a. It is worth mentioning that in 16/18 biopsies from bedsores area, calstabin1 is completely dissociated from RyR1. RyR1 channels are significantly S-nitrosylated (mean ratio 1.0 ± 0.0 for I vs 3.09 ± 0.5 for NI and 3.24 ± 0.3 for E, $n=14/\text{group}$) and phosphorylated at serine 2844 (mean ratio 1.0 ± 0.0 for I vs 5.24 ± 1.51 for NI and 5.03 ± 1.84 for E, $n=13/\text{group}$) (Figure 2b-d). There is a trend of RyR1 hyperoxidation between NI and I (mean ratio 1.0 ± 0.0 for I vs 5.37 ± 1.66 for NI and 4.54 ± 1.74 for E, $p=0.056$, $n=13/\text{group}$) but not significant. For the first time in human, we show that skeletal compressed muscle under SCI have RyR1 remodeling. Considering the level of alteration, we can suppose that the RyR1 is leaky in those muscles and the functionality is impaired. Moreover, paralyzed muscle also have a decrease in the expression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -AT-Pase (SERCA) protein⁷. SERCA works as a pump to remove the cytosolic Ca^{2+} into the RS. Taken together, those results highlight a severe Ca^{2+} deregulation into the muscle fibers below the SCI, which explain the loss of force in those patients and the difficulty to train their atrophic muscles with electrostimulation without creating muscle damage. Of relevance, there were histological alteration in H&E staining of I and NI biopsies from the same patient (fig S2) the visible lesions are similar to the muscular atrophy in a model of Duchenne myopathy²¹.

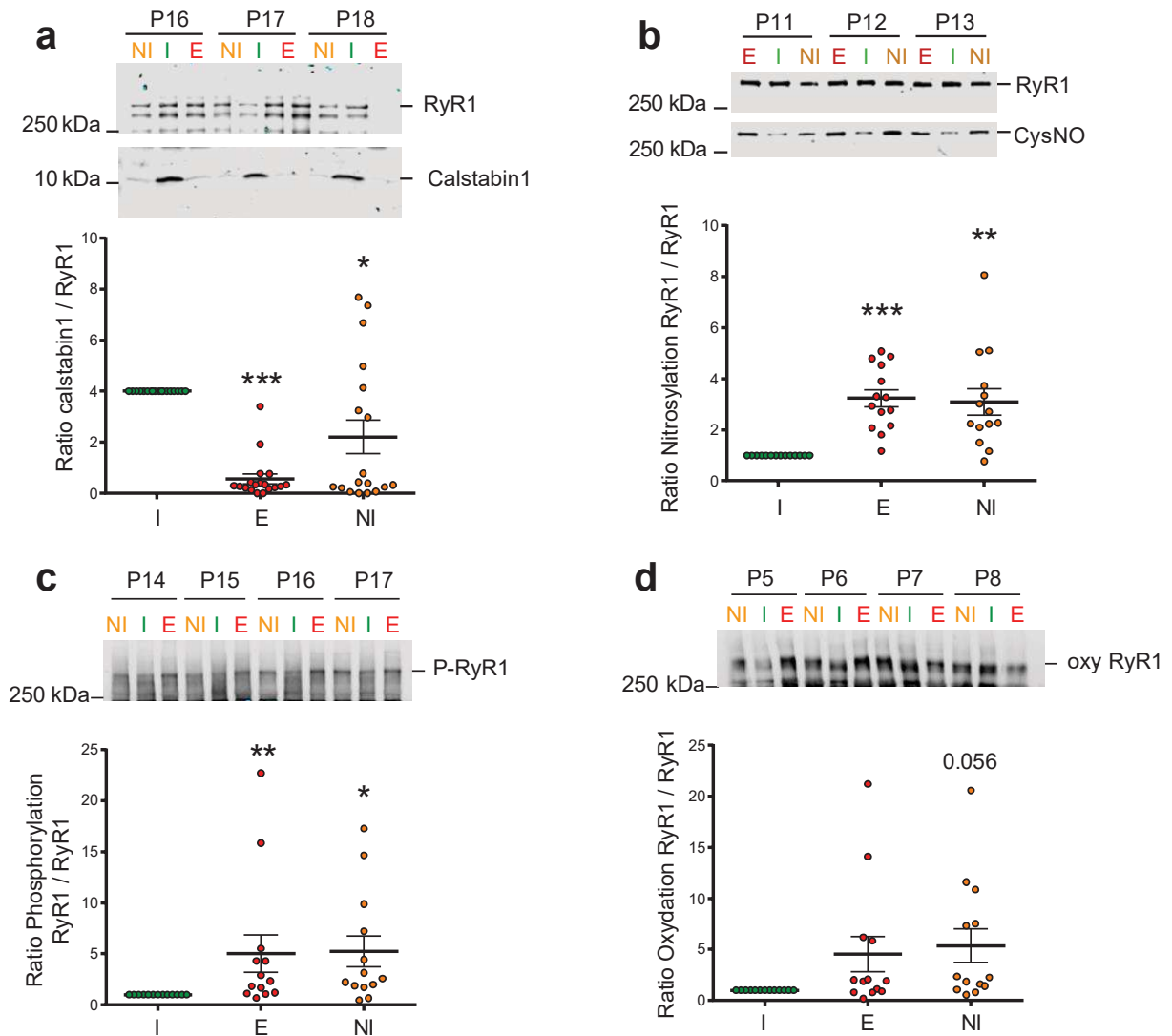


Fig 2 Alteration of the RyR1 below the SCI Representative immunoblots of immunoprecipitated Ryanodine Receptor type 1 (RyR1) and quantification of (a) calstabin1 expression bound to RyR1, (b) RyR1 nitrosylation, (c) RyR1 phosphorylation, (d) RyR1 oxidation. All data are shown as mean \pm SEM. $n \geq 13$ patients/group. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs I

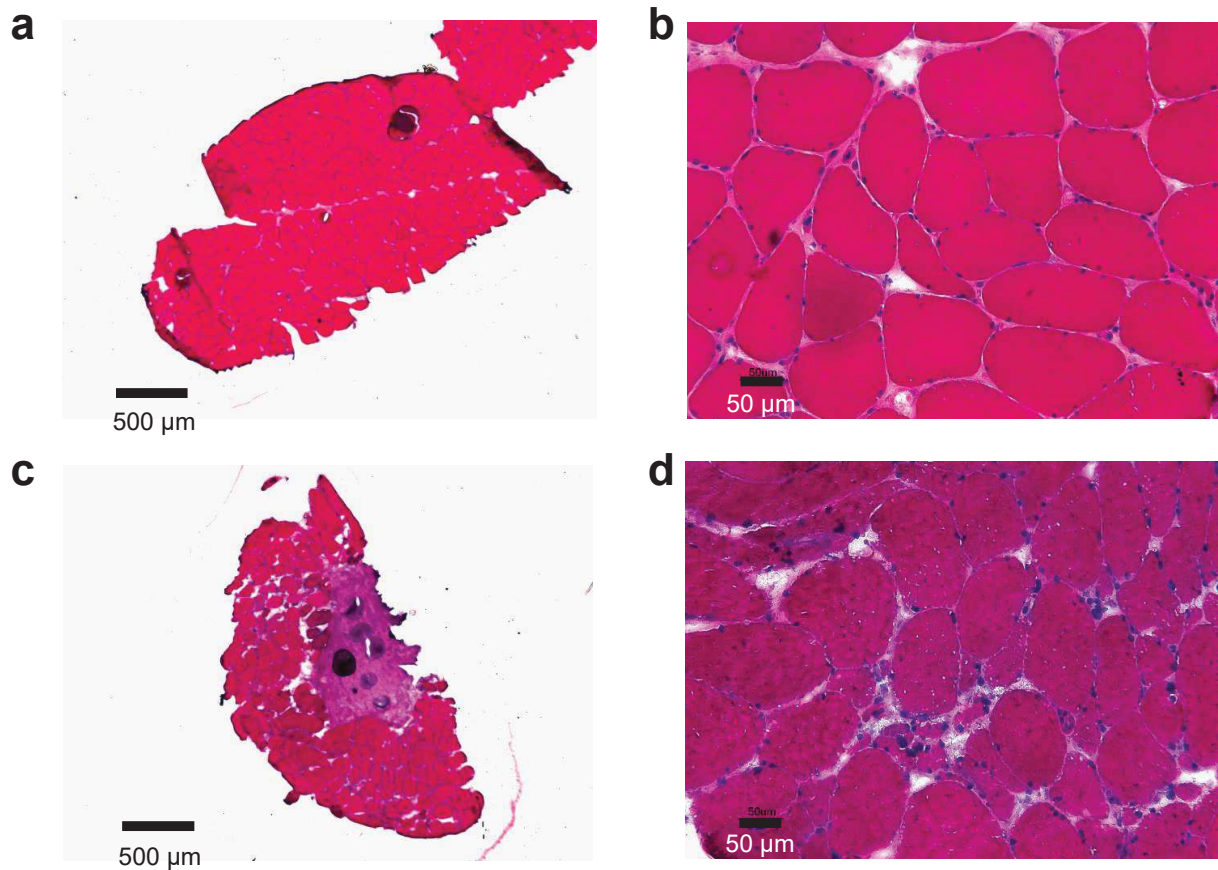


Fig.S2 Histology alterations of the muscle below SCI Representative hematoxylin eosin (HE) staining of 2 muscles. (a) Innervated muscle from patient biceps, scale bar: 500 µm ; (b) zoom x10, scale bar: 50 µm ; (c) Non-innervated muscle from patient fascia latae, muscular atrophy present, scale bar: 500µm : (d) zoom x10. scale bar: 50 µm.

3. Pressure interface oscillation in sacrum area with alternative air mattress

For this project, we focussed on interface pressure applied on the sacrum pad (fig 2a). The range of pressure visualized is between 10 and 100 mmHg but sensors measured the individual point of pressure between 5 and 200 mmHg (LX100 calibrated accordingly). All patients are supported by half the air cushions, inflated at high pressure, on an alternative air mattress (Nimbus™ 3, ArjoHuntleigh). Every 4 minutes, half the cushions (ratio 1:1) deflate when the other half inflate to change the body area under strained. From the database of interface pressure we implement, we extract values from 8 minutes of recording to work on 2 whole cycles of alternative pressure. Each frame of the 8 minutes recording is checked to ensure that the patient is not moving too much. Data are exported to Excel to obtain, mean and peak pressure and total contact area (TCA) between the body and the mattress of the whole pad and follow a specific group of sensors manually located to bony prominence where the PU developed (fig 2b illustrates the evolution of pressure from the fig 2a patient, lying slightly non horizontal, the bed rest is elevated so we can measure both the pressure applied at the sacrum area and directly under his ischial tuberosities). To assess the evolution of pressure with the time spend bedridden, 4 sequences at respectively 0h

(baseline), 1h, 2h and 3h of bedrest are analyzed. The data are reported in table 3 and illustrated fig 2c. There is a moderate rise of all parameters with time spend bedridden and the average pressure at the sacrum area oscillate depending with the air cushions inflation and deflation. The magnitude is increasing with time spend bedridden (delta between minimum and maximum average values are 3.5 for baseline, 6.32 for 1h, 3.41 for 2h and 8.85 mmHg for 3h bedridden).

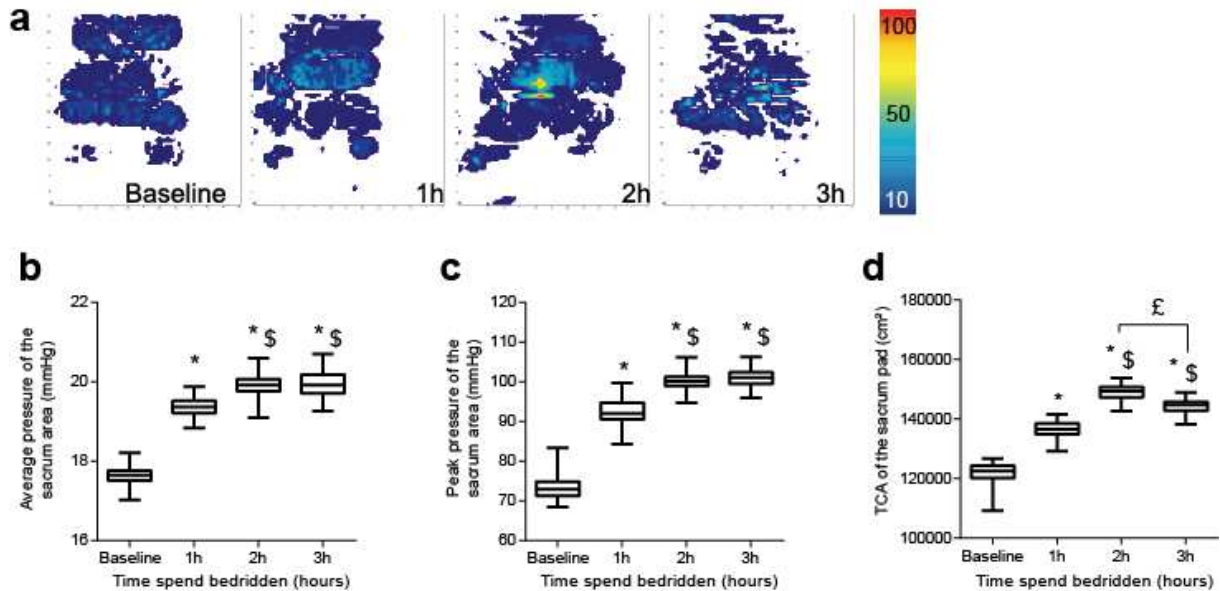


Fig 3 Sacrum interface pressure (a) Representative interface pressure mapping of the sacrum pad of a patient lying supine during 0h-3h on an alternative therapeutic surface; Bar graphs of the average pressure (b), peak pressure (c), and total contact area (d) on the sacrum area at baseline (0h) values and after 1h, 2h and 3h bedridden on SCI patients lying on alternative therapeutic surface. The values are from 8 min measurement on alternative mode (= 2 whole cycles), $n \geq 18$ patients/group.

4. Correlation between post translational RyR1 change and mechanical stress

This paper focuses on the correlation between the RyR1 remodeling and a mechanical strain applied to the patient body. Some finite elements modeling studies already demonstrate that pressure applied on the skin is not the same as the pressure applied to the underlying tissue. Nonetheless, non-invasive pressure mapping is a great tool to get quantitative data from a clinical situation and allowing to assess the risk for a patient to develop a PU^{22,23}. Here we are able to correlate the average and peak pressure applied at the sacrum area to a depletion of the calstabin1. The significance of this finding is that for an increase of pressure, we may be able to predict the deep tissue response in critical patients. The linear regression is plot in fig 4a-c and the p values of the Spearman correlations are pooled on table 4. This result needs to be consolidate with increase number of patients but it shows already that there is a threshold pressure around 30 mmHg, coincidentally with the historical value of 32 mmHg, pressure of a cannulated capillary of a healthy thumb^{24,25}.

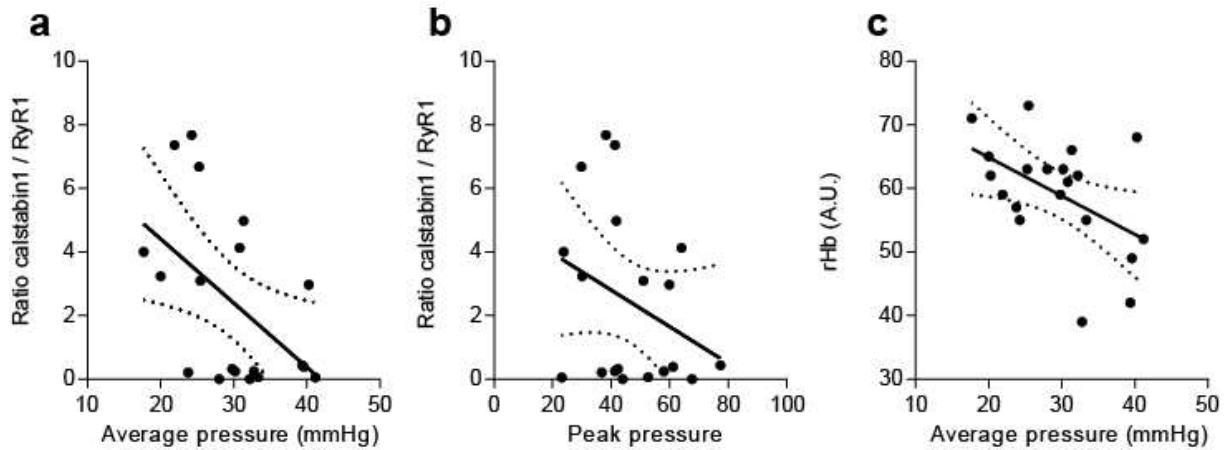


Fig 4 Spearman correlation with mechanical strain intensity (a) Linear regression of calstabin1 ratio binding to RyR1 with average pressure and (b) peak pressure at the sacrum area. (c) Linear regression of the hemoglobin quantity (rHb) with the average pressure at the sacrum area. Mean and error with 95% CI in dot lines.

Because there is an inverse relationship between pressure and time in PU etiology²⁶⁻²⁸ we investigate the relation between time spend bedridden and RyR1 post translational modification. No change was detected but there may be a trend of increase phosphorylation on patient lying done between 1 and 2 hours (fig 5a-d) (baseline mean value 1.59 ± 0.61 , 7.03 ± 2.45 for $<2h$ and 4.70 ± 2.59 for $>2h$). According to the literature^{25,29}, for pressure exposure to less than 1 hour (our baseline) or compression longer than 2 hours, the cell damage is directly function of the pressure intensity applied whereas for a strain applied between 1 and 2 hours, the amount of damage depends to both pressure intensity and duration of the strain.

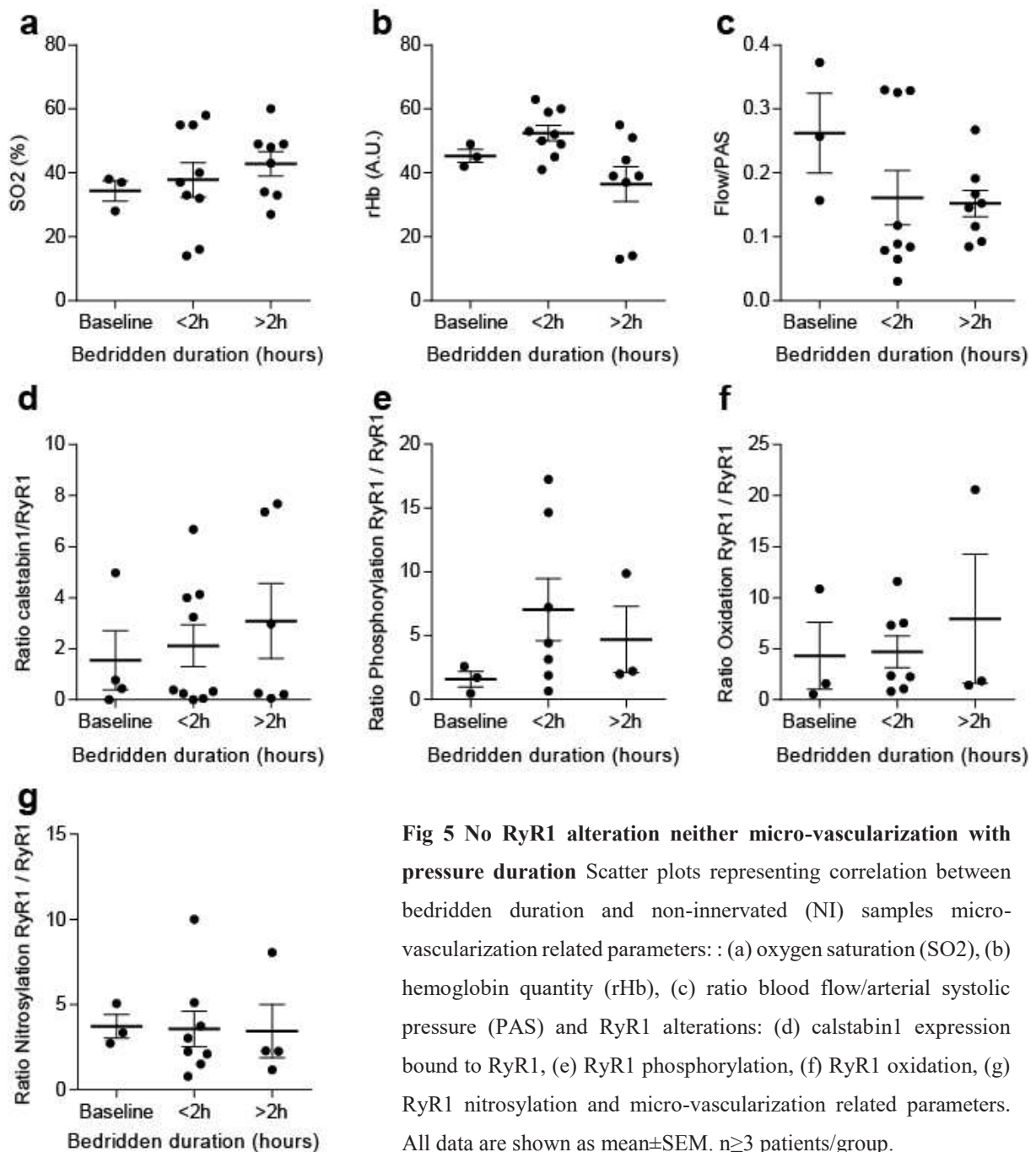


Fig 5 No RyR1 alteration neither micro-vascularization with pressure duration Scatter plots representing correlation between bedridden duration and non-innervated (NI) samples micro-vascularization related parameters: : (a) oxygen saturation (SO₂), (b) hemoglobin quantity (rHb), (c) ratio blood flow/arterial systolic pressure (PAS) and RyR1 alterations: (d) calstabin1 expression bound to RyR1, (e) RyR1 phosphorylation, (f) RyR1 oxidation, (g) RyR1 nitrosylation and micro-vascularization related parameters. All data are shown as mean±SEM. n≥3 patients/group.

Ours results and literature review indicate a link between pressure interface and micro-vascularization measurements³⁰⁻³², therefore the secondary goal of this study was to correlate micro-vascularization parameters and RyR1 remodeling. The Spearman correlation coefficient are pooled in table 5. No relationship was computed between SO₂, rHb, blood flow, nor blood flow/PAS ratio (data not shown). Regarding our last hypothesis on the effect of pressure and intensity, the absence of correlation support that on our patient cohort, pressure intensity is much more critical than time spend bedridden.

5. Research of PU biomarker: database of SCI serum

Biomarkers are measurable and quantitative markers of either the presence or the seriousness of a pathology. Serum, sweat and urine markers are interesting topics in PU prevention³³ because it could be able to detect in routine measurement early muscle damage before skin breakdown and vicious circle of reconstructive surgery and recurrence (because of skin and muscle scar, increasing tissue rigidity and rising the compression intensity³⁴). The supplemental table 1 regroups serum analysis of paraplegic patients with an existing PU. Interestingly, compared to physiological range troponin T increases, which could be of interest for PU detection in a combination of other biomarkers³⁵. CRP and inflammatory markers are not specific to muscle damage and would give false-positive³⁶. The studied patient cohort is slightly anemic. In the light of this first screening, serum could be tested with ELISA and Milliplex kit to check other muscle damage markers such as Heart-fatty acid binding protein (H-FABP)³⁵, metalloproteinase³⁷ or maybe free calstabin to assess its potential variation.

Conclusion

The focus of this paper was to understand the relationship between a mechanical constrain applied to the skin and its effect on the deep tissue underneath. Our findings highlight on a paraplegic cohort with an existing PU (stade 3 or 4) there is a hypoxia and a remodeling of RyR in tissue below the SCI. Regarding the increase of posttranslational RyR1 modifications in non-innervated area, we also correlated the pressure intensity applied to the skin a depletion of calstabin1. Therefore, both muscle atrophy and pressure intensity will lead to a deleterious calcium dysregulation in the muscle cells. Using patients primary culture cells and experimental set up for cell compression^{38,39} it will be possible to differentiate how much the SCI impacted the RyR1 remodeling and how exactly the compression will increase the calstabin1 depletion.

Conflict of interest

A. R. M. is a board member and owns shares in ARMGO Pharma Inc., which is targeting RyR channels for therapeutic purposes. E. D. A. is the Executive Director, Innovation Research and Development, Hill-Rom.

Table 1 Patients demographics

Characteristic		n or mean \pm SD (range)
Male/Female		18 / 3
Age (year)		53 \pm 15 (28-79)
BMI (kg/m ²)		26.0 \pm 4.7 (18.6-36.7)
Lesion level		
	T5-T9	9
	T10-L2	10
PU grade		
	Grade 3	3
	Grade 4	17
Surgery done		
	Debridement	7
	Flap	14
Diabetes mellitus type 2		2

Table 2 Comparative biology of blood results of the patient enrolled in the study

Biological results	Mean \pm SD (range)	Physiological range	n
CRP plasmatic (mg/L)	46.0 \pm 59.7 (3.4-221.9)*	<5.0	17
Creatine Enzymatic (μ mol/L)	56.8 \pm 24.9 (31-135)*	59-104	16
Albumin (g/L)	37 \pm 3.3 (30-42)	35-52	12
Hemoglobin (g/dL)	12.2 \pm 1.8 (9.0-16.1)*	13-18	20
Hematocrit (%)	37.3 \pm 4.7 (28.3-46.6)*	39-54	20
Red blood cells (10 ¹² /L)	4.5 \pm 0.49 (3.6-5.6)	4.5-6.0	19
Hb concentration (g/dL)	32.9 \pm 1.1 (31.2-35.3)	31-36	18
Platelets (10 ⁹ /L)	305 \pm 119 (161-548)	150-400	20

Table 3 Comparison between the baseline values and values after 1 hour, 2 hours and 3 hours bedridden on SCI patient lying on alternative therapeutic surface. $N \geq 18$ patients/group. The mean data is on the sacrum area, the values are mean from 8 min on alternative mode (= 2 whole cycles). Expressed as mean data \pm SEM)

	Baseline	At 1h	At 2h	At 3h
Mean (mmHg)	17.63 \pm 0.01	19.37 \pm 0.01	19.9 \pm 0.27	19.95 \pm 0.02
Peak (mmHg)	73.26 \pm 0.15	92.33 \pm 0.16	100.1 \pm 0.09	100.8 \pm 0.11
TCA (cm ²)	1216.32 \pm 1.46	1232.96 \pm 1.16	1489.31 \pm 1.08	1442.37 \pm 2.14
Mean sacrum (mmHg)	26.05 \pm 0.03	28.56 \pm 0.08	31.36 \pm 0.04	31.45 \pm 0.11
CV sacrum (%)	3.11	6.21	2.5	8.09
Peak sacrum (mmHg)	41.72 \pm 0.07	44.9 \pm 0.15	55.57 \pm 0.09	55.99 \pm 0.16

TCA: total contact area. CV: coefficient of variation.

Table 4 Spearman correlation between RyR1 alterations and pressure intensity applied over the muscle biopsied. * $p < 0.05$

	Calstabin1 ratio	Nitrosylation RyR1 ratio	Oxydation RyR1 ratio	Phosphorylation RyR1 ratio
Average pressure (mmHg)	0.024*	0.735	0.056	0.084
Peak pressure (mmHg)	0.050*	0.887	0.216	0.078

Table 5 Spearman correlation between RyR1 alterations and micro-vascularization related parameters measured on subcutaneous tissue of biopsy site.

	Calstabin1 ratio	Nitrosylation RyR1 ratio	Oxydation RyR1 ratio	Phosphorylation RyR1 ratio
SO2 (%)	0.4784	0.4558	0.3175	0.7649
rHb (AU)	0.4770	0.6268	0.9061	0.9085
Flow/PAS (AU)				

Table 6 Spearman correlation between pressure intensity applied over the muscle biopsied and micro-vascularization related parameters measured on subcutaneous tissue of biopsy site. * $p < 0.05$

	SO2 (%)	rHb (AU)	Flow/SAP (AU)
Average pressure (mmHg)	0.557	0.027*	0.842
Peak pressure (mmHg)	0.441	0.385	0.494

Supplemental table 1 Comparative biology of blood results of the paraplegic patients with an existing pressure ulcer

Biological results	Mean \pm SD (range)	Physiological range	n
Urea (mmol/L)	6.16 \pm 1.04 (2.7-15)	2.8-8.1	20
Creatine Enzymatic (μ mol/L)	62.05 \pm 3.63 (28-145)	59-104	20
Na(mmol/L)	138.40 \pm 0.13 (135-142)	136-145	20
K (mmol/L)	4.13 \pm 0.12 (3.6-4.7)	3.4-4.5	20
Chlorine (mmol/L)	100.05 \pm 0.20 (94-104)	98-107	20
Bicarbonates (mmol/L)	24.00 \pm 0.61 (19-30)	22-29	20
Plasmatic proteins (g/L)	73.79 \pm 0.48 (63-85)	66-87	19
Albumin (g/L)	37.50 \pm 0.52 (31-46)	35-52	20
LDH (UI/L)	163.47 \pm 1.52 (116-233)	135-225	19
Myoglobin (L)	42.35 \pm 4.83 (21-183.6)	28-72	19
Troponin T-Hs (ng/L)	30.42 \pm 8.48 (<3-187.2)*	<14	19
CRP plasmatic (mg/L)	33.49 \pm 4.82 (3.1-134.9)*	<5	20
Hemoglobin (g/dL)	12.41 \pm 0.31 (10-15.7)*	13-18	19
Hematocrit (%)	37.71 \pm 0.52 (30-47.8)*	39-54	19
Red blood cells ($10^{12}/L$)	4.54 \pm 0.18 (3.43-5.64)	4.5-6.0	19
Mean cell volume (fl)	83.37 \pm 0.70 (71-94)	80-100	19
Hb charge (pg)	27.49 \pm 0.48 (22.3-31.4)	27-33	19
Hb concentration (g/dL)	32.92 \pm 0.13 (30.8-34.8)	31-36	19
Anisocytosis coef (%)	17.37 \pm 0.55 (13.5-22.1)*	11.5-15	19
Platelets ($10^9/L$)	316.47 \pm 4.31 (144-687)	150-400	19
Platelets mean volume (fl)	18.09 \pm 5.15 (7-95)*	7-11	19
Nucleated cells ($10^9/L$)	8.74 \pm 0.52 (4.54-12.89)	4-10	19
Fibrinogene activity (g/L)	5.34 \pm 0.61 (3.2-7.4)*	1.9-4	15

Supplemental table 2 antibody details

Antibody	Dilution	Host	Manufacturer	Reference
Calstabin 1	1:1 000	Goat	Santa Cruz	Sc-6173
Calstabin 1	1:2 500	Rabbit	Santa Cruz	Sc-28814
Dinitrophenylhydrazine	1:300	Rabbit	Millipore	S7150 Oxyblot kit
GAPDH	1:60 000	Mouse	Abcam	Ab8245
P-RyR (PKA ser-2844)	1: 1 000	Rabbit	Custom made	None
RyR 1 (5029)	1:5 000	Rabbit	Custom made	None
RyR 1 (C34)	1:1 000	Mouse	Abcam	Ab2868
S-Nitroso-Cysteine	1:1000	Rabbit	Sigma	N5411
Vinculin (7F9)	1:1 000	Mouse	Santa Cruz	Sc-73614

1. Liu, X.-H., Harlow, L., Graham, Z. A., Bauman, W. A. & Cardozo, C. Spinal Cord Injury Leads to Hyperoxidation and Nitrosylation of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor-1 Associated with Upregulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4. *J. Neurotrauma* **34**, 2069–2074 (2017).
2. Gélis, A. *et al.* Pressure ulcer risk factors in persons with spinal cord injury Part 2: the chronic stage. *Spinal Cord* **47**, 651–661 (2009).
3. Kruger, E. A., Pires, M., Ngann, Y., Sterling, M. & Rubayi, S. Comprehensive management of pressure ulcers in spinal cord injury: Current concepts and future trends. *J. Spinal Cord Med.* **36**, 572–585 (2013).
4. Dupont-Versteegden, E. E., Houlé, J. D., Gurley, C. M. & Peterson, C. A. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am. J. Physiol.* **275**, C1124–1133 (1998).
5. Scelsi, R. Skeletal muscle pathology after spinal cord injury: Our 20 year experience and results on skeletal muscle changes in paraplegics, related to functional rehabilitation. *Basic Appl Myol* **11**, 75–85 (2001).
6. Carry, M. R., Ringel, S. P. & Starcevich, J. M. Distribution of capillaries in normal and diseased human skeletal muscle. *Muscle Nerve* **9**, 445–454 (1986).
7. Petrie, M. A., Suneja, M., Faidley, E. & Shields, R. K. Low force contractions induce fatigue consistent with muscle mRNA expression in people with spinal cord injury. *Physiol. Rep.* **2**, e00248 (2014).
8. Frontera, W. R. *et al.* Single muscle fiber size and contractility after spinal cord injury in rats. *Muscle Nerve* **34**, 101–104 (2006).
9. Clarke, O. B. & Hendrickson, W. A. Structures of the Colossal RyR1 Calcium Release Channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **39**, 144–152 (2016).
10. Witherspoon, J. W. & Meilleur, K. G. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, (2016).
11. Bellinger, A. M. *et al.* Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* **15**, 325–330 (2009).
12. Andersson, D. C. *et al.* Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* **14**, 196–207 (2011).
13. Bellinger, A. M. *et al.* Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: A molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2198–2202 (2008).
14. Nowycky, M. C. Intracellular calcium signaling. *J. Cell Sci.* **115**, 3715–3716 (2002).
15. Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q. & Marks, A. R. Intracellular calcium release channels: an update. *J. Physiol.* **595**, 3041–3051 (2017).
16. Scelsi, R., Scelsi, L., Bocchi, R. & Lotta, S. Morphological changes in the skin microlymphatics in recently injured paraplegic patients with ilio-femoral venous thrombosis. *Paraplegia* **33**, 472–475 (1995).
17. Siperstein, M. D., Raskin, P. & Burns, H. Electron microscopic quantification of diabetic microangiopathy. *Diabetes* **22**, 514–527 (1973).
18. Latimer, S., Chaboyer, W. & Gillespie, B. M. The repositioning of hospitalized patients with reduced mobility: a prospective study. *Nurs. Open* **2**, 85–93 (2015).
19. Zomorodi, M., Topley, D. & McAnaw, M. Developing a Mobility Protocol for Early Mobilization of Patients in a Surgical/Trauma ICU. *Crit. Care Res. Pract.* **2012**, (2012).
20. Hagsisawa, S. & Ferguson-Pell, M. Evidence supporting the use of two-hourly turning for pressure ulcer prevention. *J. Tissue Viability* **17**, 76–81 (2008).
21. Capogrosso, R. F. *et al.* Ryanodine channel complex stabilizer compound S48168/ARM210 as a disease modifier in dystrophin-deficient mdx mice: proof-of-concept study and independent validation of efficacy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **32**, 1025–1043 (2018).
22. Shabshin, N., Zoizner, G., Herman, A., Ougortsin, V. & Gefen, A. Use of weight-bearing MRI for evaluating wheelchair cushions based on internal soft-tissue deformations under ischial tuberosities. *J. Rehabil. Res. Dev.* **47**, 31–42 (2010).
23. Linder-Ganz, E., Yarnitzky, G., Yizhar, Z., Siev-Ner, I. & Gefen, A. Real-time finite element monitoring of sub-dermal tissue stresses in individuals with spinal cord injury: toward prevention of pressure ulcers. *Ann. Biomed. Eng.* **37**, 387–400 (2009).
24. Landis, E. Micro-injection studies of capillary blood pressure in human skin. *Heart* **15**, 209–228 (1930).
25. Linder-Ganz, E., Engelberg, S., Scheinowitz, M. & Gefen, A. Pressure-time cell death threshold for albino rat skeletal muscles as related to pressure sore biomechanics. *J. Biomech.* **39**, 2725–2732 (2006).
26. Luboz, V. *et al.* Personalized modeling for real-time pressure ulcer prevention in sitting posture. *J. Tissue Viability* **27**, 54–58 (2018).
27. Loerakker, S. Aetiology of pressure ulcers. *BMTE 0739 Eindhoven University of Technology*, 31 (2007).
28. Leopold, E. & Gefen, A. A simple stochastic model to explain the sigmoid nature of the strain-time cellular tolerance curve. *J. Tissue Viability* **21**, 27–36 (2012).
29. Breuls, R. G. M., Bouten, C. V. C., Oomens, C. W. J., Bader, D. L. & Baaijens, F. P. T. Compression induced cell damage in engineered muscle tissue: an in vitro model to study pressure ulcer aetiology. *Ann. Biomed. Eng.* **31**, 1357–1364 (2003).

30. Bader, D. *et al.* Biochemical Status of Soft Tissues Subjected to Sustained Pressure. in *Pressure Ulcer Research: Current and Future Perspectives* (eds. Bader, D. L., Bouten, C. V. C., Colin, D. & Oomens, C. W. J.) 109–127 (Springer Berlin Heidelberg, 2005). doi:10.1007/3-540-28804-X_8
31. Leopold, E., Sopher, R. & Gefen, A. The effect of compressive deformations on the rate of build-up of oxygen in isolated skeletal muscle cells. *Med. Eng. Phys.* **33**, 1072–1078 (2011).
32. Arias, S. *et al.* Effects on interface pressure and tissue oxygenation under ischial tuberosities during the application of an alternating cushion. *J. Tissue Viability* **24**, 91–101 (2015).
33. Bader, D. & Oomens, C. The Potential of Biomarkers in the Early Detection of Pressure Ulcers. in *Science and Practice of Pressure Ulcer Management* (eds. Romanelli, M., Clark, M., Gefen, A. & Ciprandi, G.) 1–15 (Springer London, 2018). doi:10.1007/978-1-4471-7413-4_1
34. Sopher, R., Nixon, J., Gorecki, C. & Gefen, A. Effects of Intramuscular Fat Infiltration, Scarring, and Spasticity on the Risk for Sitting-Acquired Deep Tissue Injury in Spinal Cord Injury Patients. *J. Biomech. Eng.* **133**, 021011-021011-12 (2011).
35. Loerakker, S. *et al.* Plasma variations of biomarkers for muscle damage in male nondisabled and spinal cord injured subjects. *J. Rehabil. Res. Dev.* **49**, 361–372 (2012).
36. Du Clos, T. W. Function of C-reactive protein. *Ann. Med.* **32**, 274–278 (2000).
37. Ladwig, G. P. *et al.* Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **10**, 26–37 (2002).

Etude 3 : Le graphène pour booster la cicatrisation

Introduction

La cicatrisation des plaies chroniques, comme vu dans le dernier chapitre de la revue de la littérature, est une problématique mondiale qui a des conséquences gravissimes sur la santé et le futur des patients (infections, sepsis, amputations, etc.) (Frykberg and Banks, 2015). Pour améliorer la cicatrisation et protéger la plaie, les pansements ont un rôle majeur à jouer. De nouveaux biomatériaux aux propriétés uniques comme le graphène sont de bons candidats pour des applications médicales et pourraient favoriser la cicatrisation des plaies. C'est dans cette optique que nous avons testé un nouvel assemblage de graphène, produit par l'équipe du Dr Bouchiat (Institut Neel Grenoble), sur un modèle de plaie aiguë et chronique de souris. Afin de suivre les différentes étapes de cicatrisation, nous avons choisi d'étudier la thermographie de la plaie qui permet d'évaluer quantitativement et objectivement de façon non-invasive le reflet d'une inflammation et de la circulation sanguine.

Conclusion

Le pansement de graphène accélère la cicatrisation des plaies sur nos modèles aiguë et chronique. Les souris bénéficiant de ce pansement avaient une moindre variation de température au moment du retrait du pansement à la fin de la phase d'inflammation/début de la prolifération, indiquant une diminution de l'inflammation et/ou une meilleure vascularisation. Les plaies se refermaient plus vite, suivant l'analyse macroscopique, sur un modèle de souris diabétique, à cicatrisation retardée. Sous réserve d'une faible cytotoxicité (actuellement en test), l'utilisation de pansement au graphène permettrait d'accélérer la cicatrisation tant que le graphène est directement en contact avec la plaie. Des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour identifier comment.

Article

Title: Graphene dressing promotes healing and stabilizes skin temperature on acute and chronic wound models

Short title: Graphene to heal

Marion Le Gall¹, Vincent Serantoni², Hervé Louche², Franck Jourdan², Dominique Sigaudou-Roussel^{3,4}, Luc Téot⁵, Vincent Bouchiat^{6,7}, Alain Lacampagne¹

¹ Phymedexp, Montpellier University, Inserm, CNRS, CHRU Montpellier, Montpellier France

² LMGC, Montpellier University, CNRS Montpellier, France

³ LBTI, UMR CNRS 5305, Lyon Cedex 07, France.

⁴ University of Lyon 1, Lyon Cedex 07, France.

⁵ Plastic Surgery in Wound Healing and Burns, CHRU Montpellier, Montpellier, France

⁶ Grenoble Alpes University, Institut Néel, Grenoble, France

⁷ CNRS, Institut Néel, Grenoble, France

Address for correspondence:

Dr. Alain Lacampagne

Phymedexp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214

CHU Arnaud de Villeneuve

371 Avenue du Doyen Gaston Giraud

34295 Montpellier, France

Email: alain.lacampagne@inserm.fr

Phone: +33 467 415 228 ; Fax: +33 467 415 242

Introduction: Chronic wounds affect millions of people worldwide and lead to infections and amputations with devastating effect on life expectancy. Dressings are the most common medical device used to protect the wound against microbial and trauma and enhance its healing. The properties of the graphene, a two dimensional layout of carbon atoms, seem to be of interest to support the wound healing.

Methods: A cutaneous excisional wound¹ was created on the dorsal surface of healthy and diabetic (type 1, streptozotocine induced) male C57BL6J mice to mimic acute and chronic wound healing respectively. Anti-contraction splints and dressing with (graphene) or without (SHAM) a single layer of graphene were applied randomly on animals and were changed every 2-3 days under anesthesia, until D10 for healthy animal and D12 for diabetic animals. Thermal data and photographic assessment of the wound was recorded at the same time during each dressing change and every 2-3 days after splint removing, until wound closure. Blood and lesions area are retrieved for histological and biochemical analysis after animal sacrifice.

Results: In the acute wound model, there was no difference of the wound area between the 2 dressings. However histological differences were reported at D4 and D10. Coincidentally, significant variation of cutaneous wound temperature (CWT) were reported at D6. In the chronic wound model, the wound area was 147% larger in group SHAM at D5 and 45% greater at D9 ($p=0.067$ and $p=0.062$ respectively) than with graphene. CPW variations at the dressing removal were decreased by 4% with graphene dressing at D2 and 3.7% at D12 for chronic wound model.

Conclusions: Graphene dressing promotes wound healing in acute and chronic model. Changes in histology are correlated with impact on CWT in acute wound depending on graphene direct contact with the wound area. Similarly, the inflammation phase in the chronic model seems to lessen with graphene. This study also emphasized that the visual quantification by measuring wound area is not the most objective way to properly evaluate wound healing and other technics such as thermography should be implemented.

Keywords: graphene, wound healing, acute wound, chronic wound, thermography, diabetes

Introduction

Graphene is a two dimensional layer of carbon atoms, corresponding of a single layer of graphite or carbon nanotube. Its properties are very interesting for many research field: biocompatible, antibacterial properties, most conductive material and very easily to synthetize coupled with other composites to enhance electrical, cytotoxic and mechanical behavior^{2,3}. Applications in medicine are currently investigated^{4,5}. Antibacterial properties of graphene have been proved and recently nanofibers of graphene were directly applied to excisional wound on mice and rabbit model to assess their impact on wound healing rate². Closed wounds were visually achieved quicker with a graphene/chitosan material than without graphene and without dressing. However, the acute model used in this study is not relevant to human as the skin healing in rodents uses mainly contraction of the skin and subcutaneous tissue whereas human skin need to create a new granulation tissue to replace the damaged area^{6,7}.

Chronic wounds are a worldwide health problem, in 2015, between 2.4 and 4.5 millions of Americans suffered from them⁸. They are defined as wound older than 3 weeks, usually suspended in the inflammatory phase of healing⁹. Because of too many neutrophils on wound site, the excess of inflammatory markers produced is damaging the growth factors used for enhancing proliferation and differentiation of fibroblasts and keratinocytes. Vascularization is impaired via deregulation or resistance of PGDF, VEGF and TGF- β and fibroblasts tend to act as senescent like cells¹⁰⁻¹². Infection is also known as an important player in the shift between acute and chronic wound^{13,14}. In regards of the literature, graphene anticoagulating, antibacterial and electrophysiological effects seems worth investigating in chronic wound healing.

This paper has two purposes: (1) investigate the effect of a graphene dressing on wound healing parameters of an acute and chronic wound, (2) introduce a new non-invasive methodology to assess the change of vascularization inside the wound.

Material & methods

Animal model

All experiments are conducted in accordance with a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Languedoc–Roussillon. Two mouse models were used in this project: (1) an acute wound mouse model, and (2) a chronic wound model. Two dressings (graphene+parlylene and parlylene only) were randomly assigned to mice prior to the beginning of the experiments.

(1) acute wound model: the back of 9 weeks-old, male C57BL/6j mice (Janvier Labs, France), were gently shaved. The following day, one skin biopsy from each mouse under anesthesia (3% Isoflurane) was sampled, using a biopsy punch Ø8mm. Photographic assessment of the excisional wound was performed with magnifier Leica M60 and IC80D. Thermic camera Cedip W infrared (Titanium 640x512 pixels) was calibrated with a black body then used to record cutaneous wound temperature (CWT) for 2 min sequences (1 frame/sec). Dressings were applied on the wound so that there was a direct contact between the biomaterial and the wound bed. Surgical KwikSill© glue kept the dressing and the anti-contraction splint in position. At day 2, 4, 6 and 8, thermography recording save the CWT values: before removing the dressing, after removing the dressing and after applying a new dressing. Photographic assessment was carried out at the same time. At day 10, only temperature and photographic measurements were performed, no new dressing and splint were applied. At day 16, blood and skin biopsy over the wound area were sampled. For histological analysis of wound healing phases, 2 mice per group were sacrificed at day 4 and day 10.

(2) chronic wound model: 5 weeks-old, fasting male C57BL/6j mice (Janvier Labs, France), were injected with an intraperitoneal bolus of streptozotocin (S0130, Abcam) at 180 mg/kg in citrate buffer (pH 4.5). 48 hours later, the mouse glycaemia increases to 300 mg/dL if type 1 diabetes was induced. Insulin was intramuscular injected twice every week. 4 weeks later, mouse back was gently shaved. The following day, one skin biopsy from each mouse under anesthesia (3% Isoflurane) was sampled, using a biopsy punch Ø8mm. Photographic assessment of the excisional wound was performed with magnifier Leica M60 and IC80D. Thermic camera Cedip W infrared (Titanium 640x512 pixels) was calibrated with a black body then used to record cutaneous wound temperature (CWT) for 2 min sequences (1 frame/sec). Dressings were applied directly on contact with the wound bed. Surgical KwikSill© glue kept the dressing and the anti-contraction splint in position. At day 2, 5 and 9, thermography recording save CWT values: before removing the dressing, after removing the dressing and after applying a new dressing. Photographic assessment was carried out at the same time. At day 12, only temperature and photographic measurements were performed, no new dressing and splint were applied. At day 21, blood and skin biopsy over the wound area were sampled.

The recording on the thermic camera were analyzed by using Altair (ver. 5.91.010, FLIR Systems™), Matlab® (ver.2014b, MathWorks) and Prism (ver. 7.0, GraphPad). Photographic measurement of the wound perimeter was repeated three times, using ImageJ (ver.1.48v, Wayne Rasband). All analyzes were blinded.

Histological assessment

Skin biopsies were fixed in PFA% overnight than washed with PBS and incubated in glucose washes before inclusion in Tissue Tek© OCT, and congelation in isopentane cooled down with liquid nitrogen¹.

Seven µm transverse sections of skin and subcutaneous tissue were cut using a cryostat. Tissue sections were stained with hematoxylin, eosin and saffron. Slides were examined with an optical microscope (Leica DM2000) and a camera (Leica DFC420C), using the acquisition data software LAS (ver. 4.2). Re-epithelialization was quantified using ImageJ (ver. 1.52g, Wayne Rasband), each histological picture was segmented into 10 pictures of the same size. Epidermis thickness was measured in each segmented picture. The average of at least 30 measurements was computed as the epidermis thickness for one sample.

Blood analysis

Serum from mouse blood was retrieved after 10 min, 2000 g centrifugation then store at -80°C . CRP (Mouse CRP assay ref MCRP00, R&D Systems®) and CK (Creatinine assay ref 65340, Abcam®) were measured by ELISA kits as per manufacturer's instruction.

Statistical analysis

Statistical analyses were realized with Prism (ver. 7.0, GraphPad). Data are presented as mean \pm standard error of mean. When appropriate, one-way ANNOVA was used to compare mice groups with correction for multiple comparison. To analyze the temperature mean variation, a two-way ANNOVA was used with a Bonferroni correction for multiple comparisons. Significance was fixed at p value < 0.05

Results

1. Histological and temperature changes in acute wound model

Graphene healing enhancement had been reported through the antibacterial effect of the material. For our experiment, we checked the presence of bacteria on the intact skin of one C57BL6/J mouse and on the wound area of a SHAM mouse. Detection of bacteria on either the intact skin or wound was very low. Few streptococcus (sciuri and xylosus) and with some samples: bacillus and enterococcus faecalis were detected after seeding in supplemented medium up to 3 days (data not shown). Therefore, we conclude that the bacteria population is very low on our laboratory mice so any graphene effect is not due to its antibacterial properties.

Graphene mono-layer dressing was applied on an excision wound model of C57BL6/J mice for 10 days with a dressing change every 2 days. No significant macroscopic change of wound healing was recorded during the 16 days of follow up (figure 1a) and wound closure was not different between the groups (at D2 $p=0.55$, $n=10$, figure 1d). Histological assessment gave attention to some early changes at D4. There was necrotic and inflammatory tissue closer to the skin and inflammatory and vascularized matrix nearer the muscle in SHAM group while the wound with graphene dressing is characterized by a thick and non-organized neo-epidermis and a subjacent underdeveloped matrix with presence of macrophages and polynuclears cells (figure 1b). As the wound progress, at D10, SHAM biopsies just started the re-epithelialization process and granulation tissue develop underneath. The new blood vessels are slightly dilated. In graphene biopsies however re-epithelialization is nearly done. The subjacent matrix is hyper vascularized but still present inflammatory cells. The final dressings are removed at D10 and subsequently there was no histological difference in wound healing between the two groups at D16. The re-epithelialization is completed with a differentiated, organized, layered neo-epidermis (figure 1b) and there is no difference of the epidermis thickness at D16 (figure 1c).

According to literature, temperature is an important factor during healing¹⁵⁻¹⁷ and thermography is already know as a reliable and valid tool to evaluate burns^{30,31}. The mean temperature of the wound area and perilesional skin (3284 pixels) was measured every second during 4 minutes. During the first 2 minutes, the wound was covered by the dressing then, on camera, the dressing was remove and the temperature at the wound area decreases. We addressed how cutaneous wound temperature (CWT) changes throughout healing. Using 2way ANOVA (Bonferroni post-hoc), there was a significant variation of the dressing ($p<0.001$, $n\geq 8$). In normal healing of SHAM group, the CWT variation moderately decreases after creation of the wound (D2) and then linearly increase during wound healing. With the graphene dressing, the CPW increases compared to the SHAM at D4, D8 and D10 and is significantly improved at D6 ($p=0.011$, $n=8$) (figure 1e and figure S1a-e).

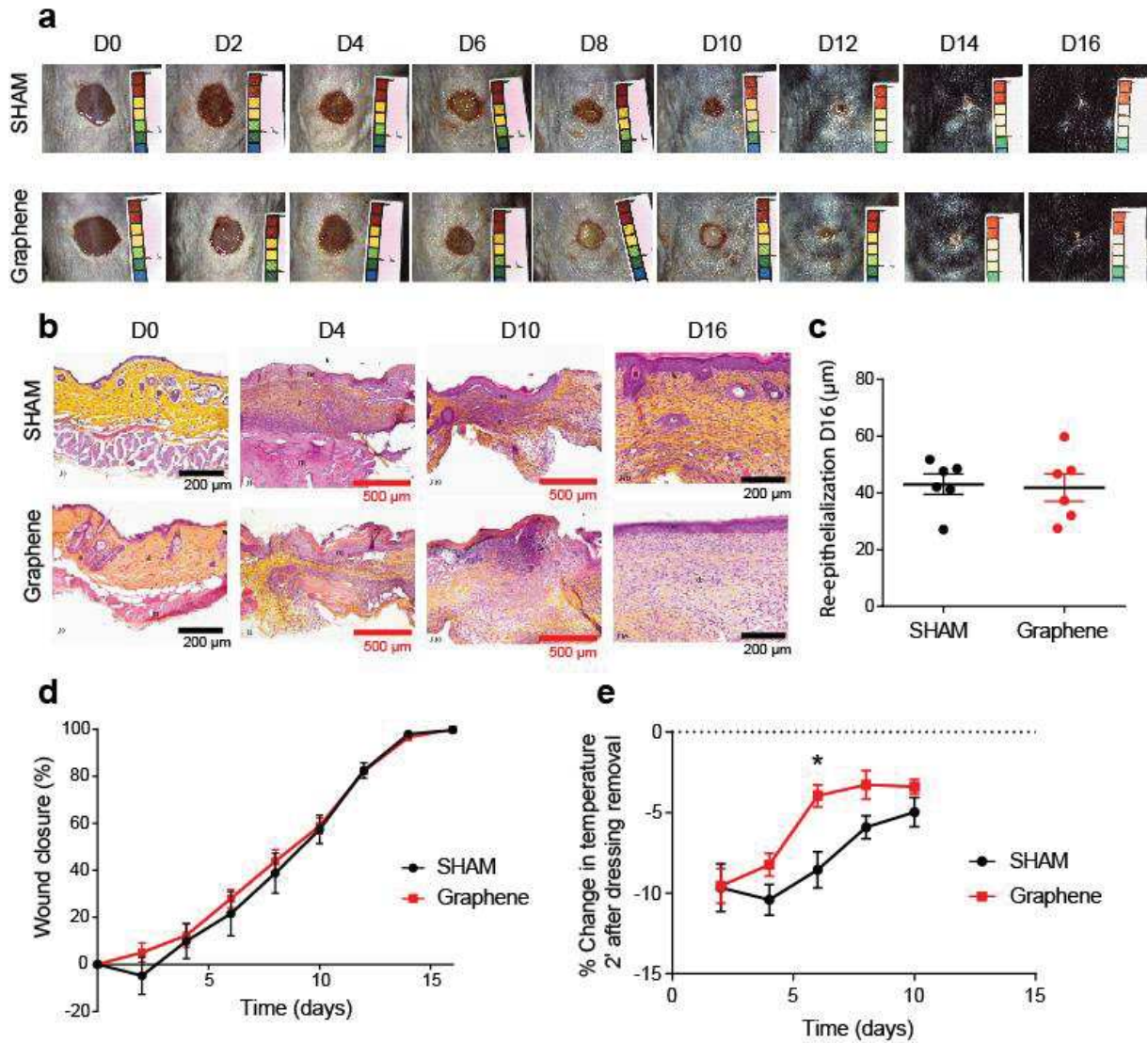


Fig.1 Early boost of healing on acute model wearing graphene dressing (a) Representative photographs of the wound evolution for SHAM and graphene. (b) Representative hematoxylin eosin saffron (HES) at day 0, day 4, day 10 and day 21 after wound excision. At D4 (n=2/gp), neo-epithelialization of the wound dressed with graphene progress faster. There was less granulating tissue and more differentiated cells in Graphene group. The phase at D10 (n=2/gp) and D16 (n=6/gp) between the 2 groups does not differ. Scale black bar: 200 μ m and scale red bar: 500 μ m. (c) Dot plot of the re-epithelialization (epidermis thickness) at D16, n=6/gp. (d) Quantification of wound percentage closure (as wound area of the day/wound at D0) through time. (e) Quantification of the change of normalized surface skin temperature of the mice between wrapped in the dressing and after dressing removal. Maximum temperature is normalized as 100%. All data are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs SHAM

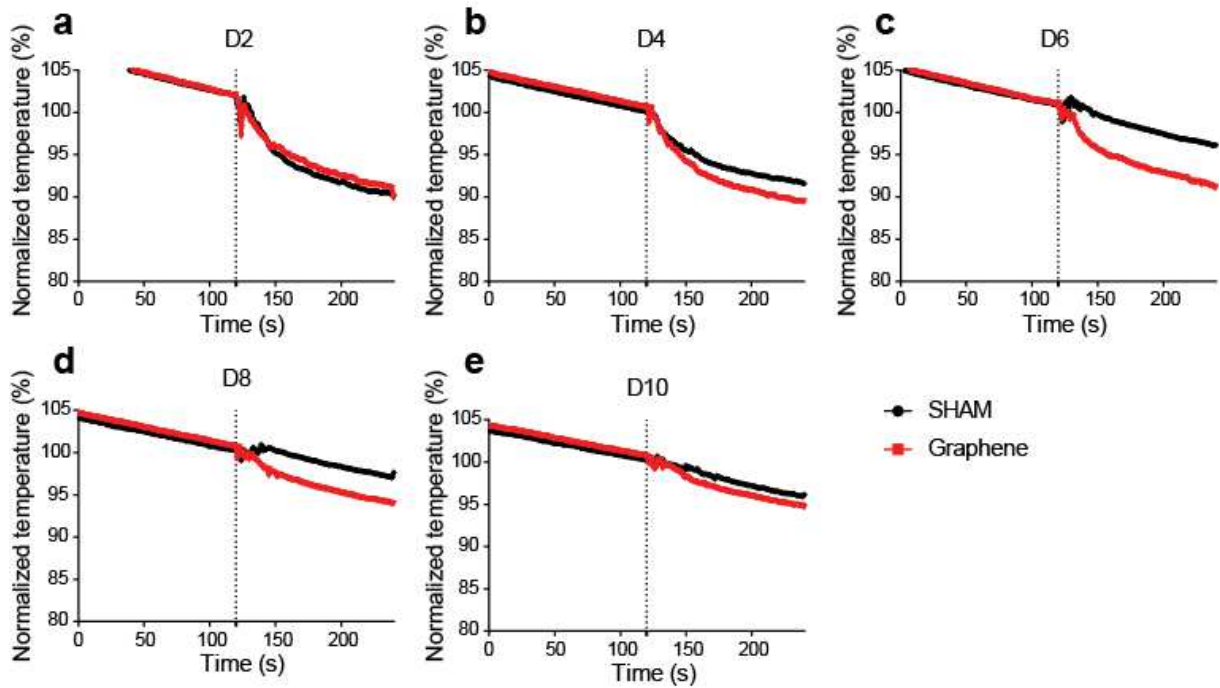


Fig.S1 Graphene dressing reduces the temperature at the wound area on acute wound model Quantification of the change of normalized surface skin temperature of the mice between wrapped in the dressing and after dressing removal, at each day. Maximum temperature is normalized as 100%. (a) day 2, (b) day 4, (c) day 6, (d) day 8, (e) day 10. The temperature before the vertical dot line is the temperature with the dressing in place and the slight variations at 120 s is the moment of the dressing removal. All data are shown as mean only. $*p < 0.05$ vs SHAM

Cutaneous temperature change is correlated to change with arterial stenosis³² and can detect acute limb ischemia³³. Thermography measurement is supposed to record the hypervascularity resulting from tumor. As such, cancer diagnostic is also possible with this technology and a difference of 1-2°C is considered suspicious of breast tumor³⁴⁻³⁶. Standard variation of the temperature during the first 120 seconds after dressing removal was therefore used as an indication of the wound bed vascularization (figure S2a). No significant difference was detected between the dressings but a 2 fold decrease was measured between day 4 and day 6 for wound covered by graphene (figure S2b).

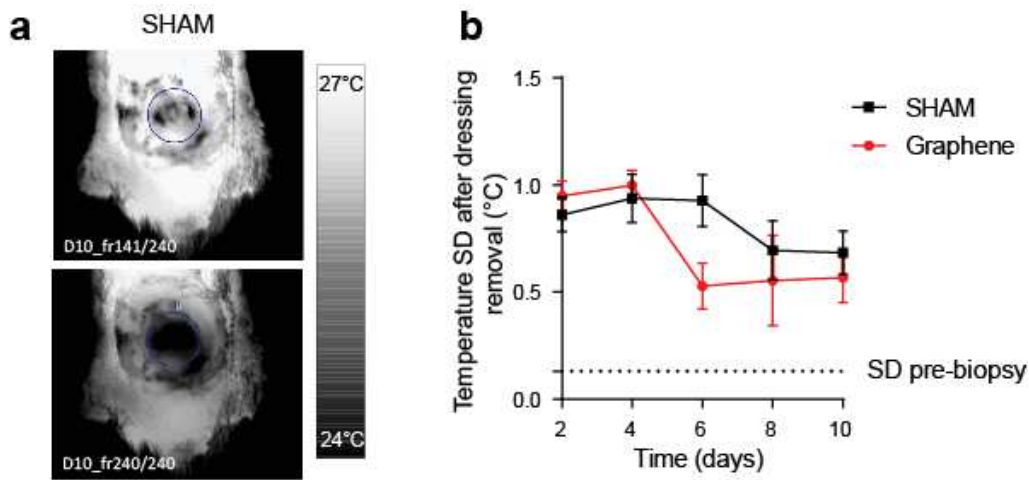


Fig.S2 Possible reduction of temperature variation at the wound area on acute wound model with graphene

(a) Representative thermographic picture of the dorsal area of the mouse just after the dressing removal (10 sec after for the top left picture) and 100 s later (bottom left picture) at day 10 on a SHAM mouse. The blue circle locates the wound area. (b) Quantification of the temperature standard deviation at the wound area after dressing removal, at each day. The horizontal dot line is the standard deviation of the skin temperature before creating the wound (pre-biopsy). All data are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs SHAM

Graphene oxide (GO) is a derivate of graphene. It has been reported as a trigger for toxic events inducing bacterial killing but also cellular damage³⁷⁻³⁹. For the peculiar graphene used as dressing however, no change of C-reactive protein (CRP) or creatine kinase (CK) was detected between SHAM and graphene mouse after 10 days of dressing wear (figure S3 a-b).

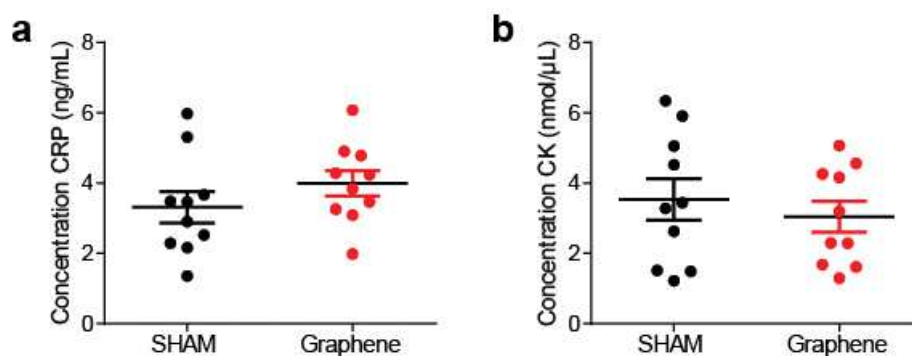


Fig.S3 No cytotoxicity of graphene dressing on the acute wound model (a) Dot plot of the CRP serum concentration of the SHAM and Graphene group, (b) Dot plot of the Creatinine kinase (CK) serum concentration of the SHAM and Graphene group. All data are shown as mean \pm SEM, $n \geq 10$ animals/group. * $p < 0.05$ vs SHAM

2. Increase of wound closure and CWT measurements show improve wound healing in chronic model while using graphene dressing

Diabetic mice model induced by streptozotocine single injection is a well described model of chronic wound¹⁸⁻²⁰. The purpose of a chronic model was to understand if the graphene dressing properties still enhanced a pathological situation where oxidative stress and vascularization are impaired. A graphene mono-layer dressing was applied to an excision wound model of C57BL6/J diabetic mice for 12 days with a dressing change adapted to the wound exudate volume (D2, D5, D9 and D12). Photographic wound assessment indicated a visual reduction of the wound beginning at D5 until dressing final removal at D12 (figure 2a). Quantification of the wound area revealed a decrease at D5 ($p=0.067$, $n=10$) and D9 ($p > 0.05$, $n=10$) from mice with graphene dressing compared to without (figure 2d). At D12, the shift between the groups decrease to end at the same closure rate at D21. Skin biopsies histological assessment at D0 and D21 does not reveal major difference between the 2 groups. The samples are all in early remodeling phase with the presence of granulation tissue characteristics: hyper cellularity, major neo-vascularization, and constant inflammatory response (figure 2b). There is no difference in skin thickness at day 21 (figure 2c). Regarding CWT, there was a significant variation depending of the dressing used ($p=0.03$, $n\geq 6$). For mice without graphene, CWT variation decreases linearly throughout the first 9 days of healing and reaches a plateau at D9. Compared to SHAM, on mice wearing graphene, CWT changes less at all time points (at D2 $p=0.54$, $n\geq 8$ and at D9 $p < 0.05$, $n\geq 6$, figure 2c and figure S4a-d).

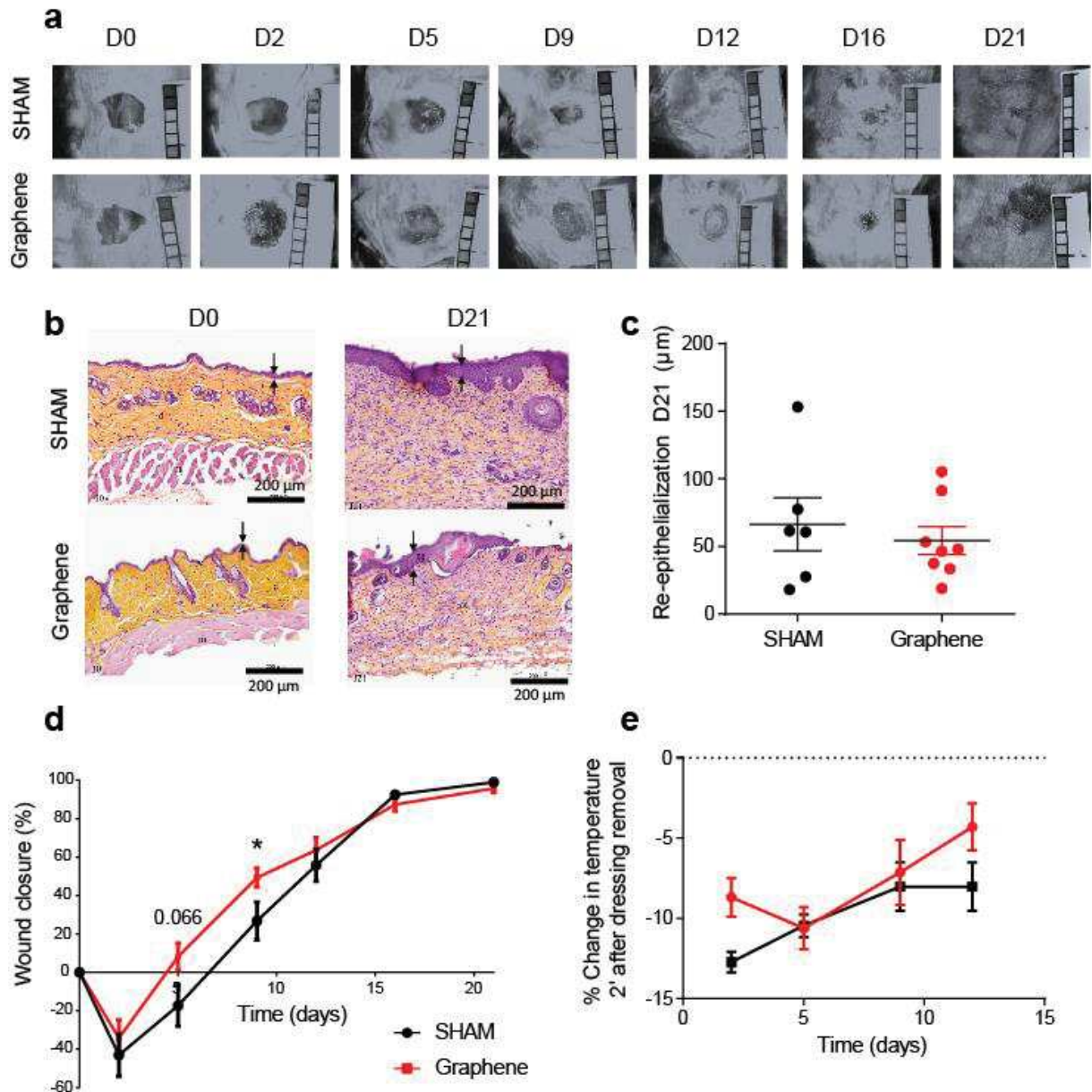


Fig.2 Graphene accelerates early phase of healing on a chronic wound model (a) Representative photographs of the wound evolution for SHAM and graphene. (b) Representative hematoxylin eosin saffron (HES) at day 0, 4, 10, and 16 after wound excision. Neo-epithelialization was progressing at the same rate at day 21. Scale black bar: 200 µm and scale red bar: 100 µm. (c) Dot plot of the re-epithelialization (epidermis thickness) at D21, $n \geq 6$ /gp (d) Quantification of wound percentage closure (as wound area of the day/wound at D0) through time. (e) Quantification of the change of normalized surface skin temperature of the mice between wrapped in the dressing and after dressing removal. Maximum temperature is normalized as 100%. All data are shown as mean \pm SEM, $n \geq 7$ animals/group. * $p < 0.05$ vs SHAM

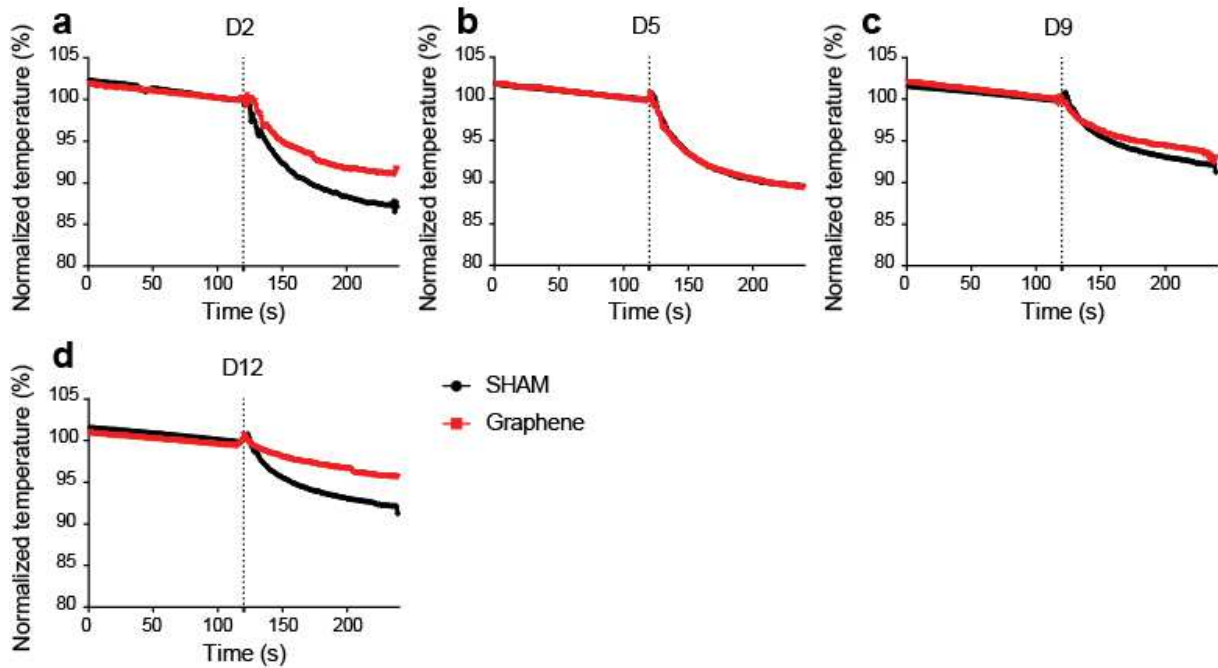


Fig.S4 Graphene dressing increases the temperature at the wound area on a chronic wound model
 Quantification of the change of normalized surface skin temperature of the mice between wrapped in the dressing and after dressing removal, at each day. Maximum temperature is normalized as 100%. (a) day 2, (b) day 5, (c) day 9, (d) day 12. The temperature before the vertical dot line is the temperature with the dressing in place and the slight variations at 120 s is the moment of the dressing removal. All data are shown as mean only

The thermal diffusion of the mice at the wound area after dressing removal is not different between the 2 groups and does not vary with the wound healing (figure S5 a-b).

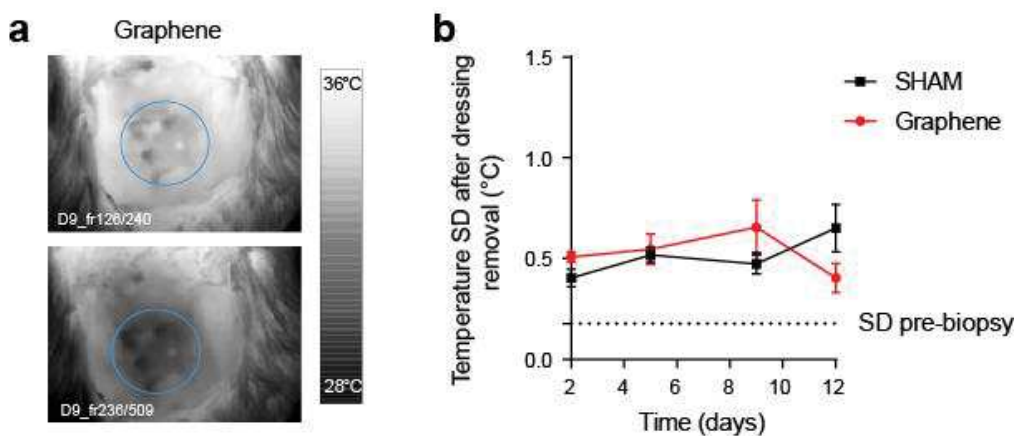


Fig.S5 No temperature variation at the wound area on chronic wound model between dressings (a)
 Representative thermographic picture of the dorsal area of the mouse just after the dressing removal (10 sec after

for the top left picture) and 110 s later (bottom left picture) at day 9 on a graphene mouse. The blue circle locates the wound area. (b) Quantification of the temperature standard deviation at the wound area after dressing removal, at each day. The horizontal dot line is the standard deviation of the skin temperature before creating the wound (pre-biopsy). All data are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs SHAM

Discussion

We investigate the potential of graphene dressing as a wound healing enhancer. The purpose of graphene and GO have been recently investigated in several animal models of wound healing²¹⁻²⁴. Graphene can be coupled with an infinity of material and each one will change its structure and mechanical and biocompatible properties. The particular assembly of graphene used in this work was provided by Néel institute, Grenoble. It was produced by an original patented²⁵ pulsed chemical vapor deposition method on a copper foil. Then a protective polymer was laid on top of the single graphene layer, copper foil first then polymer were chemically destroyed to recover the graphene on a parylene substrate. Graphene and parylene only (SHAM) dressings were cut specifically to cover the whole cutaneous lesion and we ensured direct physical contact between graphene layer and wound bed. We proved that this specific graphene dressing does not induce a systemic inflammation in a healthy mouse. CRP and CK levels, two main proteins involved in a general inflammation response and cell lysis do not differ, up to 10 days in contact with graphene, compared to SHAM levels.

In our acute model, we evaluated how graphene affect the wound healing kinetic. No difference was found regarding the percentage of wound closure between graphene and SHAM. However, at time points D4 and D10, histological assessment show advanced wound healing phase in graphene mice. The neo-epidermis is present in graphene wound bed indicating the beginning of proliferation stage whereas SHAM skin biopsy is still in the inflammatory phase with necrotic and inflammatory tissue. At day 10, remodeling is properly started in the graphene group with a nearly completed re-epithelialization. Histological assessment tend to show that the wound in contact with graphene have a shorter inflammation phase between D0 and D4 compared to SHAM. New experiments are needed to increase the number of animals for statistical assessment of the epidermis thickness at day 4 and 10. During investigations of thermography as a diagnostic tool for cancer detection, cutaneous change were associated to an inflammatory response and not to the hypervascularity of the tumor induced angiogenesis⁷. In our model, CWT decreases with graphene from day 4 to day 8. The variation with SHAM group is maximal at day 6 and is consistent with a decrease of the inflammatory reaction, also supported by the decrease of the thermal

diffusion. An early downregulation of the inflammation response mean that the wound healing is progressive faster on mouse with graphene.

For our chronic wound, simulated by diabetes mellitus type 1, induced by streptozotocine, there was a reduction of the wound visible at day 5 and day 9. Those time points, again reflect a quicker healing process through the reduction of the inflammatory phase. Thermography results reported a decrease of the mean cutaneous temperature with graphene compared to SHAM (mean difference of 4% at day 2, null at day 5, 1% at day 9 and 3.7% at day 12). Thermal diffusion varies less than 0.3°C between the 2 dressings. As diabetes induced impairment of the redox and the vascularization system, CWT measurement may be less adapted. Macrophages staining on histological slides or immunohistochemistry could be used to quantify the inflammatory response and offer a clear parallel with the decrease of temperature variation.

As mentioned, the different components bound to the graphene make comparisons not advisable. Moreover, animal models reported are not using splints in their *in-vivo* wound healing model. Therefore, the lesion will be closed by primary healing: in rodents the skin contraction will close the wound without creation of granulating tissue as in human models⁷ shortening the time needed until wound closure^{22,26}.

The antibacterial properties of the graphene are hardly tested while using experimental models in laboratory animal facility. Our animals have a very limited cutaneous microbiota due to their special handling and environment unless a bacteria was specifically introduced (data not shown). Therefore, increased wound healing through anti-bacterial performance seems unlikely in our models. A collaborative team show *in vitro* that migration of fibroblasts are not heighten with the use of this particular graphene. Therefore, we hypothesized that the graphene may act as an electrical, conductive network, connecting the cells and stimulating their growth, reducing the inflammation phase duration, as it has been previously demonstrated with neuronal cells²⁷⁻²⁹.

Conclusion

Photographic wound assessment paired with histological analysis of skin and subcutaneous tissue show an enhanced healing in acute and chronic models with the use of a single layer of graphene dressing. We introduced the use of CWT variation as a non-invasive measurement of wound healing. Application of graphene dressing lessens the variation of temperature at the wound site during dressing removing suggesting that the CWT is more stable with graphene. As the skin temperature is closely related to the blood flow underneath and inflammation

process, our data strongly suggest that graphene improve early vascularization of the wound or shorten the inflammation phase. That hypothesis is furthermore supported by the results of the histological assessment in the acute model. Moreover, reduction of the inflammation phase may illustrate a graphene conductive scaffold property.

Conflict of interest

Vincent Bouchiat is a project leader of GRAPHEAL startup at Linksium wich is focusing on the biomedical applications of graphene.

Acknowledgements

Thanks to Yann Dumont and Sylvain Godreuil for their help screening the mouse skin flora.

1. Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat Protoc* 2013;**8**:302–309.
2. Lu B, Li T, Zhao H, Li X, Gao C, Zhang S *et al.* Graphene-based composite materials beneficial to wound healing. *Nanoscale* 2012;**4**:2978–2982.
3. Heo C, Yoo J, Lee S, Jo A, Jung S, Yoo H *et al.* The control of neural cell-to-cell interactions through non-contact electrical field stimulation using graphene electrodes. *Biomaterials* 2011;**32**:19–27.
4. Pattnaik S, Swain K, Lin Z. Graphene and -based nanocomposites: biomedical applications and biosafety. *J Mater Chem B* 2016;**4**:7813–7831.
5. Kumar S, Chatterjee K. Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;**8**:26431–26457.
6. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. *BioMed Res. Int.* 2011 doi:10.1155/2011/969618.
7. Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci* 2018;**90**:3–12.
8. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care* 2015;**4**:560–582.
9. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther* 2017;**34**:599–610.
10. Shi H, Xie H, Zhao Y, Lin C, Cui F, Pan Y *et al.* Myoprotective effects of bFGF on skeletal muscle injury in pressure-related deep tissue injury in rats. *Burns Trauma* 2016;**4**:26.
11. Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R *et al.* Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;**296**:C1248–1257.
12. Falanga V, Zhou L, Yufit T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J Cell Physiol* 2002;**191**:42–50.
13. Dow G, Browne A, Sibbald RG. Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. *Ostomy Wound Manage* 1999;**45**:23–27, 29–40; quiz 41–42.
14. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010;**28**:519–526.
15. McGuinness W, Vella E, Harrison D. Influence of dressing changes on wound temperature. *J Wound Care* 2004;**13**:383–385.
16. Kliot DA, Birnbaum SJ. Thermographic studies of wound healing. *Am J Obstet Gynecol* 1965;**93**:515–521.
17. Nakagami G, Sanada H, Iizaka S, Kadono T, Higashino T, Koyanagi H *et al.* Predicting delayed pressure ulcer healing using thermography: a prospective cohort study. *J Wound Care* 2010;**19**:465–472.
18. Sigauco-Roussel D, Demiot C, Fromy B, Koïtka A, Lefthériotis 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**:1564–1569.
19. Yu CO-L, Leung K-S, Fung K-P, Lam FF-Y, Ng ES-K, Lau K-M *et al.* The characterization of a full-thickness excision open foot wound model in n5-streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetic rats that mimics diabetic foot ulcer in terms of reduced blood circulation, higher C-reactive protein, elevated inflammation, and reduced cell proliferation. *Exp Anim* 2017;**66**:259–269.
20. Cheng K-Y, Lin Z-H, Cheng Y-P, Chiu H-Y, Yeh N-L, Wu T-K *et al.* Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet. *Sci Rep* 2018;**8**:12214.
21. Kawamoto K, Miyaji H, Nishida E, Miyata S, Kato A, Tateyama A *et al.* Characterization and evaluation of graphene oxide scaffold for periodontal wound healing of class II furcation defects in dog. *Int J Nanomedicine* 2018;**13**:2365–2376.
22. Li Y, Liu X, Tan L, Cui Z, Yang X, Zheng Y *et al.* Rapid Sterilization and Accelerated Wound Healing Using Zn²⁺ and Graphene Oxide Modified g-C₃N₄ under Dual Light Irradiation. *Adv Funct Mater* 2018;**28**:1800299.
23. Senthil R, Berly R, Bhargavi Ram T, Gobi N. Electrospun poly(vinyl) alcohol/collagen nanofibrous scaffold hybridized by graphene oxide for accelerated wound healing. *Int J Artif Organs* 2018;**41**:467–473.
24. Chu J, Shi P, Yan W, Fu J, Yang Z, He C *et al.* PEGylated graphene oxide-mediated quercetin-modified collagen hybrid scaffold for enhancement of MSCs differentiation potential and diabetic wound healing. *Nanoscale* 2018;**10**:9547–9560.
25. Bouchiat V, Coraux J, Han Z. Process and device for forming a graphene layer. 2014 <https://patents.google.com/patent/US20140326700/en>. Accessed 24 September 2018.
26. Fan Z, Liu B, Wang J, Zhang S, Lin Q, Gong P *et al.* A Novel Wound Dressing Based on Ag/Graphene Polymer Hydrogel: Effectively Kill Bacteria and Accelerate Wound Healing. *Adv Funct Mater* 2014;**24**:3933–3943.
27. Tang M, Song Q, Li N, Jiang Z, Huang R, Cheng G. Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films. *Biomaterials* 2013;**34**:6402–6411.

28. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L *et al.* Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci Rep* 2013;**3**:1604.
29. Barg S, Perez FM, Ni N, Pereira P do V, Maher RC, Garcia-Tuñón E *et al.* Mesoscale assembly of chemically modified graphene into complex cellular networks. *Nat Commun* 2014;**5**:4328.
30. Jaspers MEH, Maltha I, Klaessens JHGM, de Vet HCW, Verdaasdonk RM, van Zuijlen PPM. Insights into the use of thermography to assess burn wound healing potential: a reliable and valid technique when compared to laser Doppler imaging. *J Biomed Opt* 2016;**21**:96006.
31. Prindeze NJ, Fathi P, Mino MJ, Mauskar NA, Travis TE, Paul DW *et al.* Examination of the Early Diagnostic Applicability of Active Dynamic Thermography for Burn Wound Depth Assessment and Concept Analysis. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc* 2015;**36**:626–635.
32. Huang C-L, Wu Y-W, Hwang C-L, Jong Y-S, Chao C-L, Chen W-J *et al.* The application of infrared thermography in evaluation of patients at high risk for lower extremity peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2011;**54**:1074–1080.
33. Peleki A, da Silva A. Novel Use of Smartphone-based Infrared Imaging in the Detection of Acute Limb Ischaemia. *EJVES Short Rep* 2016;**32**:1–3.
34. Garduño-Ramón MA, Vega-Mancilla SG, Morales-Henández LA, Osornio-Rios RA. Supportive Noninvasive Tool for the Diagnosis of Breast Cancer Using a Thermographic Camera as Sensor. *Sensors* 2017;**17**.
35. Hussain N, Connah D, Ugail H, Cooper PA, Falconer RA, Patterson LH *et al.* The use of thermographic imaging to evaluate therapeutic response in human tumour xenograft models. *Sci Rep* 2016;**6**:31136.
36. Xie W, McCahon P, Jakobsen K, Parish C. Evaluation of the ability of digital infrared imaging to detect vascular changes in experimental animal tumours. *Int J Cancer* 2004;**108**:790–794.
37. Zheng H, Ma R, Gao M, Tian X, Li Y-Q, Zeng L *et al.* Antibacterial applications of graphene oxides: structure-activity relationships, molecular initiating events and biosafety. *Sci Bull* 2018;**63**:133–142.
38. Aslam M, Ahmad MS, Ahmad MA. Application of Graphene, Graphene oxide and their derivatives as Wound healing: A Brief Review. *Adv Environ Biol* 2017;**11**:1–5.
39. Kawamoto K, Miyaji H, Nishida E, Miyata S, Kato A, Tateyama A *et al.* Characterization and evaluation of graphene oxide scaffold for periodontal wound healing of class II furcation defects in dog. *Int J Nanomedicine* 2018;**13**:2365–2376.

Discussion

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans une démarche de compréhension des mécanismes physiologiques du développement d'escarres. Les premiers ulcères de pression recensés ont été découverts sur des momies et sont datés de l'Égypte antique (Agrawal and Chauhan, 2012). La description de ces plaies apparaît ensuite continuellement dans l'Histoire, avec Hippocrate dans l'Antiquité qui nous laisse des écrits d'un cas d'escarre chez un patient paraplégique incontinent. Ambroise Paré, au 16^{ème} siècle traite un aristocrate français et introduit la décharge mécanique de la zone sacrée à l'aide de coussins (Levine, 1992). Nous savons aujourd'hui que les escarres apparaissent du fait d'une immobilité prolongée et de contraintes mécaniques appliquées entre les tissus mous et un plan dur (indenteur ou proéminence osseuse). La compréhension des mécanismes cellulaires en revanche est toujours floue, 4 hypothèses scientifiques sont étudiées et ont été décrites dans le premier chapitre de ce manuscrit. L'escarre est une pathologie lourde exacerbée chez le patient comorbide et qui ont des impacts sur la mortalité et la qualité de vie (Bauer et al., 2016). De plus, le développement d'escarre peut être évité dans la majorité des cas. Aussi, on considère aujourd'hui la prévention comme le meilleur « traitement » contre les escarres.

L'objectif de mon travail est d'identifier des mécanismes et/ou des voies de signalisation impliqués dans la genèse des escarres pour permettre une meilleure prise en charge des patients. Pour ce faire, nous avons mis en place une **étude transversale destinée à corrélérer les seuils de pression à des désordres biologiques du tissu musculaire.** Chez un nouveau modèle de **souris non-anesthésié**, nous avons étudié **l'effet d'une compression de 100 mmHg pendant 2 heures.** Chez des **patients paraplégiques, porteurs d'escarre**, nous avons **comparé le niveau d'atteinte des lésions musculaires sous la lésion médullaire** avec une zone innervée et une zone proche de l'escarre.

Chez la souris, nos travaux ont montrés qu'une compression de 100 mmHg appliquée pendant 2 heures sur animal vigile entraîne une lésion du muscle sous-jacent. L'homéostasie calcique est impactée, le récepteur de la Ryanodine de type 1 a une probabilité d'ouverture pathologique, qui entraîne une fuite de calcium depuis le stock du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol de la cellule. Nous rapportons des modifications post-traductionnelles sur le RyR1 (nitrosylation et oxydation) ainsi que la perte de liaison avec la protéine chaperonne calstabin1.

Des modifications similaires ont été décrites dans d'autres pathologies. Notamment, la fonction contractile est impactée avec l'âge (Andersson et al., 2011) et la perte de fonction musculaire (Matecki et al., 2016). Le remodelage du RyR et sa dysfonction sont associés à un stress oxydant que nous avons détecté sur notre modèle murin avec une augmentation de l'expression des protéines carboxylées. Plus récemment, l'activation de la voie adrénérgique est également avancée comme hypothèse entraînant des modifications post-traductionnelles du RyR (Matecki et al 2016, Andersson and Marks,

2010; Reiken et al., 2003). Le système nerveux sympathique est activé en cas de stress, les catécholamines se lient alors aux récepteurs β -adrénergiques et via une augmentation intracellulaire du messager secondaire cAMP (adénosine monophosphate cyclique) qui active la protéine kinase A (PKA). La phosphorylation PKA dépendante du RyR1 a été décrite comme entraînant une fuite calcique et une dissociation de la calstabin1. Nos résultats préliminaires de l'étude clinique, en cours, soutiennent ces résultats avec une augmentation significative de la phosphorylation du RyR sur les biopsies musculaires des muscles non-innervés. D'autre part, il est extrêmement intéressant de souligner que plusieurs auteurs rapportent une augmentation significative de l'incidence des escarres en cas de traitement des patients avec des vasopresseurs, un traitement qui permet d'augmenter la pression artérielle via une sensibilisation au catécholamines des adrénorécepteurs (Alderden et al., 2011; Cox and Roche, 2015; Frankel et al., 2007).

En plus d'un remodelage du RyR1, nous rapportons, sur notre modèle murin, une augmentation du clivage de la caspase 8, une caspase initiatrice de l'apoptose sans changement de la caspase effectrice 3 ou de dérèglement de la fonction mitochondriale. Ces altérations précoces peuvent être mise en relation avec les résultats d'un modèle d'IR cardiaque de notre équipe (Fauconnier et al., 2011) qui décrit une activation de TNF- α et de la caspase 8 sur des souris soumises à une ischémie reperfusion qui induit une augmentation de la nitrosylation du RyR2 avec une perte de la liaison calstabin2 (isoforme cardiaque FKBP12.6) et une fuite calcique. De la même manière, mais cette fois sur un modèle d'ischémie isolée sur un muscle squelettique, une compression de 100 mmHg et de 50 mmHg de 2 heures induit une augmentation du clivage de la caspase 8. De plus, l'inhibition de caspases a été identifiée comme bénéfique en terme de prévention des escarres profondes sur un modèle murin (Teng et al., 2011b). A la différence de cette étude, nous ne détectons pas de régulation positive de TNF- α dans le sérum de nos souris, qui peut être liée à la méthode de détection choisie (kit Milliplex) ou au fait que nous n'ayons pas ciblé la fenêtre temporelle d'augmentation du récepteur (Oliver et al., 1993).

Les résultats de notre première étude sur la souris montrent également que l'ischémie isolée semble plus délétère que la reperfusion sur notre modèle. En effet, à 3 jours post compression, la probabilité d'ouverture du canal calcique est similaire à celle mesurée directement après la compression. Concernant les modifications des protéines liées à la mort cellulaire, nous notons une augmentation du clivage de la calpaine 3 et une tendance à la hausse du clivage d'ATF6, deux protéines associées au stress du RS.

Si nous mettons en relation, les mécanismes décrits dans le chapitre 1 de ce manuscrit, nous pouvons faire le parallèle entre l'augmentation du stress oxydant mesuré dans notre modèle animal et une

activation de la voie MAPK (Son et al., 2011, 2013) selon une voie de signalisation encore mal définie. Une compression mécanique à 100 mmHg pourrait donc soit engendrer une déformation mécanique auprès des mécanosenseurs cellulaires ou l'hydrogène peroxyde en réponse à la reperfusion pourrait exacerber les lésions musculaires. La première hypothèse semble plus plausible dans notre modèle en regard des différences entre ischémie isolée et reperfusion.

La pertinence de notre étude est également liée à l'utilisation d'une compression sur un animal vigile, contrairement à d'autres modèles décrits (Salcido et al., 2007). Aussi, certaines augmentations de facteurs nécrotiques et apoptotiques décrits dans la littérature (Cui et al., 2016; Sin et al., 2013) à la suite d'un cycle de reperfusion ont pu être exacerbées dû à l'utilisation d'anesthésiques (Sloan et al., 2011; Feng et al., 2013; Shekarforoush et al., 2016).

Le modèle murin créé dans le cadre de ces travaux de thèse est spécifique à une réalité clinique : les patients identifiés à risque de développement d'escarre sont mobilisés toutes les 2-3 heures (Gillespie et al., 2014). Ces protocoles sont chronophages dans la pratique clinique, douloureux pour un patient algique et traumatisant pour le patient et le personnel soignant qui, à défaut de dispositifs médicaux adaptés, doit parfois déplacer le corps d'un patient difficilement mobilisable (Latimer et al., 2015) au risque de se blesser (Pompeii et al., 2009; Weiner et al., 2015). La fréquence de mobilisation du patient est donc importante pour le patient et son équipe médicale et nous nous sommes proposés d'étudier les altérations musculaires dans les 3 premières heures d'alitement pour affiner cette fréquence et éviter les mobilisations inutiles. Les pressions d'interface entre le corps d'un patient et un matelas thérapeutique anti-escarre ont été mesurées. Toute l'étude a été réalisée avec le même modèle de matelas alterné, constitué de coussins d'air de la largeur du matelas qui se gonflent et se dégonflent sur des cycles d'environ 4 minutes. Le poids du patient est à tout moment supporté par la moitié des coussins gonflé à haute pression, ce qui permet une charge et décharge des points d'appui (Le Gall et al., 2017).

Dans notre étude, l'ordre de grandeur des pressions mesurée varie en fonction du patient et de la zone anatomique similairement à ce qui est retrouvé dans la littérature (Lachenbruch et al., 2015; Peterson et al., 2013; Swain, 2005). Sur la zone à risque au niveau du sacrum, les dispositifs médicaux permettent de descendre à une pression moyenne, au début de l'alitement, de 27 mmHg (7-73 mmHg) et une valeur pic de 58 mmHg (9-127 mmHg). Aussi pour étudier un cas normal et un cas à risque, nous avons choisi d'étudier 50 et 100 mmHg dans notre modèle murin de compression. Les intensités de compression varient énormément entre les modèles expérimentaux d'escarre et les valeurs que nous avons retenues sont considérées des pressions faibles. A titre de comparaison, les pressions moyennes

et pic s'exerçant entre une chaise de bureau et nos ischions sont de l'ordre de 50 et 150 mmHg respectivement (Vos et al., 2006).

Les résultats préliminaires de l'étude clinique (21 patients recrutés/48 prévus) rapportent une diminution significative des paramètres associés à la micro-vascularisation locale sous la lésion médullaire. L'ischémie des zones distales chez le patient paraplégique est peu documentée (Hagisawa et al., 1994; Scelsi, 2001) mais les conséquences de l'atrophie musculaire peuvent être logiquement prises en compte (Borisov et al., 2000). Le nombre des capillaires sanguins est diminué de près de 88% après 7 mois de dénervation. Aussi la baisse du nombre d'hématies et la diminution du ratio du flux sur la pression artérielle est en phase avec la littérature. En conséquence, une hypoxie tissulaire est installée au niveau des muscles jambiers chez nos patients.

Pour la première fois, nous avons montré une dérégulation du récepteur de la Ryanodine dans les muscles squelettiques sous la lésion médullaire de patients paraplégiques. Une revue des dossiers des patients après augmentation du nombre d'inclus permettra de vérifier si cette altération est spécifique au type de paraplégie (spastique ou flasque). On peut supposer que la paraplégie spastique prévient en partie la dénervation et l'atrophie consécutive (Farah et al., 1997).

L'objectif primaire de notre étude clinique est de corrélérer l'intensité de pression appliquée à une zone à risque d'escarre (muscle non-innervé) à une altération post-translationnelle du RyR1. Nos résultats préliminaires rapportent une corrélation significative entre la pression (moyenne et pic) au niveau de la zone non-innervée et la dissociation de la calstabin1 par rapport au RyR1. Aussi plus la pression augmente, plus la perte de la protéine chaperonne sera majeure avec des conséquences sur l'homéostasie calcique documentées dans notre étude animale. Une deuxième corrélation non-significative peut être mentionnée ($p=0.0561$) entre pressions moyennes et oxydation du RyR1. Cette tendance rejoint les résultats de notre modèle murin. En effet, le stress oxydant intracellulaire semble augmenter avec la pression puisque nous n'avons pas de variation de l'expression des protéines carboxylées à 50 mmHg mais une augmentation significative pour 100 mmHg. Deux autres études expérimentales chez le rat décrivent une augmentation du stress oxydant sur des modèles d'escarre (Grisotto et al., 2000; Sin et al., 2013). Il est pour autant intéressant de noter l'expression de protéines impliquées dans le stress oxydant (SOD1/2, 4HNE) n'est pas modifiée en fonction du nombre de cycles d'IR (Sin et al., 2013), la pression semble bien ici le paramètre qui conditionne la réponse tissulaire.

La découverte de l'implication du RyR dans les mécanismes physiopathologiques précoces des escarres ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, des drogues appelées rycal sont aujourd'hui en tests et ont pour but de stabiliser la relation entre la calstabin et le RyR pour prévenir la fuite calcique (détails dans le chapitre 1, sous partie couplage excitation-contraction). Nous avons

choisi d'administrer par voie sous cutanée via une pompe osmotique un traitement d'une semaine avec le S107, mais le traitement peut également être réalisé par gavage ou eau de boisson. La dose de 50mg/kg/jour délivrée en continu a permis lors de la compression de prévenir la dissociation de la calstabin dans le modèle d'ischémie isolée comme dans celui d'IR. Les rycals semblent donc une possibilité thérapeutique intéressante comme supplémentation préventive avant un épisode à haut de risque de développement d'escarre comme une chirurgie ou un long transport en ambulance ou en cas d'impossibilité de mobilisation du patient dans les services de soins intensifs ou de réanimation néonatale. Des études complémentaires *in vitro* sur des homogénats tissulaires ou des cellules primaires des patients de notre étude clinique apporteraient une preuve de concept formidable de l'utilisation de cette molécule dans la lutte contre les escarres.

En résumé, mes travaux de thèse ont permis d'apporter des précisions sur la physiologie des escarres et par conséquence de formuler les réflexions suivantes aux fabricants de dispositifs médicaux préventifs dans la lutte des escarres :

- (1) Toute surface doit minimiser les pressions moyennes et pic. La valeur historique de 32 mmHg n'est pas absolue et nous avons montrés qu'à des pressions d'interface inférieure à 30 mmHg une dissociation de la calstabin1 pouvait déjà subvenir (4/19) indiquant le risque de lésion musculaire profonde.
- (2) La recherche de biomarqueurs prédictifs du développement d'escarre doit se poursuivre. Nous avons mis en évidence, sur deux cohortes de patients paraplégiques, porteurs d'escarres de stade 3 ou 4, une élévation de la CRP, de la troponine T, du coefficient d'anisocytose, du volume plaquettaire et de l'activité du fibrogène et une diminution de l'hémoglobine et de l'hématocrite.
- (3) Le patient ne doit pas être laissé immobile plus de 2 heures. Une mobilisation des points d'appui est indispensable, quelle que soit la surface thérapeutique utilisée. Ces mobilisations sont difficiles à mettre en place correctement et généralement une partie de la zone sacrée n'est jamais déchargée en décubitus latéral ou dorsal (Peterson et al., 2013).
- (4) Les variations de pression du mode alterné des matelas utilisant de fortes pressions pour gonfler leurs coussins d'air créent un delta d'amplitude des pressions moyennes au cours du temps. Cette différence augmentent avec la période d'alitement et dans notre étude atteint 9 mmHg au maximum sur un cycle de gonflage/dégonflage de coussin (8 minutes). Des études complémentaires sont nécessaires pour établir si ces oscillations sont délétères aux muscles (Atkinson and Cullum, 2018; McInnes et al., 2015; Shi et al., 2018).

- (5) Nous n'avons pas identifié de corrélation entre les pressions d'interface au niveau du sacrum et l'IMC du patient. Une analyse complémentaire des données est en cours pour vérifier le lien avec d'autres zones anatomiques à risque d'escarre, comme les talons, l'occiput et les scapula. Pour la zone sacrée en revanche, l'intégration de système d'asservissement adaptant les pressions internes dans les coussins d'air devra tenir compte d'une détection morphologique du patient plutôt que de son IMC.
- (6) La problématique des brancards et des planches de transport pour les blessés médullaires doit être adressée (Hemmes et al., 2017). Si une compression de 2 heures à 100 mmHg est suffisante pour induire, chez un animal sain un déséquilibre calcique qui perdure jusqu'à au moins 3 jours, qu'en est-il d'une immobilité totale sur plusieurs heures à des pressions d'intensité très élevées ? Pour comparaison, avec un support thérapeutique alterné, 2 patients suivis présentaient des intensités de pression supérieures à 130 mmHg durant la totalité d'une analyse sur 8 minutes.

Précisons quelques points énoncés ci-dessus : les biomarqueurs analysés ce jour dans le sérum des patients montrent une augmentation de la troponine T. Une autre sous-unité, la troponine I a été rapportée comme augmentant dans une étude expérimentale d'escarre profonde chez le rat (Makhsous et al., 2010). D'un autre côté, cette même étude rapporte la hausse de concentration en myoglobine dont les valeurs sont normales au sein de notre sérothèque humaine. L'augmentation de la CRP et des marqueurs de l'inflammation comme le volume plaquettaire sont bien décrites dans la littérature et d'ores et déjà associée chez l'homme à une possible présence d'escarre (Fuoco et al., 1997; Gengenbacher et al., 2002; Hatanaka et al., 2008; Loerakker et al., 2012) même si une régulation positive de la CRP est également associée à d'autres pathologies, traumatismes et infections (Du Clos, 2000). La diminution de l'hémoglobine et de l'hématocrite est une conséquence de l'anémie des patients qui est connue comme une conséquence touchant entre 56 et 88% des blessés médullaires et n'est donc pas en lien direct avec la présence d'escarre (Hirsch et al., 1991; Perkash and Brown, 1986). De manière intéressante, la concentration de lactate déshydrogénase est comprise dans le seuil physiologique, alors que comme vu dans le chapitre 2 de la revue de la littérature, cette enzyme est récurrente comme biomarqueur, mais sa cinétique semble plus pertinente que sa valeur finale (Dale et al., 1972; Smit et al., 1988). L'inclusion des patients se poursuit avec des recherches de biomarqueurs impliqués dans les lésions musculaires comme la myosine à chaîne lourde et la heart fatty acid protein (Loerakker et al., 2012; Makhsous et al., 2010).

Il est nécessaire de nuancer l'absence de corrélation entre les pressions d'interface et l'indice de masse corporel de nos patients. En effet, l'IMC moyen est égal à 26 kg/m² avec des valeurs individuelles entre 18.6 et 36.7 kg/m². Un de nos critères d'exclusion est un IMC < 18 kg/m² qui explique l'absence de cas extrême dans notre cohorte. Néanmoins, la littérature identifie une augmentation de l'incidence des escarres chez les patients à faible IMC ou IMC élevé (Hyun et al., 2014; VanGilder et al., 2009) respectivement de 16 et 40 kg/m² (Drake et al., 2010).

L'étude transversale décrite dans ce manuscrit présente, comme toute étude, des limites. Aussi notre cohorte de patients est assez hétérogène en termes d'âge, et de durée de paraplégie, ce qui peut influencer la vascularisation et l'atrophie musculaire. Pour s'affranchir, en partie, de ces biais, l'étude a été pensée pour que chaque patient puisse être son propre contrôle (une biopsie zone innervée et une biopsie en zone non-innervée).

Enfin, j'ai eu l'opportunité de travailler sur la cicatrisation au cours de ma thèse au travers d'un projet collaboratif. Sur un modèle de plaies aiguës et chroniques, nous avons comparés deux types de pansement et étudiés l'impact du graphène sur la cicatrisation cutanée. Comme décrit dans le chapitre 3, les propriétés du graphène sont intéressantes dans le domaine médical (Skoda et al., 2016) et de la cicatrisation (Lu et al., 2012) et nous observons sur des souris une amélioration de la cicatrisation. Cette étude aura également été l'occasion d'introduire une mesure non invasive d'une plaie à travers l'utilisation de la **thermographie**. Grâce à une caméra thermique, il est possible de suivre l'évolution de la température cutanée (Ring and Ammer, 2012). Celle-ci fluctue en cas d'inflammation des tissus sous-jacents ou de troubles de la circulation sanguine. Aussi, cette méthode permet objectivement d'identifier l'infection d'une plaie (Chanmugam et al., 2017; Mufti et al., 2015), ou encore l'effet d'un traitement anti-inflammatoire dans un essai clinique. Un exemple notoire de cette utilisation est le paracétamol (Bacon et al., 1975). Les zones anatomiques de pieds diabétiques présentant une élévation de la température sont plus susceptibles de développer un ulcère (Armstrong et al., 1997; Serantoni et al., 2018) et la périphérie des ulcères veineux est plus chaude si la plaie est infectée (Fierheller and Sibbald, 2010).

Notre expérience personnelle, nous a permis de détecter une baisse du gradient de température entre la plaie couverte d'un pansement et la plaie immédiatement après le retrait du pansement. La diffusion de la température dans le cas d'une plaie recouverte de graphène est plus rapide et la plaie est plus chaude. Cette variation intervient avant le changement de surface de la plaie, mesurée par analyse photographique. Bien que la thermographie soit un critère validé pour une étude clinique, l'influence de changements thermiques dans les phases de cicatrisation n'est pas encore complètement élucidée (McGuinness et al., 2004). Une température du lit de la plaie inférieure à 33°C chez l'homme est associée

à un retard de cicatrisation dû à une réduction de la phase inflammatoire, un remodelage épithélial plus lent et un risque majoré d'infection (Kurz et al., 1996). La faible différence de température corporelle entre l'homme et la souris (37°C versus 37,6°C) nous permettent de transposer les résultats de la littérature (Talan, 1984) même si l'induction de diabète sur notre modèle de cicatrisation retardée diminue leur température corporelle. La température des plaies est inférieure au seuil de 33°C, sur notre modèle animal comme pour les résultats de l'étude clinique (McGuinness et al., 2004). De la même manière, les plaies aiguës et chroniques de nos souris ont une température inférieure à 33°C au moment du retrait du pansement. Une évolution positive de la température durant les phases de cicatrisation et avant les changements histologiques et macroscopiques de la plaie permet une évaluation prédictive du devenir de la lésion cutanée. La recherche de la normothermie de la plaie évaluée par la thermographie semble une mesure non-invasive prometteuse pour la cicatrisation. Ce domaine de recherche s'adapte déjà à l'étude et au suivi des escarres (Chaves et al., 2015; Kloth et al., 2000; Nakagami et al., 2010; Yamamoto et al., 2013).

Ces travaux de thèse, dont certains comme les études cliniques sont encore en cours, m'ont permis d'identifier les altérations du RyR1 comme élément pathologique intervenant de manière précoce à la suite d'une compression dans le muscle squelettique. Grâce au ciblage de cette voie, des traitements pharmacologiques sont possibles. Nous avons démontré leur utilité sur un modèle animal et une étude sur nos échantillons humains *in vitro* apporterait des informations nécessaires pour une étude pharmacologique de plus grande envergure. Les cellules primaires de patients inclus dans notre étude pourraient également être soumises à une contrainte mécanique en utilisant un prototype développé par (Wu et al., 2016). Cette expérience permettrait de mieux appréhender les relations de cause à effet entre pression et déséquilibre calcique. L'impact d'une déformation mécanique sur le cytosquelette de la cellule me semble particulièrement intéressant à étudier. Si la pathophysiologie des escarres est intrinsèquement liée à une altération mécanique, l'impact de l'électrostimulation pourrait être approfondi sur ce même modèle et sur notre modèle de souris. La base de données de pressions d'interface que nous avons initiée pendant ce travail de thèse permettrait une étude ciblée sur d'autres mécanismes telle la mobilité du patient au lit ou une variation des paramètres de la vascularisation en fonction de la pression interne du matelas sur une cohorte de patients critiques. Un modèle expérimental de souris pourrait également être mise en place pour comprendre l'impact d'une variation de pression répétée sur le muscle squelettique et préciser la différence entre les surfaces thérapeutiques alternées fonctionnant à basse et à haute pression. Le modèle ne simulerait pas des cycles d'IR mais une vasodilatation.

Enfin, une des perspectives de mon travail serait d'utiliser le modèle de souris diabétique, induit par la streptozotocine, pour appréhender l'altération fonctionnelle du RyR1 dans la genèse des escarres dans un contexte pathologique. Le diabète tardif induira un changement structural et mécanique du cytosquelette et en complément de l'administration d'un traitement antioxydant, ce modèle expérimental permettrait de séparer quelles sont les lésions générées par une déformation mécanique, induite par les mécanosenseurs et quelles sont celles générées par une augmentation de stress oxydant intracellulaire.

Bibliographie

- Adegoke, B.O.A., Odole, A.C., Akindele, L.O., and Akinpelu, A.O. (2013). Pressure ulcer prevalence among hospitalised adults in university hospitals in South-west Nigeria. *Wound Pract. Res. J. Aust. Wound Manag. Assoc.* *21*, 128.
- Agrawal, K., and Chauhan, N. (2012). Pressure ulcers: Back to the basics. *Indian J. Plast. Surg. Off. Publ. Assoc. Plast. Surg. India* *45*, 244–254.
- Alander, J.T., Kaartinen, I., Laakso, A., Pättilä, T., Spillmann, T., Tuchin, V.V., Venermo, M., and Välisuo, P. (2012). A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int. J. Biomed. Imaging* *2012*, 940585.
- Alderden, J., Whitney, J.D., Taylor, S.M., and Zaratkiewicz, S. (2011). Risk Profile Characteristics Associated With Outcomes of Hospital-Acquired Pressure Ulcers: A Retrospective Review. *Crit. Care Nurse* *31*, 30–43.
- Amir, Y., Tan, F.E.S., Halfens, R., Lohrmann, C., and Schols, J. (2017). Pressure Ulcer Prevalence and Care in Indonesian Hospitals: A Multicenter, Cross-sectional Evaluation Using an Extended Donabedian Model. *Ostomy. Wound Manage.* *63*, 8–23.
- Andersen, L.W., Mackenhauer, J., Roberts, J.C., Berg, K.M., Cocchi, M.N., and Donnino, M.W. (2013). Etiology and therapeutic approach to elevated lactate. *Mayo Clin. Proc.* *88*, 1127–1140.
- Andersson, D.C., and Marks, A.R. (2010). Fixing ryanodine receptor Ca²⁺ leak - a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* *7*, e151–e157.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2011). Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* *14*, 196–207.
- Arao, H., Obata, M., Shimada, T., and Hagsawa, S. (1998). Morphological characteristics of the dermal papillae in the development of pressure sores. *J. Tissue Viability* *8*, 17–23.
- Armstrong, D.G., Lavery, L.A., Liswood, P.J., Todd, W.F., and Tredwell, J.A. (1997). Infrared dermal thermometry for the high-risk diabetic foot. *Phys. Ther.* *77*, 169–175; discussion 176-177.
- Atkinson, R.A., and Cullum, N.A. (2018). Interventions for pressure ulcers: a summary of evidence for prevention and treatment. *Spinal Cord* *56*, 186–198.
- Aubert-Viard, F. (2014). Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques. thesis. Lille 2.
- Bacon, P.A., Collins, A.J., and Cosh, J.A. (1975). Thermographic assessment of the anti-inflammatory effect of flurbiprofen in rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Res. Opin.* *3*, 20–26.
- Bader, D., Wang, Y.-N., Knight, S., Polliack, A., James, T., and Taylor, R. (2005). Biochemical Status of Soft Tissues Subjected to Sustained Pressure. In *Pressure Ulcer Research: Current and Future Perspectives*, D.L. Bader, C.V.C. Bouten, D. Colin, and C.W.J. Oomens, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 109–127.
- Barnett, R.I., and Ablarde, J.A. (1994). Skin vascular reaction to standard patient positioning on a hospital mattress. *Adv. Wound Care J. Prev. Heal.* *7*, 58–65.
- Barrois, B., Labalette, C., Rousseau, P., Corbin, A., Colin, D., Allaert, F., and Saumet, J.L. (2008). A national prevalence study of pressure ulcers in French hospital inpatients. *J. Wound Care* *17*, 373–376, 378–379.
- Bauer, K., Rock, K., Nazzal, M., Jones, O., and Qu, W. (2016). Pressure Ulcers in the United States' Inpatient Population From 2008 to 2012: Results of a Retrospective Nationwide Study. *Ostomy. Wound Manage.* *62*, 30–38.

- Bauman, W.A., and Spungen, A.M. (1994). Disorders of carbohydrate and lipid metabolism in veterans with paraplegia or quadriplegia: a model of premature aging. *Metabolism*. *43*, 749–756.
- Bellinger, A.M., Mongillo, M., and Marks, A.R. (2008). Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J. Clin. Invest.* *118*, 445–453.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* *15*, 325–330.
- Bergstrand, S., Källman, U., Ek, A.-C., Lindberg, L.-G., Engström, M., Sjöberg, F., and Lindgren, M. (2014). Pressure-induced vasodilation and reactive hyperemia at different depths in sacral tissue under clinically relevant conditions. *Microcirc. N. Y. N 1994* *21*, 761–771.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling.
- Bhattacharya, S., and Mishra, R.K. (2015). Pressure ulcers: Current understanding and newer modalities of treatment. *Indian J. Plast. Surg. Off. Publ. Assoc. Plast. Surg. India* *48*, 4–16.
- Bichraoui, H. (2010). Identification de nouveaux déterminants moléculaires de l'interaction du récepteur des Dihydropyridines avec le récepteur à la Ryanodine. phdthesis. Université de Grenoble.
- Blaisdell, F.W. (2002). The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc. Surg.* *10*, 620–630.
- Blaylock, B., and Gardner, C. (1994). Measuring tissue interface pressures of two support surfaces used in the operating room. *Ostomy. Wound Manage.* *40*, 42–44, 46, 48.
- Bogie, K., and Bader, D. (2005). Susceptibility of Spinal Cord-Injured Individuals to Pressure Ulcers. In *Pressure Ulcer Research: Current and Future Perspectives*, D.L. Bader, C.V.C. Bouten, D. Colin, and C.W.J. Oomens, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 73–88.
- Bonnefoy, M., Coulon, J., Bienvenu, J., Boisson, R.C., and Rys, L. (1995). Implication of Cytokines in the Aggravation of Malnutrition and Hypercatabolism in Elderly Patients with Severe Pressure Sores. *Age Ageing* *24*, 37–42.
- Borisov, A.B., Huang, S.-K., and Carlson, B.M. (2000). Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat. Rec.* *258*, 292–304.
- Bosboom, E.M.H., Bouten, C.V.C., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T., and Nicolay, K. (2003). Quantifying pressure sore-related muscle damage using high-resolution MRI. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *95*, 2235–2240.
- Bouten, C.V.C. (1996). Etiology and pathology of pressure sores: a literature review.
- Brancaccio, P., Lippi, G., and Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clin. Chem. Lab. Med.* *48*, 757–767.
- Brandão, M.L., Roselino, J.E.S., Piccinato, C.E., and Cherri, J. (2003). Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J. Surg. Res.* *110*, 235–240.
- Breuls, R.G.M., Bouten, C.V.C., Oomens, C.W.J., Bader, D.L., and Baaijens, F.P.T. (2003). Compression induced cell damage in engineered muscle tissue: an in vitro model to study pressure ulcer aetiology. *Ann. Biomed. Eng.* *31*, 1357–1364.
- Brienza, D., Krishnan, S., Karg, P., Sowa, G., and Allegritti, A.L. (2018). Predictors of pressure ulcer incidence following traumatic spinal cord injury: a secondary analysis of a prospective longitudinal study. *Spinal Cord* *56*, 28–34.

- Brill, A.-K. (2014). How to avoid interface problems in acute noninvasive ventilation. *Breathe* 10, 230–242.
- Bronneberg, D. (2007). Biochemical markers for early detection of superficial pressure ulcers. *TU/e*.
- Bronneberg, D., Bouten, C.V.C., Oomens, C.W.J., van Kemenade, P.M., and Baaijens, F.P.T. (2006). An in vitro Model System to Study the Damaging Effects of Prolonged Mechanical Loading of the Epidermis. *Ann. Biomed. Eng.* 34, 506–514.
- Bronneberg, D., Spiekstra, S.W., Cornelissen, L.H., Oomens, C.W.J., Gibbs, S., Baaijens, F.P.T., and Bouten, C.V.C. (2007). Cytokine and chemokine release upon prolonged mechanical loading of the epidermis. *Exp. Dermatol.* 16, 567–573.
- Burkholder, T.J. (2007). Mechanotransduction in skeletal muscle. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 174–191.
- Calderón, J.C., Bolaños, P., and Caputo, C. (2014). The excitation–contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys. Rev.* 6, 133–160.
- Carry, M.R., Ringel, S.P., and Starcevich, J.M. (1986). Distribution of capillaries in normal and diseased human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 9, 445–454.
- Carter, N.W., Rector, F.C., Campion, D.S., and Seldin, D.W. (1967). Measurement of Intracellular pH of Skeletal Muscle with pH-sensitive Glass Microelectrodes*. *J. Clin. Invest.* 46, 920–933.
- Cerra, F.B., Lajos, T.Z., Montes, M., and Siegel, J.H. (1975). Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 78, 95–104.
- Chanmugam, A., Langemo, D., Thomason, K., Haan, J., Altenburger, E.A., Tippett, A., Henderson, L., and Zortman, T.A. (2017). Relative Temperature Maximum in Wound Infection and Inflammation as Compared with a Control Subject Using Long-Wave Infrared Thermography. *Adv. Skin Wound Care* 30, 406.
- Chaves, M.E.A., Silva, F.S. da, Soares, V.P.C., Ferreira, R.A.M., Gomes, F.S.L., Andrade, R.M. de, Pinotti, M., Chaves, M.E.A., Silva, F.S. da, Soares, V.P.C., et al. (2015). Evaluation of healing of pressure ulcers through thermography: a preliminary study. *Res. Biomed. Eng.* 31, 3–9.
- Clark, M., Semple, M.J., Ivins, N., Mahoney, K., and Harding, K. (2017). National audit of pressure ulcers and incontinence-associated dermatitis in hospitals across Wales: a cross-sectional study. *BMJ Open* 7.
- Clarke, O.B., and Hendrickson, W.A. (2016). Structures of the Colossal RyR1 Calcium Release Channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 39, 144–152.
- Coleman, S., Nixon, J., Keen, J., Wilson, L., McGinnis, E., Dealey, C., Stubbs, N., Farrin, A., Dowding, D., Schols, J.M., et al. (2014). A new pressure ulcer conceptual framework. *J. Adv. Nurs.* 70, 2222–2234.
- Contreras-Ferrat, A., Lavandero, S., Jaimovich, E., and Klip, A. (2014). Calcium signaling in insulin action on striated muscle. *Cell Calcium* 56, 390–396.
- Cornelissen, L.H., Bronneberg, D., Bader, D.L., Baaijens, F.P.T., and Oomens, C.W.J. (2009). The transport profile of cytokines in epidermal equivalents subjected to mechanical loading. *Ann. Biomed. Eng.* 37, 1007–1018.
- Cowan, K.J., and Storey, K.B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.* 206, 1107–1115.
- Cox, J., and Roche, S. (2015). Vasopressors and development of pressure ulcers in adult critical care patients. *Am. J. Crit. Care Off. Publ. Am. Assoc. Crit.-Care Nurses* 24, 501–510.
- Cragg, J.J., Noonan, V.K., Dvorak, M., Krassioukov, A., Mancini, G.B.J., and Borisoff, J.F. (2013). Spinal cord injury and type 2 diabetes. *Neurology* 81, 1864–1868.

- Cui, F.-F., Pan, Y.-Y., Xie, H.-H., Wang, X.-H., Shi, H.-X., Xiao, J., Zhang, H.-Y., Chang, H.-T., and Jiang, L.-P. (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*, 284.
- Dale, J., Myhre, E., and Rasmussen, K. (1972). Elimination of Hemoglobin and Lactate Dehydrogenase from Plasma in Normals and Patients with Intravascular Hemolysis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *29*, 389–395.
- Defloor, T. (1999). The risk of pressure sores: a conceptual scheme. *J. Clin. Nurs.* *8*, 206–216.
- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R., and Herman, I.M. (2012). Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Adv. Skin Wound Care* *25*, 304–314.
- Dhalla, N.S., Elmoselhi, A.B., Hata, T., and Makino, N. (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *47*, 446–456.
- Dini, F., Capuano, R., Strand, T., Ek, A.-C., Lindgren, M., Paolesse, R., Di Natale, C., and Lundström, I. (2013). Volatile Emissions from Compressed Tissue. *PLoS ONE* *8*.
- Dodd, K.T., and Gross, D.R. (1991). Three-dimensional tissue deformation in subcutaneous tissues overlying bony prominences may help to explain external load transfer to the interstitium. *J. Biomech.* *24*, 11–19.
- Drake, D.J., Swanson, M., Baker, G., Pokorny, M., Rose, M.A., Clark-Reed, L., Waters, W., Watkins, F.R., and Engelke, M.K. (2010). The association of BMI and Braden total score on the occurrence of pressure ulcers. *J. Wound Ostomy Cont. Nurs. Off. Publ. Wound Ostomy Cont. Nurses Soc.* *37*, 367–371.
- Du Clos, T.W. (2000). Function of C-reactive protein. *Ann. Med.* *32*, 274–278.
- Dulhunty, A.F., and Franzini-Armstrong, C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *J. Physiol.* *250*, 513–539.
- Durrani, N.K., Yavuzer, R., Mittal, V., Bradford, M.M., Loboeki, C., and Silberberg, B. (2006). The effect of gradually increased blood flow on ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Am. J. Surg.* *191*, 334–337.
- Ebashi, S. (1991). Excitation-Contraction Coupling and the Mechanism of Muscle Contraction. *Annu. Rev. Physiol.* *53*, 1–17.
- Edsberg, L.E., Wyffels, J.T., Ogrin, R., Craven, B.C., and Houghton, P. (2015). A pilot study evaluating protein abundance in pressure ulcer fluid from people with and without spinal cord injury. *J. Spinal Cord Med.* *38*, 456–467.
- Elias, P., Ahn, S., Brown, B., Crumrine, D., and Feingold, K.R. (2002). Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* *119*, 1269–1274.
- Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat. Med.* *17*.
- Eming, S.A., Martin, P., and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* *6*, 265sr6.
- Espinosa, A., Estrada, M., and Jaimovich, E. (2004). IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. *J. Endocrinol.* *182*, 339–352.
- Falanga, V., Zhou, L., and Yufit, T. (2002). Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J. Cell. Physiol.* *191*, 42–50.

- Farah, S., Sabry, M.A., al-Shubaili, A.F., Anim, J.T., Hussain, J.M., Montaser, M.A., and Sharfuddin, K.M. (1997). Hereditary spastic paraparesis with distal muscle wasting, microcephaly, mental retardation, arachnodactyly and tremors: new entity? *Clin. Neurol. Neurosurg.* *99*, 66–70.
- Fauconnier, J., Meli, A.C., Thireau, J., Roberge, S., Shan, J., Sassi, Y., Reiken, S.R., Rauzier, J.-M., Marchand, A., Chauvier, D., et al. (2011). Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 13258–13263.
- Feng, Y., Chai, J., Chu, W., Ma, L., Zhang, P., and Duan, H. (2013). Combination of ketamine and xylazine exacerbates cardiac dysfunction in severely scalded rats during the shock stage. *Exp. Ther. Med.* *6*, 641–648.
- Ferguson-Pell, M., and Hagsawa, S. (1988). Biochemical changes in sweat following prolonged ischemia. *J. Rehabil. Res. Dev.* *25*, 57–62.
- Ferraq, Y. (2007). Développement d'un modèle de cicatrisation épidermique après une désépidermisation laser. thesis. Toulouse 3.
- Fierheller, M., and Sibbald, R.G. (2010). A clinical investigation into the relationship between increased periwound skin temperature and local wound infection in patients with chronic leg ulcers. *Adv. Skin Wound Care* *23*, 369–379; quiz 380–381.
- Frankel, H., Sperry, J., and Kaplan, L. (2007). Risk factors for pressure ulcer development in a best practice surgical intensive care unit. *Am. Surg.* *73*, 1215–1217.
- Frayse, B., Desaphy, J.-F., Rolland, J.-F., Pierno, S., Liantonio, A., Giannuzzi, V., Camerino, C., Didonna, M.P., Cocchi, D., De Luca, A., et al. (2006). Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone. *Neurobiol. Dis.* *21*, 372–380.
- Fromy, B., Lingueglia, E., Sigaudou-Roussel, D., Saumet, J.L., and Lazdunski, M. (2012). Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat. Med.* *18*, 1205–1207.
- Frontera, W.R., Choi, H., Krishnan, G., Krivickas, L.S., Sabharwal, S., and Teng, Y.D. (2006). Single muscle fiber size and contractility after spinal cord injury in rats. *Muscle Nerve* *34*, 101–104.
- Frykberg, R.G., and Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv. Wound Care* *4*, 560–582.
- Fuoco, U., Scivoletto, G., Pace, A., Vona, V.U., and Castellano, V. (1997). Anaemia and serum protein alteration in patients with pressure ulcers. *Spinal Cord* *35*, 58–60.
- Gaubert, M.-L.D. (ép (2008). L'effet du vieillissement sur la microcirculation cutanée. phdthesis. Université Claude Bernard - Lyon I.
- Gefen, A. (2003). Plantar soft tissue loading under the medial metatarsals in the standing diabetic foot. *Med. Eng. Phys.* *25*, 491–499.
- Gefen, A. (2010). The biomechanics of heel ulcers. *J. Tissue Viability* *19*, 124–131.
- Gélis, A., Dupeyron, A., Legros, P., Benaïm, C., Pelissier, J., and Fattal, C. (2009). Pressure ulcer risk factors in persons with spinal cord injury Part 2: the chronic stage. *Spinal Cord* *47*, 651–661.
- Gengenbacher, M., Stähelin, H.B., Scholer, A., and Sciler, W.O. (2002). Low biochemical nutritional parameters in acutely ill hospitalized elderly patients with and without stage III to IV pressure ulcers. *Aging Clin. Exp. Res.* *14*, 420–423.

- Gibson, T., Kenedi, R.M., and Craik, J.E. (1965). The mobile micro-architecture of dermal collagen: A bio-engineering study. *BJS* 52, 764–770.
- Gillespie, B.M., Chaboyer, W.P., McInnes, E., Kent, B., Whitty, J.A., and Thalib, L. (2014). Repositioning for pressure ulcer prevention in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD009958.
- Gissel, H. (2005). The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066, 166–180.
- Gould, L., Abadir, P., Brem, H., Carter, M., Conner-Kerr, T., Davidson, J., DiPietro, L., Falanga, V., Fife, C., Gardner, S., et al. (2015). Chronic Wound Repair and Healing in Older Adults: Current Status and Future Research. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 23, 1–13.
- Gray, R.J., Voegeli, D., and Bader, D.L. (2016a). Features of lymphatic dysfunction in compressed skin tissues - Implications in pressure ulcer aetiology. *J. Tissue Viability* 25, 26–31.
- Gray, R.J., Worsley, P.R., Voegeli, D., and Bader, D.L. (2016b). Monitoring contractile dermal lymphatic activity following uniaxial mechanical loading. *Med. Eng. Phys.* 38, 895–903.
- Grisotto, P.C., dos Santos, A.C., Coutinho-Netto, J., Cherri, J., and Piccinato, C.E. (2000). Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 92, 1–6.
- Guerrero-Hernandez, A., and Verkhatsky, A. (2014). Calcium signalling in diabetes. *Cell Calcium* 56, 297–301.
- Guesdon, H. (2010). Devenir médical, familial et socioprofessionnel d'une cohorte de patients paraplégiques d'origine traumatique: étude rétrospective à plus de 4 ans de l'accident. Thèse d'exercice. Université de Nancy I. Faculté de médecine.
- Guihan, M., Sohn, M.-W., Bauman, W.A., Spungen, A.M., Powell-Cope, G.M., Thomason, S.S., Collins, J.F., and Bates-Jensen, B.M. (2016). Difficulty in Identifying Factors Responsible for Pressure Ulcer Healing in Veterans With Spinal Cord Injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 97, 2085-2094.e1.
- Gunningberg, L. (2004). Risk, prevalence and prevention of pressure ulcers in three Swedish healthcare settings. *J. Wound Care* 13, 286–290.
- Gunther, R.A., and Clark, M. (2000). The effect of a dynamic pressure-redistributing bed support surface upon systemic lymph flow and composition. *J. Tissue Viability* 10, 10–15.
- Hagisawa, S., and Shimada, T. (2005). Skin Morphology and Its Mechanical Properties Associated with Loading. In *Pressure Ulcer Research: Current and Future Perspectives*, D.L. Bader, C.V.C. Bouten, D. Colin, and C.W.J. Oomens, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 161–185.
- Hagisawa, S., Ferguson-Pell, M., Cardi, M., and Miller, S.D. (1994). Assessment of skin blood content and oxygenation in spinal cord injured subjects during reactive hyperemia. *J. Rehabil. Res. Dev.* 31, 1–14.
- Hagisawa, S., Shimada, T., Arao, H., and Asada, Y. (2001). Morphological architecture and distribution of blood capillaries and elastic fibres in the human skin. *J. Tissue Viability* 11, 59–63.
- Hamer, P.W., McGeachie, J.M., Davies, M.J., and Grounds, M.D. (2002). Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J. Anat.* 200, 69–79.
- Hatanaka, N., Yamamoto, Y., Ichihara, K., Mastuo, S., Nakamura, Y., Watanabe, M., and Iwatani, Y. (2008). A new predictive indicator for development of pressure ulcers in bedridden patients based on common laboratory tests results. *J. Clin. Pathol.* 61, 514–518.

- Hemmes, B., de Wert, L.A., Brink, P.R.G., Oomens, C.W.J., Bader, D.L., and Poeze, M. (2017). Cytokine IL1 α and lactate as markers for tissue damage in spineboard immobilisation. A prospective, randomised open-label crossover trial. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 75, 82–88.
- Heyningen, R. van, and Weiner, J.S. (1952). The effect of arterial occlusion on sweat composition. *J. Physiol.* 116, 404–413.
- Hinzmann, M., Jaworski, S., Kutwin, M., Jagiełło, J., Koziński, R., Wierzbicki, M., Grodzik, M., Lipińska, L., Sawosz, E., and Chwalibog, A. (2014). Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2409–2417.
- Hirsch, G.H., Menard, M.R., and Anton, H.A. (1991). Anemia after traumatic spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 72, 195–201.
- Honda, H.M., Korge, P., and Weiss, J.N. (2005). Mitochondria and Ischemia/Reperfusion Injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047, 248–258.
- Hoogendoorn, I., Reenalda, J., Koopman, B.F.J.M., and Rietman, J.S. (2017). The effect of pressure and shear on tissue viability of human skin in relation to the development of pressure ulcers: a systematic review. *J. Tissue Viability* 26, 157–171.
- Husain, T. (1953). An experimental study of some pressure effects on tissues, with reference to the bed-sore problem. *J. Pathol. Bacteriol.* 66, 347–358.
- Hyun, S., Li, X., Vermillion, B., Newton, C., Fall, M., Kaewprag, P., Moffatt-Bruce, S., and Lenz, E.R. (2014). Body Mass Index and Pressure Ulcers: Improved Predictability of Pressure Ulcers in Intensive Care Patients. *Am. J. Crit. Care Off. Publ. Am. Assoc. Crit.-Care Nurses* 23, 494–501.
- Ikebe, K., Kato, T., Yamaga, M., Hirose, J., Tsuchida, T., and Takagi, K. (2001). Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. *J. Surg. Res.* 99, 1–6.
- Jiang, L., Dai, Y., Cui, F., Pan, Y., Zhang, H., Xiao, J., and Xiaobing, F.U. (2014a). Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing. *Spinal Cord* 52, 145–151.
- Jiang, Q., Li, X., Qu, X., Liu, Y., Zhang, L., Su, C., Guo, X., Chen, Y., Zhu, Y., Jia, J., et al. (2014b). The incidence, risk factors and characteristics of pressure ulcers in hospitalized patients in China. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 2587–2594.
- Kang, Z.-Q., and Zhai, X.-J. (2015). The Association between Pre-existing Diabetes Mellitus and Pressure Ulcers in Patients Following Surgery: A Meta-analysis. *Sci. Rep.* 5.
- Kasuya, Y., Umezawa, H., and Hatano, M. (2018). Stress-Activated Protein Kinases in Spinal Cord Injury: Focus on Roles of p38. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 867.
- Kim, B.-C., Kim, H.T., Park, S.H., Cha, J.-S., Yufit, T., Kim, S.-J., and Falanga, V. (2003). Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-beta-signaling and decreased TGF-beta Type II receptor expression. *J. Cell. Physiol.* 195, 331–336.
- Kloth, L.C., Berman, J.E., Dumit-Minkel, S., Sutton, C.H., Papanek, P.E., and Wurzel, J. (2000). Effects of a normothermic dressing on pressure ulcer healing. *Adv. Skin Wound Care* 13, 69–74.
- Knight, S.L., Taylor, R.P., Polliack, A.A., and Bader, D.L. (2001). Establishing predictive indicators for the status of loaded soft tissues. *J. Appl. Physiol.* 90, 2231–2237.

- Koïtka, A., Abraham, P., Bouhanick, B., Sigauco-Roussel, D., Demiot, C., and Saumet, J.L. (2004). Impaired pressure-induced vasodilation at the foot in young adults with type 1 diabetes. *Diabetes* 53, 721–725.
- Krishnan, S., Karg, P.E., Boninger, M.L., Vodovotz, Y., Constantine, G., Sowa, G.A., and Brienza, D.M. (2016). Early Detection of Pressure Ulcer Development Following Traumatic Spinal Cord Injury Using Inflammatory Mediators. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 97, 1656–1662.
- Krouskop, T.A., Reddy, N.P., Spencer, W.A., and Secor, J.W. (1978). Mechanisms of decubitus ulcer formation — An hypothesis. *Med. Hypotheses* 4, 37–39.
- Kruger, E.A., Pires, M., Ngann, Y., Sterling, M., and Rubayi, S. (2013). Comprehensive management of pressure ulcers in spinal cord injury: Current concepts and future trends. *J. Spinal Cord Med.* 36, 572–585.
- Kurz, A., Sessler, D.I., and Lenhardt, R. (1996). Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature Group. *N. Engl. J. Med.* 334, 1209–1215.
- Kushnir, A., Wajsborg, B., and Marks, A.R. (2018). Ryanodine receptor dysfunction in human disorders. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Lachenbruch, C., Tzen, Y.-T., Brienza, D., Karg, P.E., and Lachenbruch, P.A. (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, 16–25.
- Ladwig, G.P., Robson, M.C., Liu, R., Kuhn, M.A., Muir, D.F., and Schultz, G.S. (2002). Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 10, 26–37.
- Lahmann, N.A., Halfens, R.J., and Dassen, T. (2006). Pressure ulcers in German nursing homes and acute care hospitals: prevalence, frequency, and ulcer characteristics. *Ostomy. Wound Manage.* 52, 20–33.
- Lai, Y.-J., Lin, C.-L., Chang, Y.-J., Lin, M.-C., Lee, S.-T., Sung, F.-C., Lee, W.-Y., and Kao, C.-H. (2014). Spinal cord injury increases the risk of Type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Spine J.* 14, 1957–1964.
- Landis, E. (1930). Micro-injection studies of capillary blood pressure in human skin. *Heart* 15, 209–228.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Lanza, I.R., and Nair, K.S. (2009). Chapter 20: Functional Assessment of Isolated Mitochondria In Vitro. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 349–372.
- Latimer, S., Chaboyer, W., and Gillespie, B.M. (2015). The repositioning of hospitalized patients with reduced mobility: a prospective study. *Nurs. Open* 2, 85–93.
- Le, K.M., Madsen, B.L., Barth, P.W., Ksander, G.A., Angell, J.B., and Vistnes, L.M. (1984). An in-depth look at pressure sores using monolithic silicon pressure sensors. *Plast. Reconstr. Surg.* 74, 745–756.
- Le Gall, M., Matecki, S., Agdeppa, E., Lacampagne, A., and Téot, L. (2017). Les supports de prévention et de traitement des escarres. *Rev. Francoph. Cicatrisation* 1, 15–19.
- Leak, L.V., and Burke, J.F. (1968). ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON THE LYMPHATIC ANCHORING FILAMENTS. *J. Cell Biol.* 36, 129–149.
- Lee, B., Benyajati, S., Woods, J.A., and Jan, Y.-K. (2014). Effect of local cooling on pro-inflammatory cytokines and blood flow of the skin under surface pressure in rats: feasibility study. *J. Tissue Viability* 23, 69–77.

- Leopold, E., and Gefen, A. (2012). A simple stochastic model to explain the sigmoid nature of the strain-time cellular tolerance curve. *J. Tissue Viability* 21, 27–36.
- Levine, J.M. (1992). Historical notes on pressure ulcers: the cure of Ambrose Paré. *Decubitus* 5, 23–24, 26.
- Levy, A., Kopplin, K., and Gefen, A. (2013). Simulations of skin and subcutaneous tissue loading in the buttocks while regaining weight-bearing after a push-up in wheelchair users. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 28, 436–447.
- Li, Y., Liu, Y., Fu, Y., Wei, T., Le Guyader, L., Gao, G., Liu, R.-S., Chang, Y.-Z., and Chen, C. (2012). The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials* 33, 402–411.
- Linder-Ganz, E., Engelberg, S., Scheinowitz, M., and Gefen, A. (2006). Pressure-time cell death threshold for albino rat skeletal muscles as related to pressure sore biomechanics. *J. Biomech.* 39, 2725–2732.
- Linder-Ganz, E., Shabshin, N., and Gefen, A. Patient-specific modeling of deep tissue injury biomechanics in an unconscious patient who developed myonecrosis after prolonged lying. *J. Tissue Viability* 18, 62–71.
- Liu, X.-H., Harlow, L., Graham, Z.A., Bauman, W.A., and Cardozo, C. (2017). Spinal Cord Injury Leads to Hyperoxidation and Nitrosylation of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor-1 Associated with Upregulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4. *J. Neurotrauma* 34, 2069–2074.
- Loerakker, S. (2007). Aetiology of pressure ulcers. *BMTE 0739 Eindhoven University of Technology*, 31.
- Loerakker, S., Huisman, E.S., Seelen, H.A.M., Glatz, J.F.C., Baaijens, F.P.T., Oomens, C.W.J., and Bader, D.L. (2012). Plasma variations of biomarkers for muscle damage in male nondisabled and spinal cord injured subjects. *J. Rehabil. Res. Dev.* 49, 361–372.
- Lu, B., Li, T., Zhao, H., Li, X., Gao, C., Zhang, S., and Xie, E. (2012). Graphene-based composite materials beneficial to wound healing. *Nanoscale* 4, 2978–2982.
- MacIntosh, B.R., Holash, R.J., and Renaud, J.-M. (2012). Skeletal muscle fatigue – regulation of excitation–contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. *J Cell Sci* 125, 2105–2114.
- Macron, A., Pillet, H., Doridam, J., Verney, A., and Rohan, P.-Y. (2018). Development and evaluation of a new methodology for the fast generation of patient-specific Finite Element models of the buttock for sitting-acquired deep tissue injury prevention. *J. Biomech.*
- Mahadev, K., Wu, X., Motoshima, H., and Goldstein, B.J. (2004a). Integration of multiple downstream signals determines the net effect of insulin on MAP kinase vs. PI 3'-kinase activation: potential role of insulin-stimulated H₂O₂. *Cell. Signal.* 16, 323–331.
- Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J.M., Arnold, R.S., Cheng, G., Lambeth, J.D., and Goldstein, B.J. (2004b). The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H₂O₂ and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1844–1854.
- Makhsous, M., Lin, F., Pandya, A., Pandya, M.S., and Chadwick, C.C. (2010). Elevation in the serum and urine concentration of injury-related molecules after the formation of deep tissue injury in a rat spinal cord injury pressure ulcer model. *PM R* 2, 1063–1065.
- Marks, A.R., Landry, D.W., and Deng, S. (2014). Agents for preventing and treating disorders involving modulation of the ryanodine receptors.

Marshall, M.V., Rasmussen, J.C., Tan, I.-C., Aldrich, M.B., Adams, K.E., Wang, X., Fife, C.E., Maus, E.A., Smith, L.A., and Sevick-Muraca, E.M. (2010). Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update. *Open Surg. Oncol. J. Online* 2, 12–25.

Matecki, S., Dridi, H., Jung, B., Saint, N., Reiken, S.R., Scheuermann, V., Mrozek, S., Santulli, G., Umanskaya, A., Petrof, B.J., et al. (2016). Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9069–9074.

McGuinness, W., Vella, E., and Harrison, D. (2004). Influence of dressing changes on wound temperature. *J. Wound Care* 13, 383–385.

McInnes, E., Jammali-Blasi, A., Bell-Syer, S.E., Dumville, J.C., Middleton, V., and Cullum, N. (2015). Support surfaces for pressure ulcer prevention. In *The Cochrane Library*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.

Meesterberends, E., Halfens, R., Dr. Lohrmann, C., and de Wit, R. (2010). Pressure ulcer guideline development and dissemination in Europe. *J. Clin. Nurs.* 19, 1495–1503.

Miller, G.E., and Seale, J. (1981). Lymphatic clearance during compressive loading. *Lymphology* 14, 161–166.

Minematsu, T., Nakagami, G., Sari, Y., Akase, T., Sugama, J., Nagase, T., and Sanada, H. (2010). Candidate biomarkers for deep tissue damage from molecular biological and biochemical aspects. *J. Tissue Viability* 19, 77–83.

Moore, Z., Johansen, E., Etten, M. van, Strapp, H., Solbakken, T., Smith, B.E., and Faulstich, J. (2015). Pressure ulcer prevalence and prevention practices: a cross-sectional comparative survey in Norway and Ireland. *J. Wound Care* 24, 333–339.

Morfoisse, F. (2015). Régulations moléculaires des facteurs lymphangiogéniques dans les pathologies vasculaires (Toulouse 3).

Mufti, A., Coutts, P., and Sibbald, R.G. (2015). Validation of commercially available infrared thermometers for measuring skin surface temperature associated with deep and surrounding wound infection. *Adv. Skin Wound Care* 28, 11–16.

Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008). Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol. Rev.* 88, 581–609.

Nader, G.A., and Esser, K.A. (2001). Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 90, 1936–1942.

Nakagami, G., Sanada, H., Iizaka, S., Kadono, T., Higashino, T., Koyanagi, H., and Haga, N. (2010). Predicting delayed pressure ulcer healing using thermography: a prospective cohort study. *J. Wound Care* 19, 465–472.

Nassaji, M., Askari, Z., and Ghorbani, R. (2014). Cigarette smoking and risk of pressure ulcer in adult intensive care unit patients. *Int. J. Nurs. Pract.* 20, 418–423.

Nguyen-Tu, M.-S., Begey, A.-L., Decorps, J., Boizot, J., Sommer, P., Fromy, B., and Sigaudou-Roussel, D. (2013). Skin microvascular response to pressure load in obese mice. *Microvasc. Res.* 90, 138–143.

Oliver, J.C., Bland, L.A., Oettinger, C.W., Arduino, M.J., McAllister, S.K., Aguero, S.M., and Favero, M.S. (1993). Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res.* 12, 115–120.

Oomens, C. (2005). Perspectives of Numerical Modelling in Pressure Ulcer Research. In *Pressure Ulcer Research: Current and Future Perspectives*, D.L. Bader, C.V.C. Bouten, D. Colin, and C.W.J. Oomens, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 149–159.

- Oomens, C., Brekelmans, M., Loerakker, S., and Baaijens, F. (2018). *Biomechanics: Concepts and Computation* (Cambridge University Press).
- Oomens, C.W.J., Maenhout, M., van Oijen, C.H., Drost, M.R., and Baaijens, F.P. (2003). Finite element modelling of contracting skeletal muscle. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 1453–1460.
- Peirce, S.M., Skalak, T.C., and Rodeheaver, G.T. (2000). Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* *8*, 68–76.
- Perkash, A., and Brown, M. (1986). Anemia in patients with traumatic spinal cord injury. *J. Am. Paraplegia Soc.* *9*, 10–15.
- Peterson, M.J., Gravenstein, N., Schwab, W.K., van Oostrom, J.H., and Caruso, L.J. (2013). Patient repositioning and pressure ulcer risk—monitoring interface pressures of at-risk patients. *J. Rehabil. Res. Dev.* *50*, 477–488.
- Petrie, M.A., Suneja, M., Faidley, E., and Shields, R.K. (2014). Low force contractions induce fatigue consistent with muscle mRNA expression in people with spinal cord injury. *Physiol. Rep.* *2*, e00248.
- Piper, H.M., Meuter, K., and Schäfer, C. (2003). Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* *75*, S644-648.
- Piper, H.M., Abdallah, Y., and Schäfer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* *61*, 365–371.
- Polliack, A., Taylor, R., and Bader, D. (1993). Analysis of sweat during soft tissue breakdown following pressure ischaemia. *J. Rehabil. Res. Dev.* *30*, 250–259.
- Polliack, A., Taylor, R., and Bader, D. (1997). Sweat analysis following pressure ischaemia in a group of debilitated subjects. *J. Rehabil. Res. Dev.* *34*, 303–308.
- Pompeii, L.A., Lipscomb, H.J., Schoenfisch, A.L., and Dement, J.M. (2009). Musculoskeletal injuries resulting from patient handling tasks among hospital workers. *Am. J. Ind. Med.* *52*, 571–578.
- Pottecher, J. (2012). *Muscle squelettique et ischémie-reperfusion expérimentale des membres : mécanismes impliqués dans la protection ou les effets délétères de la cyclosporine et facteurs limitant les conditionnements pharmacologique et ischémique* (Strasbourg).
- Rebbeck, R.T., Karunasekara, Y., Board, P.G., Beard, N.A., Casarotto, M.G., and Dulhunty, A.F. (2014). Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *48*, 28–38.
- Reddy, N.P. (1990). Effects of Mechanical Stresses on Lymph and Interstitial Fluid Flows. In *Pressure Sores - Clinical Practice and Scientific Approach*, D.L. Bader, ed. (London: Macmillan Education UK), pp. 203–220.
- Reddy, N.P., and Cochran, G.V. (1981). Interstitial fluid flow as a factor in decubitus ulcer formation. *J. Biomech.* *14*, 879–881.
- Reddy, N.P., and Patel, K. (1995). A mathematical model of flow through the terminal lymphatics. *Med. Eng. Phys.* *17*, 134–140.
- Reffellmann, T., and Kloner, R.A. (2002). The “no-reflow” phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart* *87*, 162–168.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemblyt, N., et al. (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *160*, 919–928.

- Ring, E.F.J., and Ammer, K. (2012). Infrared thermal imaging in medicine. *Physiol. Meas.* 33, R33-46.
- Rodriguez, G.P., and Claus-Walker, J. (1988). Biochemical changes in skin composition in spinal cord injury: a possible contribution to decubitus ulcers. *Paraplegia* 26, 302–309.
- Rodriguez, G.P., Claus-Walker, J., Kent, M.C., and Garza, H.M. (1989). Collagen metabolite excretion as a predictor of bone- and skin-related complications in spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 70, 442–444.
- Rubin, R., Strayer, D.S., Rubin, E., and McDonald (M.D.), J.M. (2008). *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Salcido, R., Popescu, A., and Ahn, C. (2007). Animal models in pressure ulcer research. *J. Spinal Cord Med.* 30, 107–116.
- Sanders, J.E., and Goldstein, B.S. (2001). Collagen fibril diameters increase and fibril densities decrease in skin subjected to repetitive compressive and shear stresses. *J. Biomech.* 34, 1581–1587.
- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., and Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C1248-1257.
- Sasidharan, A., Panchakarla, L.S., Sadanandan, A.R., Ashokan, A., Chandran, P., Girish, C.M., Menon, D., Nair, S.V., Rao, C.N.R., and Koyakutty, M. (2012). Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 8, 1251–1263.
- Saumet, J.L. (2005). [Cutaneous vasodilation induced by local pressure application: modifications in diabetes]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 189, 99–105; discussion 105-106.
- Scelsi, R. (2001). Skeletal muscle pathology after spinal cord injury: Our 20 year experience and results on skeletal muscle changes in paraplegics, related to functional rehabilitation. *Basic Appl Myol* 11, 75–85.
- Scelsi, R., Scelsi, L., Bocchi, R., and Lotta, S. (1995). Morphological changes in the skin microlymphatics in recently injured paraplegic patients with ilio-femoral venous thrombosis. *Paraplegia* 33, 472–475.
- Schoonhoven, L., Haalboom, J.R.E., Bousema, M.T., Algra, A., Grobbee, D.E., Grypdonck, M.H., Buskens, E., and prePURSE study group. The prevention and pressure ulcer risk score evaluation study (2002). Prospective cohort study of routine use of risk assessment scales for prediction of pressure ulcers. *BMJ* 325, 797.
- Seo, M.-D., Enomoto, M., Ishiyama, N., Stathopoulos, P.B., and Ikura, M. (2015). Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 1980–1991.
- Serantoni, V., Jourdan, F., Louche, H., and Sultan, A. (2018). Thermomechanical analysis of the surface vascular system – Application to the diabetic foot. p.
- Serra, R., Caroleo, S., Buffone, G., Lugarà, M., Molinari, V., Tropea, F., Amantea, B., and de Franciscis, S. (2014). Low serum albumin level as an independent risk factor for the onset of pressure ulcers in intensive care unit patients. *Int. Wound J.* 11, 550–553.
- Shabshin, N., Zoizner, G., Herman, A., Ougortsin, V., and Gefen, A. (2010). Use of weight-bearing MRI for evaluating wheelchair cushions based on internal soft-tissue deformations under ischial tuberosities. *J. Rehabil. Res. Dev.* 47, 31–42.
- Shahwan, S. (2015). Management and Prevention of Diabetic Pressure Ulcers with Neuropathy. *Gen. Med. Open Access* 3, 1–3.
- Shats, V., and Kozacov, S. (1996). [Is diabetes mellitus a risk factor for pressure ulcers?]. *Harefuah* 131, 485–486, 535.

- Shekarforoush, S., Fatahi, Z., and Safari, F. (2016). The effects of pentobarbital, ketamine-pentobarbital and ketamine-xylazine anesthesia in a rat myocardial ischemic reperfusion injury model. *Lab. Anim.* 50, 179–184.
- Shi, C., Dumville, J.C., and Cullum, N. (2018). Support surfaces for pressure ulcer prevention: A network meta-analysis. *PLoS One* 13, e0192707.
- Shi, H., Xie, H., Zhao, Y., Lin, C., Cui, F., Pan, Y., Wang, X., Zhu, J., Cai, P., Zhang, H., et al. (2016). Myoprotective effects of bFGF on skeletal muscle injury in pressure-related deep tissue injury in rats. *Burns Trauma* 4, 26.
- Shoham, N., and Gefen, A. (2012). Deformations, mechanical strains and stresses across the different hierarchical scales in weight-bearing soft tissues. *J. Tissue Viability* 21, 39–46.
- Silva, N.A., Sousa, N., Reis, R.L., and Salgado, A.J. (2014). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.* 114, 25–57.
- Sin, T.K., Pei, X.M., Teng, B.T., Tam, E.W., Yung, B.Y., and Siu, P.M. (2013). Oxidative stress and DNA damage signalling in skeletal muscle in pressure-induced deep tissue injury. *Pflugers Arch.* 465, 295–317.
- Siperstein, M.D., Raskin, P., and Burns, H. (1973). Electron microscopic quantification of diabetic microangiopathy. *Diabetes* 22, 514–527.
- Siu, P.M., Teng, B.T., Pei, X.M., and Tam, E.W. (2011). Proteasome inhibition alleviates prolonged moderate compression-induced muscle pathology. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 58.
- Skoda, M., Dudek, I., and Szukiewicz, D. (2016). Potential and Challenges of Graphene in Medicine. In *Graphene-Based Materials in Health and Environment: New Paradigms*, G. Gonçalves, P. Marques, and M. Vila, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 3–33.
- Sloan, R.C., Rosenbaum, M., O'Rourke, D., Oppelt, K., Frasier, C.R., Waston, C.A., Allan, A.G., and Brown, D.A. (2011). High doses of ketamine-xylazine anesthesia reduce cardiac ischemia-reperfusion injury in guinea pigs. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* 50, 349–354.
- Slowikowski, G.C., and Funk, M. (2010). Factors associated with pressure ulcers in patients in a surgical intensive care unit. *J. Wound Ostomy Cont. Nurs. Off. Publ. Wound Ostomy Cont. Nurses Soc.* 37, 619–626.
- Smit, M.J., Beekhuis, H., Duursma, A.M., Bouma, J.M., and Gruber, M. (1988). Catabolism of circulating enzymes: plasma clearance, endocytosis, and breakdown of lactate dehydrogenase-1 in rabbits. *Clin. Chem.* 34, 2475–2480.
- Smith, A., Hayes, G., Romaschin, A., and Walker, P. (1990). The role of extracellular calcium in ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J. Surg. Res.* 49, 153–156.
- Smith, I.L., Nixon, J., Brown, S., Wilson, L., and Coleman, S. (2016). Pressure ulcer and wounds reporting in NHS hospitals in England part 1: Audit of monitoring systems. *J. Tissue Viability* 25, 3–15.
- Smith, J.S., Imagawa, T., Ma, J., Fill, M., Campbell, K.P., and Coronado, R. (1988). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 92, 1–26.
- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D.G., and Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?
- Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., and Pae, H.-O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol.* 528, 27–48.
- Sopher, R., Nixon, J., Gorecki, C., and Gefen, A. (2010). Exposure to internal muscle tissue loads under the ischial tuberosities during sitting is elevated at abnormally high or low body mass indices. *J. Biomech.* 43, 280–286.

- Srikanthan, P., Hevener, A.L., and Karlamangla, A.S. (2010). Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PLoS One* 5, e10805.
- Stekelenburg, A., Oomens, C., and Bader, D. (2005). Compression-Induced Tissue Damage: Animal Models. In *Pressure Ulcer Research*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 187–204.
- Stekelenburg, A., Strijkers, G.J., Parusel, H., Bader, D.L., Nicolay, K., and Oomens, C.W. (2007). Role of ischemia and deformation in the onset of compression-induced deep tissue injury: MRI-based studies in a rat model. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 102, 2002–2011.
- Stojadinovic, O., Minkiewicz, J., Sawaya, A., Bourne, J.W., Torzilli, P., de Rivero Vaccari, J.P., Dietrich, W.D., Keane, R.W., and Tomic-Canic, M. (2013). Deep tissue injury in development of pressure ulcers: a decrease of inflammasome activation and changes in human skin morphology in response to aging and mechanical load. *PLoS One* 8, e69223.
- Suleman, L., and Percival, S.L. (2015). Biofilm-Infected Pressure Ulcers: Current Knowledge and Emerging Treatment Strategies. In *Biofilm-Based Healthcare-Associated Infections: Volume II*, G. Donelli, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 29–43.
- Swain, I. (2005). The Measurement of Interface Pressure. In *Pressure Ulcer Research*, D.L. Bader, C.V.C. Bouten, D. Colin, and C.W.J. Oomens, eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 51–71.
- Swain, I.D., and Bader, D.L. (2002). The measurement of interface pressure and its role in soft tissue breakdown. *J. Tissue Viability* 12, 132–134, 136–137, 140–146.
- Talan, M. (1984). Body temperature of C57BL/6J mice with age. *Exp. Gerontol.* 19, 25–29.
- Teng, B.T., Pei, X.M., Tam, E.W., Benzie, I.F., and Siu, P.M. (2011a). Opposing responses of apoptosis and autophagy to moderate compression in skeletal muscle. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 201, 239–254.
- Teng, B.T., Tam, E.W., Benzie, I.F., and Siu, P.M. (2011b). Protective effect of caspase inhibition on compression-induced muscle damage. *J. Physiol.* 589, 3349–3369.
- VanGilder, C., MacFarlane, G., Meyer, S., and Lachenbruch, C. (2009). Body Mass Index, Weight, and Pressure Ulcer Prevalence: An Analysis of the 2006–2007 International Pressure Ulcer Prevalence™ Surveys. *J. Nurs. Care Qual.* 24, 127.
- VanGilder, C., Lachenbruch, C., Algrim-Boyle, C., and Meyer, S. (2017). The International Pressure Ulcer Prevalence™ Survey: 2006–2015: A 10-Year Pressure Injury Prevalence and Demographic Trend Analysis by Care Setting. *J. Wound Ostomy Cont. Nurs. Off. Publ. Wound Ostomy Cont. Nurses Soc.* 44, 20–28.
- Veliev, F., Han, Z., Kalita, D., Briançon-Marjollet, A., Bouchiat, V., and Delacour, C. (2017). Recording Spikes Activity in Cultured Hippocampal Neurons Using Flexible or Transparent Graphene Transistors. *Front. Neurosci.* 11, 466.
- Vos, G.A., Congleton, J.J., Steven Moore, J., Amendola, A.A., and Ringer, L. (2006). Postural versus chair design impacts upon interface pressure. *Appl. Ergon.* 37, 619–628.
- Wang, Y.-I., and Sanders, J. (2005). Skin Model Studies. In *Pressure Ulcer Research: Current and Future Perspectives*, D.L. Bader, C.V.C. Bouten, D. Colin, and C.W.J. Oomens, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 263–285.
- Wang, Y.-N., and Sanders, J.E. (2003). How does skin adapt to repetitive mechanical stress to become load tolerant? *Med. Hypotheses* 61, 29–35.

- Wang, X., Ge, J., Tredget, E.E., and Wu, Y. (2013). The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat. Protoc.* *8*, 302–309.
- Waning, D.L., Mohammad, K.S., Reiken, S., Xie, W., Andersson, D.C., John, S., Chiechi, A., Wright, L.E., Umanskaya, A., Niewolna, M., et al. (2015). Excess TGF- β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat. Med.* *21*, 1262–1271.
- Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S.R., and Marks, A.R. (2004). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* *94*, e61-70.
- Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S., van der Nagel, R., Morales, R., Sun, J., Cheng, Z., Deng, S.-X., de Windt, L.J., Landry, D.W., et al. (2005). Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9607–9612.
- Weiner, C., Alperovitch-Najenson, D., Ribak, J., and Kalichman, L. (2015). Prevention of Nurses' Work-Related Musculoskeletal Disorders Resulting From Repositioning Patients in Bed: Comprehensive Narrative Review. *Workplace Health Saf.* *63*, 226–232; quiz 233.
- Wenk, J., Foitzik, A., Achterberg, V., Sabiwalsky, A., Dissemond, J., Meewes, C., Reitz, A., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Meyer-Ingold, W., et al. (2001). Selective pick-up of increased iron by deferoxamine-coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase 1 and lipid peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro: a new dressing concept. *J. Invest. Dermatol.* *116*, 833–839.
- Wert, L.A. de, Bader, D.L., Oomens, C.W.J., Schoonhoven, L., Poeze, M., and Bouvy, N.D. (2015). A new method to evaluate the effects of shear on the skin. *Wound Repair Regen.* *23*, 885–890.
- Westby, M.J., Dumville, J.C., Soares, M.O., Stubbs, N., and Norman, G. (2017). Dressings and topical agents for treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst. Rev.* *6*, CD011947.
- Widgren, U., Wretman, C., Lionikas, A., Hedin, G., and Henriksson, J. (2000). Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflugers Arch.* *441*, 317–322.
- Williams, A.J., Thomas, N.L., and George, C.H. (2018). The ryanodine receptor: advances in structure and organization. *Curr. Opin. Physiol.* *1*, 1–6.
- Witherspoon, J.W., and Meilleur, K.G. (2016). Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol. Commun.* *4*.
- Witkowski, J.A., and Parish, L.C. (1982). Histopathology of the decubitus ulcer. *J. Am. Acad. Dermatol.* *6*, 1014–1021.
- Wu, S., Applewhite, A.J., Niezgodna, J., Snyder, R., Shah, J., Cullen, B., Schultz, G., Harrison, J., Hill, R., Howell, M., et al. (2017). Oxidized Regenerated Cellulose/Collagen Dressings: Review of Evidence and Recommendations. *Adv. Skin Wound Care* *30*, S1–S18.
- Wu, Y., van der Schaft, D.W.J., Baaijens, F.P., and Oomens, C.W.J. (2016). Cell death induced by mechanical compression on engineered muscle results from a gradual physiological mechanism. *J. Biomech.* *49*, 1071–1077.
- Yamamoto, T., Yamamoto, N., Azuma, S., Todokoro, T., and Koshima, I. (2013). Handy thermography for bedside evaluation of pressure ulcer. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* *66*, e205-206.
- Yang, J.-J., Wang, X.-L., Shi, B.-W., and Huang, F. (2013). The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor-basic fibroblast growth factor signaling is up-regulated in a rat pressure ulcer model. *Anat. Rec. Hoboken NJ* *2007* *296*, 1161–1168.

Yuchi, Z., Yuen, S.M.W.K., Lau, K., Underhill, A.Q., Cornea, R.L., Fessenden, J.D., and Petegem, F.V. (2015). Crystal structures of ryanodine receptor SPRY1 and tandem-repeat domains reveal a critical FKBP12 binding determinant. *Nat. Commun.* 6, 7947.

Zalk, R., Clarke, O.B., des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., and Marks, A.R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517, 44–49.

Zhang, Y., Zhou, L., and Miller, C.A. (1998). A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2586–2591.

Zhi, X., Fang, H., Bao, C., Shen, G., Zhang, J., Wang, K., Guo, S., Wan, T., and Cui, D. (2013). The immunotoxicity of graphene oxides and the effect of PVP-coating. *Biomaterials* 34, 5254–5261.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 509–517.

Résumé

L'escarre est une pathologie liée à l'immobilité des patients, accidentelle ou associée à des comorbidités. Les premières lésions apparaissent dans le muscle avant de se développer en plaie cutanée sans que les mécanismes physiopathologiques de cette atteinte ne soient connus. **L'objectif principal de cette thèse était d'identifier des voies de signalisation intervenant de manière précoce dans le développement des escarres à travers une étude transversale.** Nous formulons l'hypothèse qu'une compression externe induit une altération de l'homéostasie calcique musculaire par atteinte des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique (les récepteur de la ryanodine de type 1, RyR1) conduisant à la lésion du tissu musculaire et une inflammation du tissu sous-cutané.

Sur un modèle animal de compression de 2 heures, à 100 mmHg, nous avons identifié une initiation des voies apoptotiques et une augmentation du stress oxydant des muscles de la paroi abdominale. Le RyR1 est hyper-nitrosylé et hyper-oxydé et sa protéine régulatrice, calstabin1, se dissocie sous l'action de ce remodelage. Fonctionnellement, ces altérations se traduisent par une fuite calcique du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol. Cette dysfonction n'est pas réversible à 3 jours post-compression mais il est possible de la prévenir en traitant les souris avec un rycal qui bloque la déplétion de la calstabin1.

En clinique, chez une cohorte de patients paraplégiques, porteurs d'escarres, nous avons identifiés un remodelage du RyR1 dans les muscles paralysés et une hypoxie des tissus sous la lésion médullaire. La dissociation de la calstabin1 au RyR1 a pu être corrélée à l'intensité des pressions externes appliquées sur la zone sacrée du patient allongé en regard du muscle biopsié.

Ce travail de thèse précise les voies de signalisation de la cellule musculaire squelettique en amont de la survenue d'escarre. Une compression externe augmente le stress oxydant, remodèle le RyR1 et une dysfonction du canal à cause de la perte de l'interaction RyR1/calstabin1. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes sur des traitements préventifs pharmacologiques et de suivi non-invasif qui permettront de retarder l'apparition des escarres.

Abstract

Pressure ulcer is a pathology related to patient immobility, which can be either accidental or incidental to comorbidities. The first damage are located in muscles before developing in cutaneous breakdown per an unclear pathophysiology. **The core objective of my PhD was to identify the early signaling pathways involved in pressure ulcer development, through a transversal study.** We hypothesized that muscle compression will induce a calcium imbalance in muscle cells by a dysfunction of calcium channels from the sarcoplasmic reticulum (Ryanodine receptor isoform 1, RyR1) which will lead to muscle damage and sub-cutaneous inflammation.

Mice model of a 100 mmHg, 2 hours compression of abdominal muscles was used to identify an initiation of the apoptotic pathway and an increase of oxidative stress. RyR1 is hyper-nitrosylated and hyper-oxidized thus this remodeling induces the depletion of RyR1 stabilizing protein, calstabin1, and the resulting leaky phenotype increase intracellular calcium concentration. This channel functional impairment was not reversible up to 3 days post-compression but it was possible to prevent it through rycal treatment, protecting the binding calstabin1/RyR1.

In a clinical trial, we identified from a paraplegic population with existing pressure ulcers, a RyR1 remodeling in paralyzed muscles and hypoxic tissues below the spinal cord injury. Calstabin1 dissociation was correlated to the mean and peak pressure intensity of external pressure applied over the sacrum skin of the bedridden patient directly above the biopsy location.

This thesis project focuses on early signaling pathways resulting in pressure ulcer in skeletal muscle. A mechanical strain induces an increase of the intracellular redox state, post translational RyR1 modifications and a channel dysfunction because of calstabin1 depletion. The significance of my work is to propose both pharmacology and non-invasive monitoring solutions to prevent first muscle damage in pressure ulcer development.