

Iontophorèse d'un analogue de la prostacycline pour améliorer la cicatrisation des ulcères liés à une dysfonction microvasculaire cutanée

Yann Savina

▶ **To cite this version:**

Yann Savina. Iontophorèse d'un analogue de la prostacycline pour améliorer la cicatrisation des ulcères liés à une dysfonction microvasculaire cutanée. Dermatologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAS006 . tel-03092265

HAL Id: tel-03092265
https://theses.hal.science/tel-03092265

Submitted on 2 Jan 2021

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Yann SAVINA

Thèse dirigée par **Matthieu ROUSTIT (EDISCE)**, UGA

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie cardiovasculaire et respiratoire**

dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement**

Iontophorèse d'un analogue de la prostacycline pour améliorer la cicatrisation des ulcères liés à une dysfonction microvasculaire cutanée

Iontophoresis prostacyclin analogue to improve the healing of ulcers associated with dermal microvascular dysfunction

Thèse soutenue publiquement le **05/04/2019**
devant le jury composé de :

Madame le Pr. Dominique, SIGAUDO-ROUSSEL
PU, Université de Lyon, Rapporteur
Monsieur le Dr. Guillaume, WALTHER
MCU, Université d'Avignon, Rapporteur
Madame le Pr. Anne-Laure, BOREL
PU-PH, CHU de Grenoble, Membre
Monsieur le Dr. Julien, VOUILLARMET
Dr, CHU de LYON, Membre
Monsieur le Pr. Jean-Luc, CRACOWSKI
PU-PH, CHU de Grenoble, Président

Remerciements

Matthieu, un grand merci tout d'abord pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné la chance et l'opportunité de travailler sur ce sujet dans le cadre de ma thèse. Ça a été un plaisir et aussi un véritable enrichissement tant sur le plan professionnel que personnel d'avoir pu évoluer à tes côtés durant ces trois dernières années. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour les nombreux conseils que tu as pu m'apporter.

Jean-Luc, je te remercie pour tes enseignements et tes précieux conseils tout au long de ces trois années. Ton partage généreux sur ta vision de la recherche ainsi que, d'un point de vue plus personnel, sur les relations humaines me seront, j'en suis persuadé, très utiles.

Sylvain, je me souviens très bien de mon premier jour dans le laboratoire, où, hésitant entre le vouvoiement et le tutoiement, je t'ai suivi pour réaliser mes premières « manip' », et tant d'autres ensuite ont suivies ! Merci pour ton encadrement, tes conseils avisés et surtout pour ton amitié.

Au Pr. Dominique Sigaudo-Roussel, merci pour ta franchise, ta disponibilité et pour tes nombreux conseils, depuis ton laboratoire Lyonnais ou bien depuis l'autre bout du monde.

Merci à Audrey, Sophie, Sandrine, Emeline pour avoir toujours été présentes. Merci de votre patience et de vos nombreuses explications dans vos réponses à mes questions, très souvent, de débutant !

Et merci à tous les membres du laboratoire pour vos conseils, mais aussi pour tous ces moments de détente, ces discussions et ces quelques parties de ping-pong.

Et enfin, Merci : à ma famille et à mes amis d'avoir toujours été présents malgré tant de moments passés loin de vous et de weekend à vous dire « *dans un mois tu verras je serai dispo !* ». L'aboutissement de ce travail est en grande partie grâce à vous et à la belle énergie que vous avez toujours su me partager. Merci !!!

Avant-propos

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la cicatrisation de plaies cutanées en conditions pathologiques. En effet, certains contextes physiopathologiques sont à l'origine de retard de cicatrisation, induisant une diminution de la qualité de vie des patients et, dans le pire des cas, pouvant aboutir à des complications graves, telle que l'amputation du membre atteint.

Nous nous sommes intéressés à deux pathologies développant des ulcères cutanés chroniques : la sclérodermie systémique et le diabète. Bien que possédant des physiopathologies différentes, ces deux maladies sont caractérisées par une atteinte vasculaire, et plus spécifiquement par une dysfonction microvasculaire. Il est maintenant bien connu que la microcirculation à un rôle clef dans la cicatrisation. Afin de stimuler ces structures, les traitements pharmacologiques actuels des troubles trophiques s'effectuent principalement par l'administration systémique de molécules ayant des propriétés vasodilatatrices et impliquées dans les mécanismes cicatriciels. Toutefois cette méthode d'administration expose le patient à de nombreux effets indésirables inhérents à cette classe médicamenteuse (hypotension, nausée, maux de crâne..). De plus, nécessitant un suivi médical, ce type d'administration est réalisé en structure hospitalière durant plusieurs heures selon la molécule administrée.

Afin d'améliorer la qualité de vie des patients atteints d'ulcères chroniques tout en améliorant leur délai de cicatrisation, notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années au développement d'une administration locale de molécules. Notre choix s'est porté sur l'administration iontophorétique d'un analogue de le prostacycline, le tréprostinil. En effet, suite à plusieurs études de screening de molécules par notre équipe, le tréprostinil est ressorti comme étant le meilleur candidat dans le traitement des ulcères cutanés. De son côté l'iontophorèse permet l'administration locale de molécules chargées par courant électrique. Cette méthode permet d'obtenir un effet pharmacologique local fort tout en diminuant la dose donnée au patient et son possible passage systémique.

Se basant sur ces études, l'objectif de cette thèse a été d'évaluer l'efficacité de l'administration iontophorétique d'un analogue de PGI_2 sur la cicatrisation d'ulcères cutanés

sur deux modèles murins pathologiques. Vous trouverez dans le corps de ce document, les résultats obtenus sur ces différents modèles, tout d'abord concernant la sclérodermie systémique puis le diabète, présentés sous forme d'articles scientifiques.

En parallèle, nous nous sommes aussi intéressés à une autre approche pharmacologique dans le traitement des troubles microvasculaires diabétiques (Annexe 1 : Impact d'une inhibition locale de l'époxyde hydrolase soluble sur la dysfonction microvasculaire cutanée diabétique - sEHDerme) ainsi qu'à l'effet conjugué d'une comorbidité diabétique, le SAOS, sur la cicatrisation cutanée (Annexe 2 : Impact de l'hypoxie intermittente sur la cicatrisation d'ulcères cutanés ischémiques et excisionels sur un modèle murin diabétique – SASFOOT).

Résumé en français

La cicatrisation est un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs. En contexte pathologique, ces processus peuvent être altérés, entrainant un retard de cicatrisation et l'augmentation du risque de survenue de complications.

Durant cette thèse, par une approche préclinique, nous nous sommes intéressés à la cicatrisation d'ulcères cutanés dans deux pathologies : la sclérodermie systémique et le diabète. La sclérodermie systémique est une maladie relativement rare, caractérisée par une atteinte microvasculaire combinée à une fibrose cutanée. De son côté le diabète est une maladie plus fréquente caractérisée par une hyperglycémie chronique étant à l'origine de nombreuses complications. Bien que ces deux pathologies soient différentes d'un point de vue physiopathologique, elles possèdent toutes deux une altération de leur fonction endothéliale ainsi qu'un retard de cicatrisation. Ce contexte physiopathologique augmente la survenue de complications de la cicatrisation, pouvant dans le pire des cas aboutir à l'amputation du membre atteint.

Nous avons tenté dans ce travail de thèse de valider l'utilisation de l'iontophorèse de tréprostinil, un analogue de la PGI_2, dans le traitement de ces ulcères cutanés.

Succinctement, l'iontophorèse est une technique d'administration locale de molécules chargées au moyen d'un courant électrique. De plus, il est reconnu que le courant électrique a un effet positif propre sur la cicatrisation cutanée. Nous avons donc tenté de combiner l'effet pharmacologique du médicament administré avec cet effet courant.

Les deux études principales de ce travail ont pu mettre en évidence la faisabilité et la validation du traitement par iontophorèse d'un analogue de la prostacycline d'ulcères cutanés dans un contexte sclérodermique et diabétique.

D'autres études précliniques devront toutefois être menées afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces améliorations de cicatrisation.

Mots clés : Iontophorèse, prostacycline, cicatrisation, diabète, sclérodermie systémique.

Summary in english

Wound healing is a complex processes composed with a lot of actors. In pathological context, these processes could be altered may lead to wound healing delay and increasing incidence of complications.

During this thesis, my fundamental works focused on wound healing in two pathologies: systemic scleroderma and diabetes. Systemic scleroderma is a rare pathology characterized by a microvascular alteration and cutaneous fibrosis. On a other hand, diabetes is characterized by chronic hyperglycemia would induced numerous complications. These two pathologies are physio-pathologically differences. However they are both characterized by an endothelial dysfunction and wound healing delay. This context increase incidence of wound healing complications, and sometimes lead to an amputation.

My work has tried to validate the use of iontophoresis of treprostinil, a prostacycline analogue, in the treatment on skin wound healing.

Briefly, iontophoresis is a local method of drugs administration with electric current. Moreover, it's well known that current alone has a positive impact on wound healing too.

We tried to combine in this thesis the pharmacological effect of an analogue of prostacycline with this of the current alone.

Both mains studies showed the feasibility and validation of the treatment by iontophoresis of a prostacycline analogue on wound healing in these two pathologies.

Furthers studies will be necessary to highlight mechanisms involved in this improvement.

Key words : Iontophoresis, prostacyclin, wound healing, diabetes systemic scleroderma.

Table des illustrations

Figure 1 : Vue tridimensionnelle d'une coupe de peau.
Figure 2 : Figure d'une coupe transversale de l'épiderme avec ses 4 différentes couches.
Tableau 3 : Classification des fibres nerveuses sensorielles.
Figure 4 : Innervation cutanée.
Figure 5 : La microcirculation cutanée.
Figure 6 : Exemples d'anastomoses artério-veineuses.
Figure 7 : Les structures vasculaires.
Figure 8 : Figure des voies vasodilatatrices chez le sujet sain.
Figure 9 : a) Microcirculation péri-unguéales saine et sclérodermique ; b) Vidéocapillaroscope.
Figure 10 : Résolution spatiale du LDF et du LDI.
Figure 11 : Laser Speckle Contrast Imaging.
Figure 12 : Mesure de l'oxygénation transcutanée.
Figure 13 : Hyperémie post-occlusive réactionnelle.
Figure 14 : Hyperémie thermique.
Figure 15 : Les étapes de la cicatrisation.
Figure 16 : Illustration de la phase d'inflammation.
Figure 17 : Modèles de migration des kératinocytes.
Figure 18 : La phase de prolifération.
Figure 19 : Critères de classification ACR/EULAR.
Figure 20 : Caractéristiques cliniques de la vasculopathie sclérodermique.
Figure 21 : Physiopathologie de la sclérodermie.
Figure 22 : Les différents stades de la sclérodermie systémique.
Figure 23 : Nombre estimé de personnes atteintes de diabète au niveau mondial.
Figure 24 : Méta-analyse en réseau.
Figure 25 : Effets de la stimulation de PKC suite à une hyperglycémie.
Figure 26 : Principales cibles pharmacologiques dans le traitement des ulcères digitaux.
Figure 27 : La synthèse des prostanoïdes.
Figure 28 : Voies d'action de la prostacycline dans la paroi vasculaire.
Figure 29 : AUC des pourcentages de cicatrisation des IPKO vs WT.
Figure 30 : Représentation du transport iontophorétique.
Figure 31 : Profil d'ionisation du tréprostinil.
Figure 32 : Courant électrique endogène au niveau d'un ulcère.
Figure 33 : Les 3 principaux types de courant.
Figure 34 : Voie de signalisation de la vasodilatation induite par le courant.

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique.
AC : Adenylate cyclase.
AC : Courant alternatif.
Ach : Acétylcholine.
ADP : Adenosine diphosphate.
AGE : Produit de glycation avancée.
AGPI : Acides gras poly-insaturés.
ASIC3 : Acid-Sensing Ion Channel 3.
ATP : Adenosine Triphosphate.
AVAs : Anastomoses artério-veineuses.
cAMP : Adénosine MonoPhosphate cyclique.
cGMP : Guanosine MonoPhosphate cyclique.
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide.
CIV : Vasodilatation induite par le courant.
CML : Cellules Musculaires Lisses.
COX : Cyclooxygenase.
CTGF : Facteur de croissance du tissue conjonctif.
CYP450 : cytochrome P450.
DAG : Diacylglycerol.
DC : Courant continu.
DFU : Plaie du pied diabétique.
dSSc : Sclérodermie cutanée diffuse.
EDCF : Facteurs Endothéliaux de Contraction.
EDHF : Facteurs Hyperpolarisants Endothéliaux.
EETs : Acides éicosatriénoiques.
EGF : Facteur de croissance épidermique.
EI : Effets indésirables.
eNOS : NO-synthase endothéliale.
ET-1 : Endothéline-1.
FGF : Facteur de croissance fibroblastique.
FiO_2 : Fraction inspirée en oxygène.
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.
HI : Hypoxie intermittente.
HIF-1 : Facteur induit par l'hypoxie 1.
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire.
HVPC : Courant de type pulsé de haut voltage.
ICAM : Molécule d'adhésion inter-cellulaire.
IL : Interleukine.
IPr : Récepteur IP
IRS : Récepteur à l'insuline.

ISSc : Sclérodermie cutanée limitée.
LDF : Laser Doppler Fluxmètre.
LDI : Imagerie par Laser Doppler.
LOX : Lipoxygénase.
LSCI : Imagerie par contraste à granularité laser (SPECKLE).
LTH : Hyperémie thermique locale.
LVPC : Courant pulsé de faible voltage.
MCP 1 : Protéine chimiotractante des monocytes 1.
MEC : Matrice Extra-Cellulaire.
MMP : Metalloproteinase Matricielle.
NADPH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
NO : Monoxyde d'azote.
NPCs : Cellules souches nerveuses.
PACAP : Pituitary Cyclase Activating Polypeptide.
PAI : Inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène.
PARP : poly(ADP-ribose) polymérase.
PC : Courant pulsé.
PDE-5 : Phosphodiestérase-5.
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes.
PG: Prostaglandine.
PGH_2S : Prostaglandine H_2 synthase.
PGI_2 : Prostacycline.
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase.
PKC : Protéine Kinase C.
PLA : Phospholipase A2.
PORH : Hyperémie post-occlusive réactionnelle.
PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes.
PTGS : Prostaglandine-endoperoxyde synthase.
RAGE : Récepteur aux produits de glycation avancée.
ROS : Espèces réactives de l'oxygène.
SaO_2 : Saturation artérielle en oxygène.
SAS : Syndrome d'apnée du sommeil.
SC : Stratum Corneum.
sEH : Epoxyde hydrolase soluble.
sGC : Guanylate Cyclase soluble.
SNP : Nitroprussiate de sodium.
SOD : Superoxyde dismutase mitochondriale.
SSc : Sclérodermie Systémique.
$TcPO_2$: Oxygénation transcutanée.
TGFβ : Facteur de croissance transformant β.
TIMP : Inhibiteur des MMP ("Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase").
TNFα : Facteur de nécrose tumorale.

tPA : Activateur Tissulaire du Plasminogène.
TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid.
TXA : Thromboxane A.
uPA : Activateur Tissulaire de l'Urokinase.
VCAM : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires.
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Plan

Remerciements 3
Avant-propos 5
Résumé en français 7
Summary in english 8
Table des illustrations 9
Liste des abréviations 10
Introduction 15
1 Microcirculation et cicatrisation cutanée 17
1.1 La peau 17
1.1.1 Les structures de la peau 18
1.1.2 L'innervation cutanée 22
1.1.3 La microcirculation cutanée 23
1.2 Outils et méthodes d'exploration de la microcirculation 29
1.2.1 Les outils 29
1.2.2 Les tests de réactivité microvasculaire 33
1.3 Microcirculation cutanée et cicatrisation saine 36
1.3.1 1ère étape : l'hémostase 36
1.3.2 2e étape : la phase inflammatoire 38
1.3.3 3e phase : phase de prolifération ou de granulation 39
1.3.4 4e phase : le remodelage 41
2 Dysfonction microvasculaire et atteinte des processus de cicatrisation 42
2.1 La sclérodermie systémique 42
2.1.1 Définition, classification et épidémiologie 42
2.1.2 Physiopathologie de l'atteinte microcirculatoire et de l'ulcère sclérodermiques 44
2.2 Le diabète 47
2.2.1 La plaie du pied diabétique (DFU) 48
2.2.2 Atteinte structurale de la microcirculation cutanée 48
2.2.3 Dysfonction microvasculaire associée au diabète 49
2.3 Traitements actuels des ulcères du diabète et de la sclérodermie 56
2.3.1 Les traitements locaux 57
2.3.2 Les traitements médicamenteux systémiques des ulcères de la sclérodermie 57
3 Utilisation de l'iontophorèse d'analogue de la PGI_2 dans le traitement des ulcères cutanés 59
3.1 Dysfonction de la voie de la prostacycline et cicatrisation 59
3.1.1 De l'acide arachidonique aux prostacyclines 59
3.1.2 Prostacyclines, fonction endothéliale, et cicatrisation 61
3.1.3 Utilisation d'analogues de la PGI_2 en thérapeutique et effets indésirables 66

3.2 Approche locale : intérêt de l'iontophorèse 66
3.2.1 Mécanismes d'action 67
3.2.2 Facteurs influençant l'iontophorèse 68
3.2.3 Avantages et limites de l'iontophorèse 71
3.3 Courant électrique et cicatrisation 72
3.3.1 Effets cellulaire du courant électrique 72
3.3.2 Courant électrique et cicatrisation 74
3.3.3 Courant électrique et PGI_2 75
Hypothèses et objectifs de travail 77
Partie 1 : Iontophoresis of treprostinil promotes wound healing in murine models of scleroderma-related ulcers. 79
Partie 2 : Iontophoresis of treprostinil promotes wound healing in murine models of diabetes 99
Conclusion 123
Annexes 135
Références 179

Introduction

1 Microcirculation et cicatrisation cutanée

1.1 La peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain. D'une épaisseur allant de 0,5 mm (paupières, mamelon, pavillon de l'oreille) à 2,5 mm en moyenne (membres, thorax, paume), voire 4 à 5 mm au niveau de la plante des pieds, elle représente près de 10 à 15% du poids total du corps humain pour une surface de 1.2 à 2.3 m². Elle est constituée d'une structure en multi-feuilles lui conférant plusieurs fonction essentielles[1,2](Figure 1).

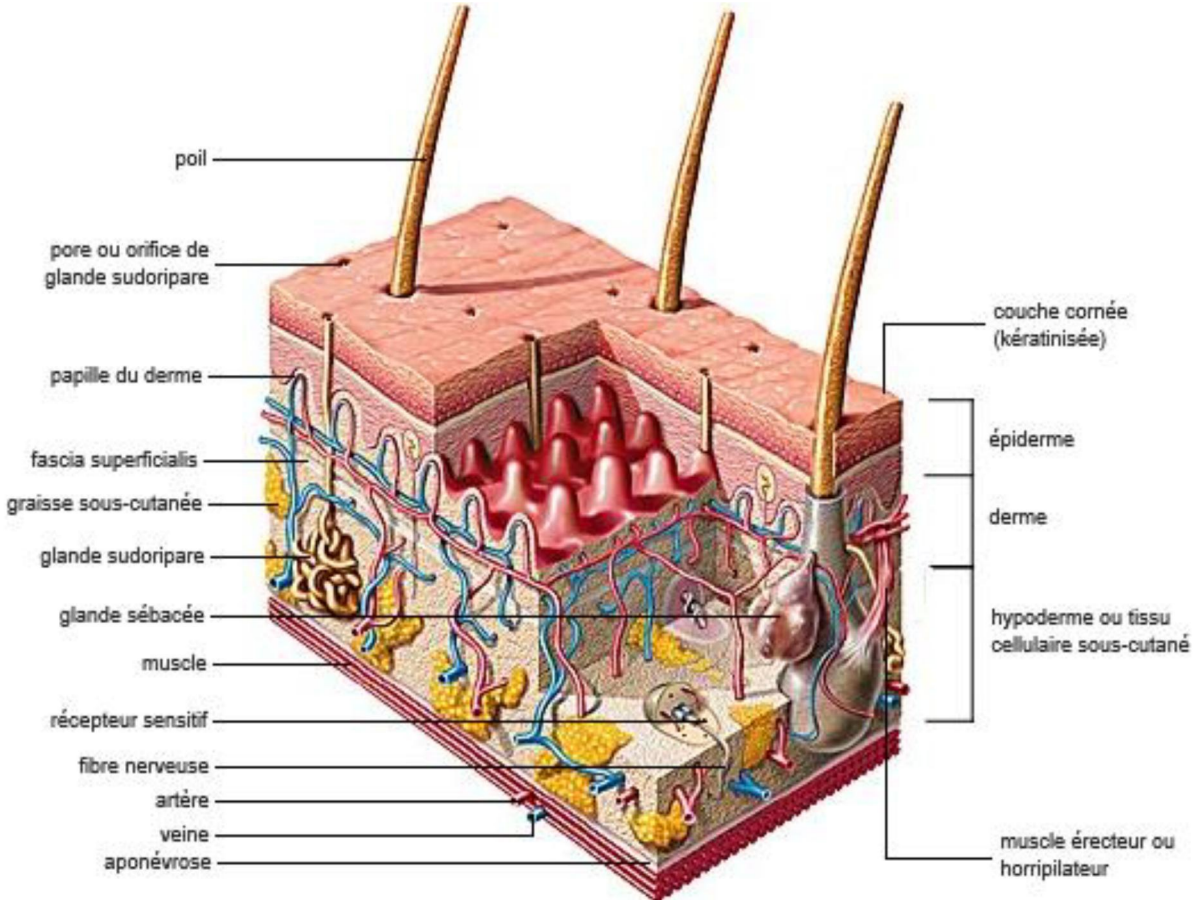


Figure 1 : Vue tridimensionnelle d'une coupe de peau[3]

La première fonction de la peau est de constituer une barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur de notre corps. Cette membrane semi-perméable va préserver le milieu intérieur des bactéries, champignons et autres micro-organismes, des radiations, des traumatismes ou encore des toxines chimiques auxquelles elle pourrait faire face. Elle va également permettre d'éviter une fuite des liquides corporels.

En plus d'une fonction de barrière physique, la peau assure la première ligne de défense contre les microorganismes de par son pH acide (4.7 à 5.6) et son renouvellement perpétuel qui limite la fixation des pathogènes[5]. De plus, les cellules immunitaires la constituant (cellules de Langerhans) interviennent dans la réponse immunitaire de l'organisme[6].

Pourvues de nombreux récepteurs sensoriels et richement innervée, la peau a également un rôle essentiel dans la perception de notre environnement, en ayant la capacité de percevoir, et parfois de réagir, à des stimuli mécaniques (toucher, pression), chimiques, ou thermiques (chaleur, froid)[7–9]. La thermorégulation est en effet une fonction vitale, qui permet de maintenir une homéothermie. Différents mécanismes physiologiques sont impliqués, au premier rang desquels la vasomotricité de la microcirculation cutanée[10].

La peau a aussi une fonction métabolique, l'hypoderme étant une réserve d'énergie sous la forme de triglycérides[11]. La peau participe aussi à la synthèse de vitamine D[12].

Enfin la peau va jouer un rôle particulièrement important dans les relations sociales. En effet, elle constitue la première image que nous renvoyons aux autres, notre gestuelle, nos humeurs, ayant des conséquences psychosociales non négligeables[13].

1.1.1 Les structures de la peau

La peau se décompose en couches superposées (l'épiderme, le derme et l'hypoderme) qui se distinguent par des structures cellulaires et des fonctions propres.

1.1.1.1 *L'épiderme*

L'épiderme est un épithélium pluristratifié d'environ 1 mm d'épaisseur, non vascularisé (ni vaisseaux sanguins, ni vaisseaux lymphatiques) mais qui renferme de nombreuses terminaisons nerveuses. Son apport en nutriment se fait par diffusion depuis le derme. Première barrière contre les agressions extérieures, il est constitué à hauteur de 80% de kératinocytes (lieu de synthèse de la kératine), tandis que le reste se partage entre les mélanocytes (lieu de synthèse de la mélanine, responsable de la pigmentation cutanée et impliqué dans la protection face aux rayons ultraviolets), les cellules de Langerhans (impliquées dans la défense immunitaire) et les cellules de Merkel (rôle de mécanorécepteur). Le renouvellement de l'épiderme se réalise par différenciation des kératinocytes

(kératinisation), qui aboutit à une couche cornée constituée de cellules mortes anucléées et aplaties qui desquament à la surface de la peau.

On distingue 4 couches au sein de l'épiderme (Figure 2).

La couche basale (*stratum basale*), ou germinative, est la couche la plus profonde de l'épiderme. C'est le compartiment prolifératif[14] responsable du renouvellement des cellules de la peau. Composée d'une seule couche de kératinocytes prismatique ou cubiques, ces cellules vont se diviser continuellement en deux cellules filles : l'une va migrer vers la couche épineuse tandis que l'autre va rester dans la couche basale afin de continuer ce processus de renouvellement.

La couche épineuse (*stratum spinosum*) est constituée d'une superposition de 5 à 6 strates de kératinocytes qui vont s'aplatir au fur et à mesure de leur migration vers la couche granuleuse.

La couche granuleuse (*stratum granulosum*) est formée d'environ 3 strates de kératinocytes aplatis, fusiformes et disposés parallèlement à la surface cutanée[15].

Et enfin la couche cornée (ou *stratum corneum* - *SC*) est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est constituée de 5 à 10 strates de cellules dépourvues de noyaux, très aplaties et très kératinisées. Les kératinocytes appartenant au *SC* vont subir leur dernière différenciation et deviendront des cornéocytes. Les plus périphériques se détacheront du *SC* par desquamation[16].

L'ensemble de ce processus se réalise en 30 à 45 jours chez l'Homme.

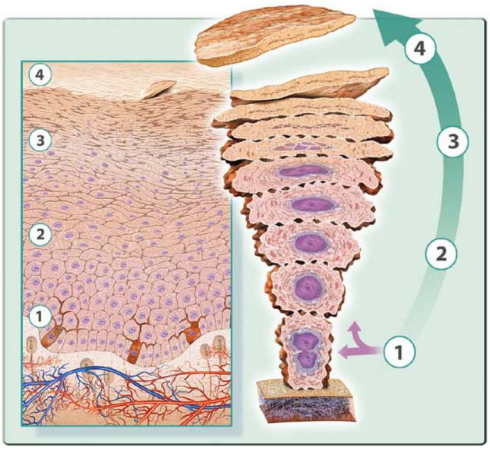


Figure 2: Schéma d'une coupe transversale de l'épiderme avec ses 4 différentes couches et les différents stades de la différentiation des kératinocytes. 1) couche basale, 2) couche granuleuse, 3) couche épineuse et 4) stratum corneum[17]

1.1.1.2 *La jonction dermo-épidermique*

Le derme et l'épiderme sont séparés par une membrane basale délimitant les papilles dermiques par ses ondulations. Cette structure permet d'augmenter considérablement la surface d'échange dermo-épidermique et de s'adapter à ses étirements.

La jonction dermo-épidermique est une mince couche située entre le stratum basale et le derme. Elle est constituée à la fois de kératinocytes et de fibroblastes dermiques[18]. Elle joue un rôle fondamental dans le support mécanique de l'épiderme (lieu d'adhésion des kératinocytes de la couche basale), mais aussi en tant que barrière sélective dans le contrôle des échanges de produits métaboliques entre les 2 compartiments et le passage de certains types cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes) lors de processus immunitaires et inflammatoires.

1.1.1.3 *Le derme*

Le derme, en moyenne 4 fois plus épais que l'épiderme, est un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique. C'est une couche richement vascularisée et innervée qui renferme les annexes de la peau (glandes sudoripares, glandes sébacées et follicules pileux). Il joue un rôle fondamental dans le développement et la croissance de l'épiderme[19], ainsi que dans sa différenciation[20]. Il est composé de cellules, essentiellement les fibroblastes, et d'une matrice extracellulaire constituée de molécules fibreuses (collagène et élastine) baignant dans une substance amorphe nommée substance fondamentale (glycoprotéines de structure, protéoglycanes et glycosaminoglycanes). De plus, le derme héberge un important réseau vasculaire assurant la nutrition de l'épiderme et des nerfs permettant les perceptions cutanées.

Le derme est constitué de 2 parties :

Le derme superficiel (ou derme papillaire) est un tissu conjonctif lâche qui s'insinue entre les ondulations de la jonction dermo-épidermique, formant les papilles dermiques. Principalement composé de fibres élastiques et de collagène disposé en un réseau peu dense et irrégulier[21], cette matrice est riche en cellules (fibroblastes, mastocytes et dendrocytes) et sert de support aux fibres nerveuses ainsi qu'aux capillaires sanguins et lymphatiques, qui constituent un véritable tissu nourricier pour l'épiderme par diffusion[22].

Le derme profond (derme réticulaire), qui représente les 4/5 de l'épaisseur du derme, se différencie du derme papillaire par un tissu conjonctif plus dense de faisceaux épais de fibres de collagène et d'élastine, et toujours la présence de fibroblastes[23]. Ces fibres s'orientent parallèlement à la surface de la peau afin d'en accroître la résistance mécanique[24].

Les cellules présentes dans le derme peuvent être regroupées en 2 catégories. La première est composée de fibroblastes. Ce sont des cellules mobiles et fusiformes ayant un rôle fondamental dans la synthèse et la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire (MEC) (collagène, élastine ou la substance fondamentale), d'enzymes (les métalloprotéïnases matricielles - MMPs), des inhibiteurs de ces enzymes (« Tissue Inhibitor of MetalloProteinases » - TIMPs), ainsi que de facteurs de croissance. Les fibroblastes sont aussi très importants dans le cadre de la cicatrisation : en cas d'agression, ils vont être capables de se multiplier en un tissu indifférencié très vascularisé appelé « bourgeon charnu » ou « tissu de granulation ». C'est à partir de ce bourgeon charnu que les différentes couches de la peau vont pouvoir se différencier et reconstituer la peau lésée. Le second groupe concerne les cellules migratoires impliquées dans les mécanismes de défense et de réponse immunitaires : leucocytes, mastocytes, macrophages.

1.1.1.4 *L'hypoderme*

L'hypoderme est la partie la plus profonde de la peau et repose sur les aponévroses musculaires ou directement sur le périoste osseux. C'est un tissu conjonctif lâche, vascularisé et innervé. Il est constitué en grande partie d'adipocytes formant une réserve énergétique à l'organisme. Ce tissu adipeux est aussi impliqué dans la thermorégulation et la protection mécanique contre certains stress environnementaux (écrasement par exemple).

Il varie énormément en fonction du sexe, de l'âge et le mode de vie des individus[25]. On y retrouve les follicules pileux, les glandes sudoripares ainsi que des capteurs sensibles à la chaleur, à la pression et au toucher.

1.1.2 L'innervation cutanée

La peau, organe sensoriel par excellence, permet de ressentir et d'appréhender notre environnement proche. Pour cela, elle est pourvue d'un système nerveux dense et varié appartenant au système nerveux périphérique. L'innervation cutanée peut être divisée en 2 parties : la voie afférente ou sensitive, et la voie efférente.

La voie afférente transmet des informations au système nerveux central sur des sensations mécaniques (pression, vibration, toucher, frottement), thermiques et nociceptives[26,27]. Cette innervation n'est pas distribuée de manière homogène dans le corps, expliquant que certaines zones soient plus sensibles que d'autres (à l'exemple de la pulpe des doigts, richement innervé). Deux plexus nerveux permettent cette distribution : le plexus profond (à la jonction dermo-hypodermique) et le plexus superficiel (à la jonction dermo réticulo-papillaire). Les nerfs sensoriels sont classés en 4 catégories en fonction de leur diamètre, de la quantité de myéline et de leur conductance. Afin de faciliter la lecture, les caractéristiques de chacun d'entre elles sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Type de fibres	Myélinisation	Vitesse de conductance (m/s)	Diamètre (µm)	Fonction
Aα	Myélinisée	80 - 120	13 - 20	Motricité, proprioception
Aβ	Myélinisée	35 - 90	6 - 12	Toucher, pression, vibration
Aδ	Myélinisée	5 - 40	1 - 5	Douleur, température
C	Amyélinisée	0.5 - 2	0.2 – 1.5	Douleur, température

Tableau 3 : Classification des fibres nerveuses sensorielles. Adapté de [28]

A l'extrémité de ces fibres se trouvent des récepteurs sensoriels. Ils peuvent être libres ou organisés en corpuscules (Figure 4). Les structures corpusculaires sont principalement de type mécanorécepteurs. On y retrouve les corpuscules de Meissner (sensation tactiles fines), de Ruffini et de Pacini (pression et étirement cutanée) et les disques de Merkel (pressions légères et sensibilité fine)[29,30]. Les terminaisons libres sont quant à elles impliquées dans la mécanoréception, la nociception et la thermoception.

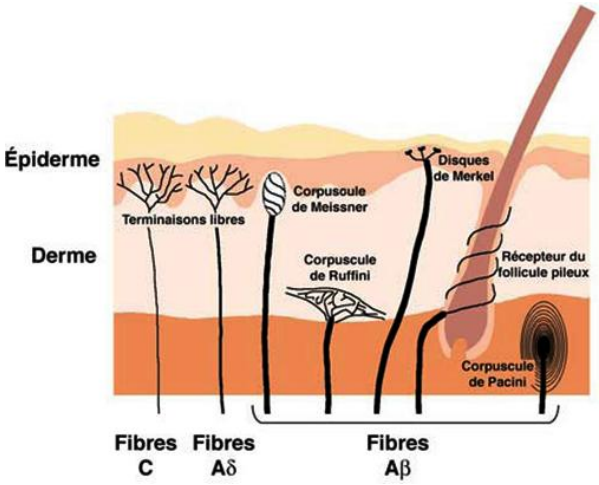


Figure 4 : innervation cutanée[31]

La voie efférente concerne le système nerveux somatique (contrôle des muscles squelettiques) et autonome (système sympathique et parasympathique, impliquée dans l'innervation des organes internes, les glandes et les vaisseaux sanguins). Les systèmes parasympathique et sympathique vont avoir, bien que souvent opposées, des actions complémentaires. Par l'intermédiaire de neurones adrénergiques (système sympathique) ou cholinergique (système parasympathique et sympathique dans le cas de la microcirculation), ils vont permettre certaines régulations physiologiques fines telles que la vasomotricité et la thermorégulation.

1.1.3 La microcirculation cutanée

1.1.3.1 *Structure et fonction*

La peau, comme tous les organes du corps, possède un système vasculaire propre. De par sa faible épaisseur, ce système appartient à la microcirculation. Elle assure 4 fonctions principales[32–35] :

- La nutrition et la perfusion tissulaire de la peau et des annexes cutanées.
- La régulation de la pression artérielle systémique.
- La thermorégulation.
- Et l'adaptation contre des attaques mécaniques telles que des périodes d'ischémie prolongées dû au poids du corps.

La microcirculation est constituée de vaisseaux de petite taille allant des artérioles et des veinules (entre 10 à 300 µm) aux capillaires (environ 6 µm)[36,37], répartis sur 2 couches parallèles à la surface de la peau : le plexus profond et le plexus superficiel (ou papillaire) (Figure 5).

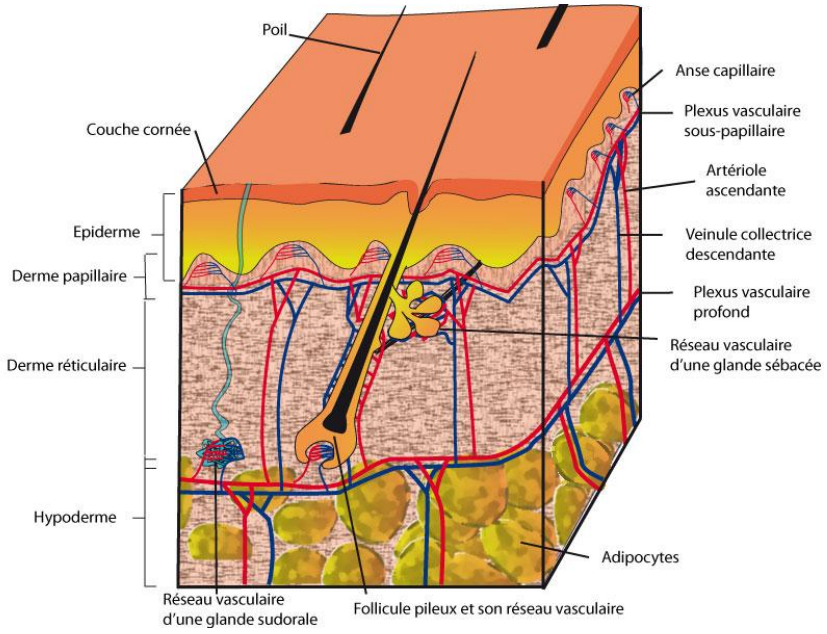


Figure 5 : La microcirculation cutanée[38]

Le plexus superficiel est situé au niveau du derme papillaire. C'est à ce niveau que se trouvent les anses capillaires, qui constituent le réseau nutritif de l'épiderme. Il est connecté au plexus profond, situé à la jonction dermo-hypodermique, par des artérioles ascendantes et des veinules descendantes. Ce second plexus permet l'alimentation des glandes sudoripares, des follicules pileux et des différentes structures du derme. Le plexus profond est quant à lui alimenté par des artères cutanées situées dans un réseau hypodermique plus profond.

Ce réseau complexe, aussi appelé « lit vasculaire », est pourvu d'anastomoses artério-veineuses (AVAs) (Figure 6). Ces AVAs sont situées entre les artérioles et les veinules et agissent comme de véritables courts-circuits, en permettant le passage direct du sang des artérioles aux veinules. Elles jouent ainsi un rôle primordial dans les ajustements de débit sanguin et sont fortement impliqués dans la thermorégulation[39]. Il existe plusieurs types d'AVAs : certaines sont des vaisseaux courts, très innervés et pourvus de nombreuses cellules musculaires lisses (CML) ; d'autres sont de forme glomérulaire, et régulent le flux sanguin grâce à la présence de sphincters pré-capillaires.[40]

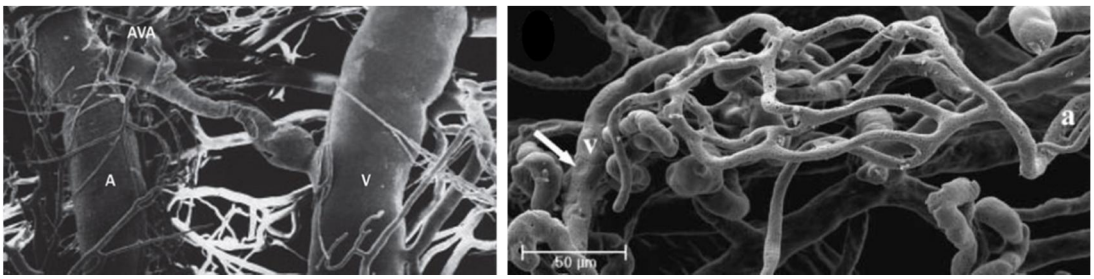


Figure 6 : Exemples d'anastomoses artério-veineuses directe (gauche) ou gloémrulaire (droite). A : artériole ; V : veinule. Issu de[40]

Chaque vaisseau sanguin est constitué de 3 tuniques distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur : l'adventice, la média et l'intima (Figure 7). L'adventice est constitué d'élastine, de collagène, de fibroblastes, de mastocytes et de macrophages[41]. Comparée à celle des autres tissus, l'adventice de la microcirculation possède une grande densité de récepteurs nerveux, de nerfs sympathiques et parasympathiques[42]. De plus, ces nerfs sont situés à proximité de la média, qui est constituée de nombreuses CML, expliquant l'importance du système nerveux autonome dans la fonction microvasculaire[43]. De son côté, la média est constituée principalement de CML, permettant le contrôle de la motricité vasculaire. Enfin l'intima, partie en contact avec le sang, est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales. L'agencement de cellules endothéliales entre elle, formant une gaine à l'intérieur du vaisseau, s'appelle l'endothélium.

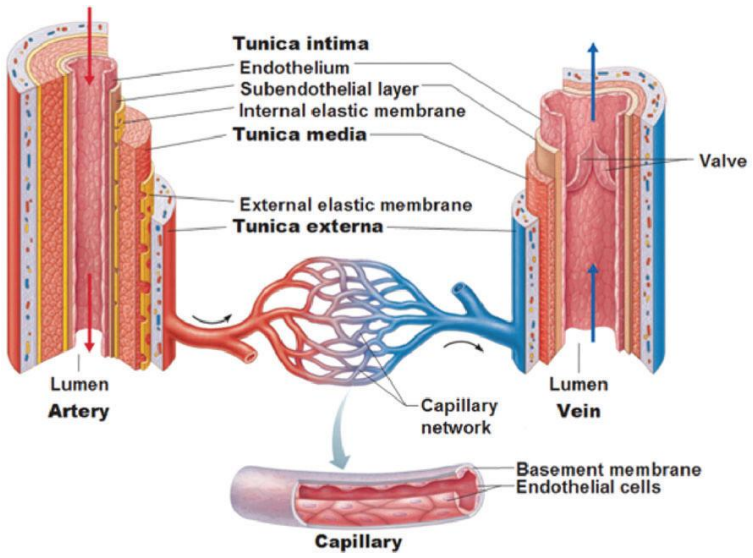


Figure 7 : les structures vasculaires[44]

La constitution et la complexité de ces couches dépend du type de vaisseau sanguin. Par exemple les artérioles sont composées d'une couche de CML très épaisse, richement pourvues de fibres nerveuses permettant les adaptations neuro-vasculaires. Au contraire, les capillaires sont structurés d'une seule couche de cellules endothéliales entourées d'une membrane basale. Ils ne sont pas pourvus de CML mais on peut observer à leur périphérie la présence de nombreux péricytes jouant un rôle dans le maintien structurel des capillaires, la régulation du débit vasculaire ou encore l'angiogénèse[45,46]

1.1.3.2 *Régulation du tonus vasculaire*

La régulation du tonus vasculaire repose sur différents phénomènes physiologiques, parmi lesquels le réflexe myogénique vasculaire ou encore la régulation nerveuse ou endothéliale.

Le réflexe myogénique est décrit comme étant la contraction réflexe d'une cellule musculaire suivant son étirement. Ce processus s'applique aux vaisseaux dont la paroi contient des CML lorsque la pression sanguine augmente, augmentant le diamètre vasculaire et étirant les CML. Cet étirement engendrera l'entrée de Ca^{2+} intracellulaire et leur contraction. Tout en maintenant le tonus vasculaire, ce mécanisme réflexe permet de protéger les vaisseaux de possibles lésions (déchirures, étirements, augmentation de perméabilité vasculaire…)[47].

Le contrôle neuro-vasculaire joue lui aussi un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire. Lorsque les fibres nerveuses sont stimulées (que ce soit avec un stimulus thermique par l'intermédiaire des récepteurs TRPV1[48,49], ou encore de pression par les récepteurs ASIC3[35]), elles vont permettre la libération au niveau artériolaire de différents neuropeptides, tels que le Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), le Pituitary Cyclase Activating Polypeptide (PACAP), et de neurokinines (substance P, NKA, NKB). Ces agents vont avoir une action vasodilatatrice en agissant directement sur les CML (par stimulation de la voie de la guanylate cyclase (GC)) ou par l'intermédiaire de la cellule endothéliale et de la voie du monoxyde d'azote (NO)[43,50].

Les CML et l'endothélium communiquent constamment pour maintenir et adapter le tonus vasculaire. Si l'endothélium était initialement caractérisé comme étant une barrière

semi-perméable inerte et uniforme, il est bien connu maintenant que c'est le lieu principal de modulation de la vasomotricité, par la sécrétion de substances vasorelaxantes et vasoconstrictrices.

Les forces de cisaillements et autres agonistes (tel que l'insuline, l'ATP, l'acétylcholine, l'adénosine, la bradykinine ou encore l'histamine) vont avoir un rôle prédominant dans la régulation de la vasomotricité en libérant des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs[51]. Les facteurs vasodilatateurs regroupent le NO, certaines prostaglandines dont notamment la prostacycline (PGI_2) et les facteurs hyperpolarisants endothéliaux (EDHF) (Figure 8).

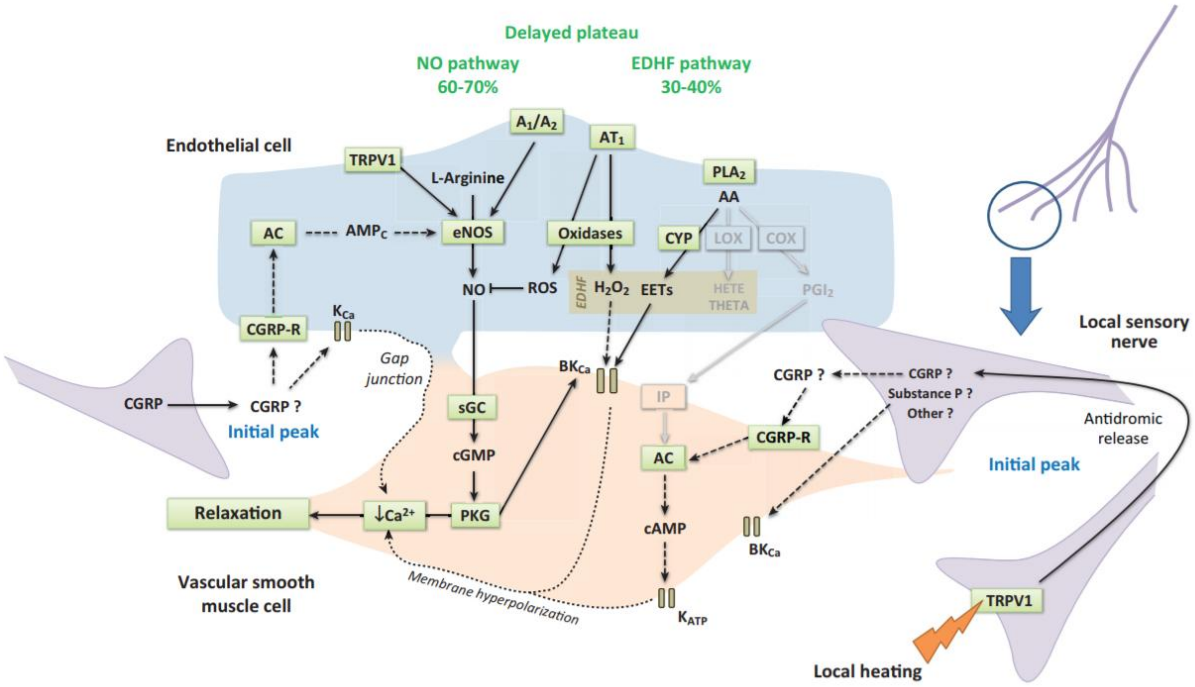


Figure 8 : Les voies vasodilatatrices chez le sujet sain, dans le cas d'un test de réactivité à la chaleur[43]

Les contraintes de cisaillement et les agonistes cités précédemment vont stimuler la synthèse de NO via la voie de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)[51] ainsi que l'activation de la voie de la PGI_2. En effet, l'activation d'une protéine G membranaire suite à ces stimulations engendrera l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire via les canaux potassiques calcium-dépendants[52]**.** Ce calcium intracellulaire permettra de lier la calmoduline à la eNOS déclenchant la synthèse de NO ainsi que la libération d'acide arachidonique (AA)[52,53]**.** Ces AA vont être convertis en prostaglandines (PG) par la prostaglandine H_2 synthase (PGH_2S) suivant un processus en 2 étapes impliquant des

cyclooxygénases et des peroxydases. PTGS1 (prostaglandine-endoperoxyde synthase-1), autrement connu sous le nom de COX-1 (cyclooygénase-1), ainsi que PTGS2, ou COX-2, vont permettre la synthèse de la PGI_2. Une fois synthétisés au sein de la cellule endothéliale, le NO et la PGI2 vont diffuser vers la CML et augmenter la formation de Guanosine MonoPhosphate cyclique (cGMP) et de l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (cAMP), respectivement. L'action de la cGMP et de la CAMP sont identique, à savoir une diminution de la concentration en calcium cellulaire, entrainant la relaxation de la CML d'où une vasodilatation. Il est intéressant de noter que, dans le muscle, la cGMP peut aussi stimuler l'activité de cAMP, augmentant la sensibilité des mécanismes en jeu, et démontrant la synergies des voies impliquées dans la régulation du tonus vasculaire[51]. En condition saine, le NO et la PGI_2 sont dominants dans la vasodilatation microvasculaire.

Les EDHF contribuent aussi à l'induction d'une vasodilatation[43]. Parmi eux, les acides éicosatriénoiques (EETs), sont également des métabolites de l'acide arachidonique, après biotransformation par différents isoformes du cytochrome P450 (CYP). Ces différents éléments vont diffuser jusqu'à la CML et y engendreront une hyperpolarisation cellulaire précédant une relaxation des CML. Toutefois, la présence de NO au sein de la cellule endothéliale inhibera l'action du cytochrome et la synthèse des EETs. Dans ces conditions, la vasodilatation sera préférentiellement induite par la voie du NO. Dans un contexte de non disponibilité du NO, la production de EETs augmentera afin de maintenir une fonction vasculaire normale[54]. La complémentarité de ces voies de stimulation permet de maintenir un endothélium fonctionnel même en contexte pathologique.

Les cellules endothéliales vont aussi sécréter des facteurs vasoconstricteurs, appelés facteurs endothéliaux de contraction (EDCF). Il s'agit principalement de l'endothéline-1 (ET-1), de prostanoïdes tel que le thromboxane A_2, ou encore la prostaglandine H_2[55]. Leur action permet de maintenir un tonus vasculaire constant et d'adapter la vasomotricité en réponse à un stimulus spécifique. Prenons l'exemple de l'insuline. De nombreuses études ont mis en évidence l'action de l'insuline dans l'augmentation de la surface d'échange des capillaires, l'adaptation du flux sanguin vers le réseau microvasculaire nutritif et les modifications de la fonction endothéliale[56,57]. L'activation du récepteur à l'insuline (IRS-1) stimulera la voie de la PI3K entrainant une vasodilatation[58] En effet, *Baron et al.*[59,60] ont été les premiers à reporter l'effet de l'insuline sur la vasodilatation du réseau vasculaire résistif et, par voie de conséquence, l'augmentation du flux sanguin au niveau musculaire. Toutefois cette même stimulation des récepteurs à l'insuline permettra l'activation de la voie Ras/MAPK entrainant

une vasoconstriction par synthèse d'ET-1. En condition physiologique, malgré cette double activation, l'insuline aura un effet vasodilatateur[61]. En contexte pathologique (dysfonction endothéliale, obésité) la vasodilatation induite par l'insuline sera altérée en faveur d'une vasoconstriction endothéline-dépendant, contribuant à la pathologie métabolique[62–64].Dans le contexte diabétique, la diminution du taux d'insuline endogène jouera une rôle dans la dérégulation fonctionnelle de la microcirculation contribuant à l'instauration du cercle vicieux de l'insulino-résistance diabétique[65–67].

Cette balance vasomotrice est cruciale dans le maintien des fonctions cutanées. En effet, cet équilibre permet de favoriser la régulation de facteurs pro-inflammatoires, d'optimiser le recrutement leucocytaire, l'agrégation et l'adhésion plaquettaire ainsi que l'angiogenèse et la prolifération des CML[51]. De fait une dysfonction de la microcirculation cutanée est associée à certaines pathologies, caractérisées notamment par une altération de la cicatrisation.

1.2 Outils et méthodes d'exploration de la microcirculation

Ce chapitre présente quelques-uns des outils et techniques non-invasives utilisés dans l'évaluation de la fonction endothéliale et de la structure microvasculaire.

1.2.1 Les outils

1.2.1.1 *Vidéocapillaroscopie*

La Vidéocapillaroscopie est une technique non-invasive d'exploration de la morphologie, la densité et la fonctionnalité du réseau microvasculaire du pourtour proximal de l'ongle[43,68,69] (Figure 9). Cette technique, très fréquemment utilisée chez l'Homme[70], est réalisée sous microscope à faible grossissement sous lumière froide. Il est ainsi possible de détecter une altération morphologique de la microcirculation traduisant d'une atteinte pathologique[69,71]. En effet, l'examen de la microcirculation péri-unguéale fait partie des évaluations précoces de caractérisation de la sclérodermie systémique (SSc). Une étude récente a défini qu'il était préférable d'examiner le pourtour des 8 ongles (à défaut des pouces) lors d'examens de routine afin d'être certain de ne pas passer à côté d'anomalies et de retarder la découverte de la pathologie[72].

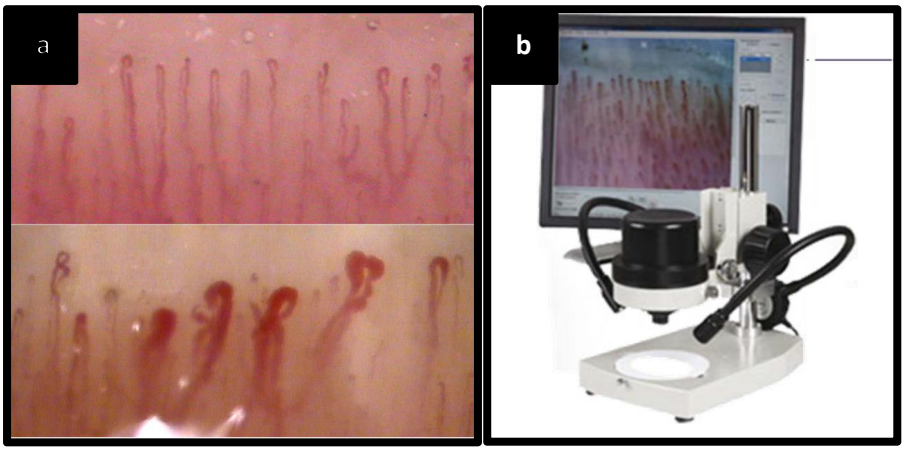


Figure 9 : a) Microcirculation péri-unguéale saine et sclérodermique[70]*. b) Vidéocapillaroscope*[73]

1.2.1.2 *Laser Doppler Flowmetry (LDF) et le Laser Doppler Imaging (LDI)*

Ces 2 outils sont basés sur l'effet Doppler et permettent d'obtenir un index de perfusion microvasculaire[74]. Expliqué simplement, un laser venant au contact des globules rouges, renverra un laser réfléchit d'une longueur d'onde différente qui sera fonction de la quantité de globule rouge et de leur vélocité. Cette longueur d'onde réfléchit, après traitement informatique, donnera un index de la perfusion locale et, par extrapolation, permettra une analyse des flux microvasculaires cutanés.

Le principal avantage de chacun de ces outils est la limite de l'autre (Figure 10). En effet, le LDF possède une très grande résolution temporelle mais se retrouve limité par une très faible résolution spatiale, pouvant être un biais à certaines études. Il permet de mesure en continu la perfusion cutanée sur un volume d'environ 1 mm^3 sous la sonde. D'un autre côté, le LDI, permet tout d'abord de travailler sans contact avec la zone d'étude. De plus, il possède une grande résolution spatiale et une pénétration cutanée allant de 0.5 à 1 mm, mais le temps d'acquisition de cette zone reste long et ne permet pas d'observer de rapides changements microvasculaires[75]. Couplés à certaines méthodes de réactivité vasculaire (PORH, iontophorèse,…), il est ainsi possible d'étudier la fonction microvasculaire de manière non-invasive.

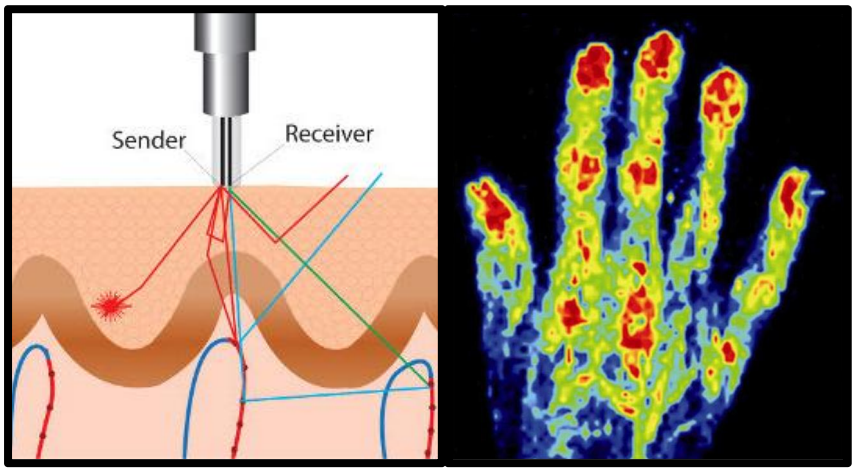


Figure 10 : résolution spatiale du LDF à gauche (adapté de[76]) , et du LDI à droite[73]

1.2.1.3 *Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)*

Comparable au LDI, le LSCI est une méthode d'évaluation de la microcirculation cutanée. Comme son nom l'indique, la technologie speckle repose sur l'analyse du contraste de granularité. Expliqué simplement, un faisceau incident sera envoyé vers la peau. En fonction de la granulation de la zone ciblée, les faisceaux réfléchis ne mettront pas tous le même temps pour revenir jusqu'au capteur, et permettront de créer une image de la granulation de cette zone. En suivant l'évolution de cette granulation dans le temps, il est possible de déterminer des changements structuraux de notre zone d'intérêt. Sa pénétration cutanée est de l'ordre de 300 µm, inférieure à celle du LDI, mais il est important de garder à l'esprit que la profondeur de pénétration est longueur d'onde dépendante[77] et que l'épaisseur cutanée varie en fonction de la zone du corps étudiée. Toutefois, l'avantage principal du LSCI revient au fait qu'il combine une importante résolution spatiale et une acquisition temporelle continue[78]. Sa limite principale reste sa sensibilité au mouvement. Au vu du principe physique en jeu, les flux lumineux ou les mouvements apparaitront comme des artefacts[43] (Figure 11).

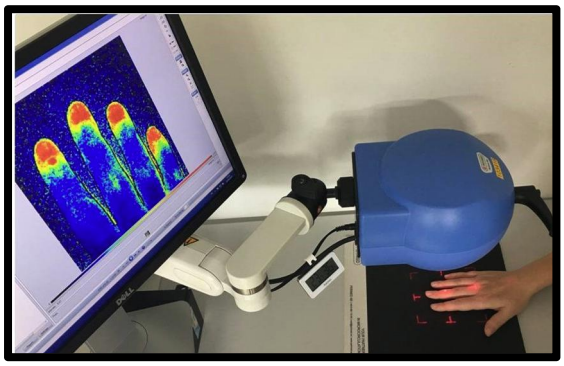


Figure 11 : Laser Speckle Contrast Imaging (Adapté de[79])

1.2.1.4 *L'oxymétrie transcutanée (TcPO2)*

La TcPO2 permet de mesurer la quantité d'oxygène diffusée depuis les capillaires cutanés (Figure 12). Autrement dit, elle fournit une information instantanée et continue de la capacité de l'organisme à fournir de l'oxygène aux tissus et donc de l'état général du système circulatoire. Corrélée aux artériopathies périphériques, la donnée de TcPO2 est reconnu comme étant un facteur prédictif de cicatrisation dans le cas de la plaie du pied diabétique (DFU) et indicateur de risque d'amputation[80]. D'un point de vue plus technique, l'électrode chauffe la peau à 44°c, induisant une vasodilatation par hyperémie thermique et facilitant les échanges à travers la peau. Une électrode de Clark permettra de quantifier la quantité d'oxygène diffusée à travers la peau.

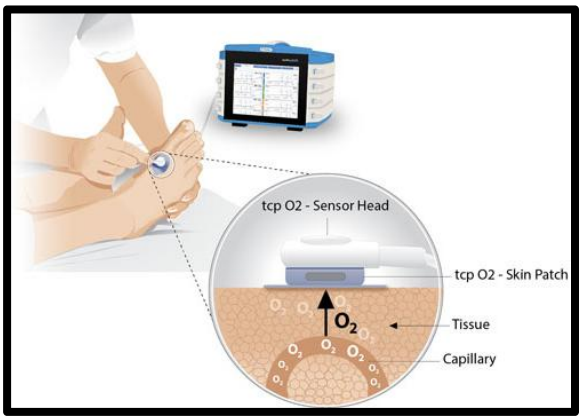


Figure 12 : Mesure de l'oxygénation transcutanée[81]

1.2.2 Les tests de réactivité microvasculaire

1.2.2.1 *L'hyperémie post-occlusive réactionnelle (PORH)*

Le test de PORH donne un index de la vasodilatation endothélium-dépendante au niveau des capillaires de la microcirculation cutanée (Figure 13). Couramment utilisé en clinique, le principe repose sur le placement au niveau de la partie proximale du bras d'un brassard qui sera gonflé durant 5 min à une pression supra- systolique, provoquant une occlusion artérielle. Ce délai peut toutefois varier de 1 à 15 min selon les protocoles[82]. Un suivi doppler[82], ou plus rarement par vidéocapillaroscopie[83], sera réalisé, respectivement, sur l'avant-bras et/ou le doigt ou bien au niveau péri-unguéal. Ce test peut aussi être réalisé au niveau du membre inférieur avec une occlusion au niveau de la cuisse et un suivi doppler au niveau du mollet[84].

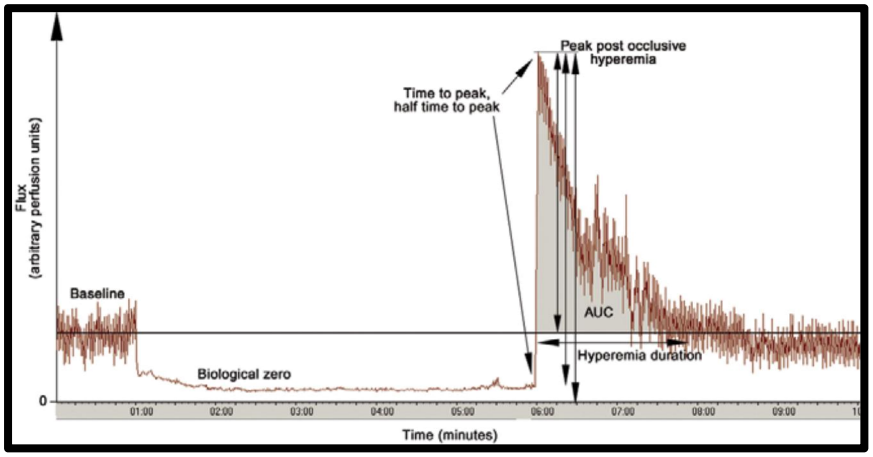


Figure 13 : Hyperémie post-occlusive réactionnelle[82]

Au niveau microvasculaire, plusieurs acteurs participent à la PORH. La réponse nerveuse est le principal d'entre eux. En effet, plusieurs études ont démontrés l'implication nerveuse dans le pic réactionnel de la PORH par blocage pharmacologique[85–88].

Il est intéressant de remarquer que le NO et la voie des PTGS ne semblent pas impliqués dans la réponse hyperémique[35,86,88–91]. En effet, dans une étude de Medow réalisée au niveau du membre inférieur, un blocage de la NOS et l'inhibition de PTGS n'ont pas d'impact sur la PORH[84]. De plus, la voie des prostanoïdes ne semble pas impliquée[86,87] et un blocage du récepteur au thromboxane n'influence pas non plus le test[92]. Au contraire, le PORH semble fortement induit les EDHF puisqu'une inhibition de cette voie entraine une diminution réactionnelle substantielle au test[86,87].

1.2.2.2 *Hyperémie Thermique Locale (LTH)*

La thermorégulation est un mécanisme complexe faisant intervenir la microcirculation cutanée avec l'implication des AVAs, ainsi que différentes voies de régulations. Suite à différents protocoles de chauffage, il est actuellement recommandé d'utiliser une température de sonde entre 42-44°c afin d'obtenir une réponse cutanée optimale sans sensation douloureuse pour les sujets[70,93,94] pendant une durée d'environ 30 min. Au-delà de 45 à 60 min, un effet « die away » apparait et est observable par une diminution du flux microvasculaire[70]. Le LTH se caractérise par une évolution biphasique : une première phase dite « pic » puis une seconde phase appelée « plateau » (Figure 14).

La phase de pic apparait dans les 2 à 3 minutes suivant le début du chauffage[33] et est principalement d'origine nerveuse[95–97], avec une implication plus spécifique des TRPV1[93].

La phase de plateau apparait plus tardivement, soit 20 à 30 minutes après le début du chauffage[33]. Il est maintenant bien connu que cette seconde phase est NO-dépendante[97–99],EDHF-dépendante[100] avec une faible implication du système sympathique[94] et des prostanoïdes[101]. En effet, la part du NO et des EDHF dans la réponse tardive du LTH sont respectivement de 60% et 40%, dont 20% de ce denier imputable aux EETs[100].

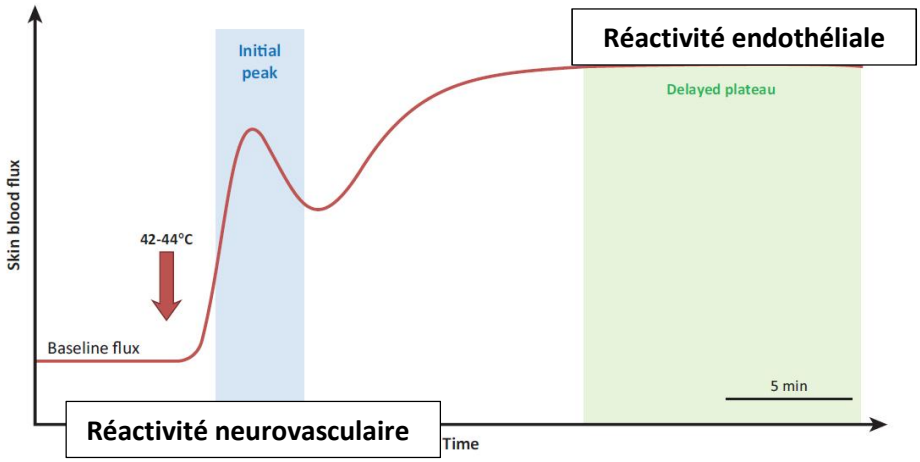


Figure 14 : Hyperémie thermique, adapté de[43]

1.2.2.3 *Iontophorèse d'acétylcholine (Ach) et de Nitroprussiate de Sodium (SNP)*

L'iontophorèse est une technique non-invasive permettant de transporter des molécules chargées au moyen d'un courant électrique de faible intensité[102]. Couplé à un suivi LDI, LDF ou LSCI, il est possible d'observer l'effet de l'administration locale de certaines molécules sur le flux microvasculaire. Généralement deux tests de réactivité vasculaire sont réalisés.

L'iontophorèse de Ach renseigne sur la réactivité endothélium-dépendant[103]. Son action principale sur la cellule endothéliale induira l'activation de la eNOS et la synthèse de NO qui diffusera vers la CML, engendrant sa relaxation et une vasodilatation locale[97].

L'iontophorèse de SNP renseigne sur la réactivité non-endothélium-dépendant[103]. Etant un donneur exogène de NO, il agira directement sur la CML en induisant sa relaxation par activation de la voie du NO [104].

1.2.2.4 *La vasodilatation induite par la pression (PIV)*

La PIV est un mécanisme physiologique de défense contre les pressions cutanées. Aussi bien présent chez l'Homme[105] que chez le rongeur[106,107], il induira une vasodilatation locale limitant l'apparition d'une ischémie tissulaire et la survenue d'ulcères ischémiques. Ce mécanisme est altéré chez des personnes âgées[91] ainsi que dans certains troubles métaboliques tels que le diabète[108], deux populations reconnues à risque dans la survenue d'ulcères ischémiques.

L'évaluation de la PIV se réalise par l'application d'une pression progressive croissante sur la peau au moyen d'un dispositif équipé d'un LDF. Il est ainsi possible de suivre le flux microvasculaire en fonction de l'évolution de la pression appliquée[105]. Le flux sanguin cutané augmentera jusqu'à un maximum avant de décroitre lorsque la pression deviendra plus forte.

Plusieurs voies physiologiques semblent interagir dans ce mécanisme de défense. Principalement impliqués, les nerfs sensoriels, par stimulation des canaux ASIC3[35] et TRPV1[109], permettent de déclencher une cascade de réaction aboutissant à l'activation de la voie du NO et des prostaglandines[106], induisant une relaxation des CML. La voie de l'EDHF ne semble pas impliquée directement mais pourrait toutefois agir lors du vieillissement, suite à l'altération des autres voies vasodilatatrices, afin de maintenir une PIV normale[111].

1.3 Microcirculation cutanée et cicatrisation saine

La microcirculation joue un rôle essentiel dans les apports d'oxygène et de nutriments aux tissus sains. Elle est ainsi indispensable à l'intégrité des tissus ainsi qu'à leur réparation.

La cicatrisation est un mécanisme complexe au cours duquel quatre étapes sont traditionnellement décrites : l'hémostase, la phase inflammatoire, la phase de granulation et la phase de remodelage. Le processus de cicatrisation ne se déroule pas comme une succession de phases indépendantes mais comme un enchevêtrement d'étapes dépendantes les unes des autres[112] (Figure 15). En effet, une coordination fine de ces différents processus est indispensable à la fermeture de la plaie et à la reconstruction d'un tissu sain et fonctionnel.

Une anomalie lors de l'enchainement ou lors d'une des étapes de ce processus peut freiner, voire arrêter le processus de cicatrisation et conduire à la chronicité de la plaie, ayant pour conséquence une augmentation du risque d'infection, un risque de non cicatrisation ou aboutir à des cicatrices pathologiques.

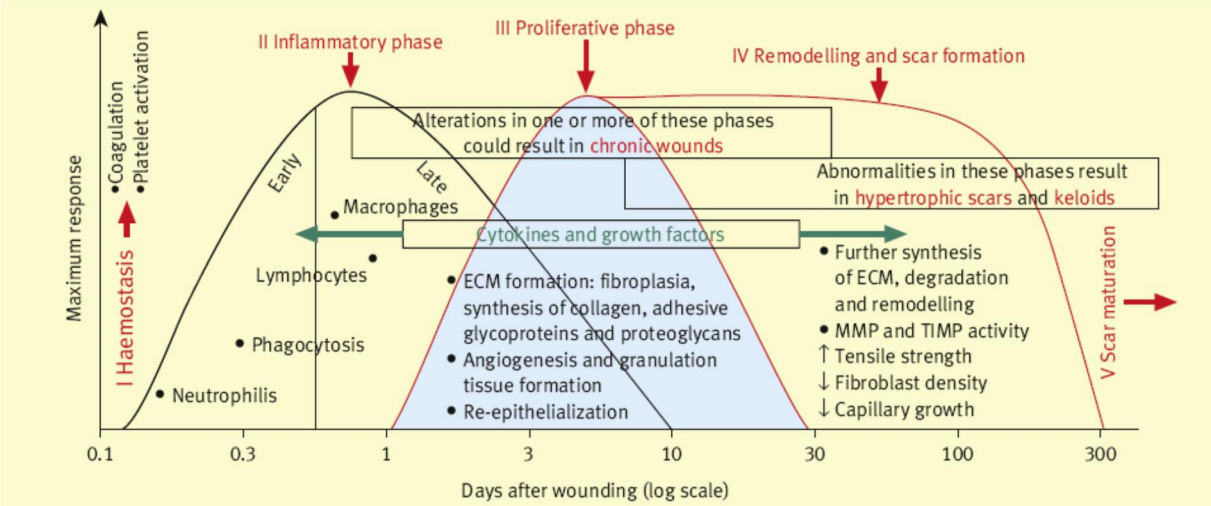


Figure 15 : Les étapes de la cicatrisation[113]

1.3.1 1ère étape : l'hémostase

Il s'agit de la toute première réaction face à une attaque de la barrière cutanée. Une plaie est une porte ouverte vers l'intérieur de notre corps pour tous les pathogènes et représente un risque d'exsanguination. L'hémostase décrit l'ensemble des phénomènes qui a pour but de stopper le saignement au niveau de la plaie[114]. Elle regroupe plusieurs mécanismes, initiés simultanément et liés entre eux(Brass et al., 2005; Furie and Furie).

Le premier est l'hémostase primaire, qui est une phase vasculo-plaquettaire permettant la formation du clou plaquettaire (ou thrombus blanc) et l'activation d'une vasoconstriction réflexe, immédiate et localisée, appelée « spasme vasculaire ». Au niveau de la brèche vasculaire, le sous-endothélium est exposé au sang. Dans une situation normale les plaquettes n'adhèrent pas à l'endothélium des vaisseaux parce que l'endothélium des zones saines produit de la PGI_2 qui inhibe l'agrégation plaquettaire (effet antithrombotique de l'endothélium). Mais lors d'une atteinte vasculaire, elles vont entrer en contact avec le collagène mis à nu des parois vasculaires et des tissus lésés, activant ainsi leur agrégation. Lorsque les plaquettes adhèrent à la paroi vasculaire, elles s'activent et libèrent des cytokines ainsi que de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (tels que le Thromboxane A (TXA), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), l'Adénosine diphosphate (ADP) ou encore la sérotonine).

Cette libération de thromboxane A2 et de sérotonine va entrainer une contraction des cellules musculaires lisses de la média des vaisseaux situés au niveau de la lésion. Cette vasoconstriction permettra de limiter voire d'arrêter l'exsanguination lésionnelle et de protéger l'individu d'une possible hémorragie. En quelques minutes, la diminution du flux sanguin va entrainer une hypoxie tissulaire locale ainsi qu'une acidose. Cette hypoxie induira la libération de métabolites vasoactifs (tels que le NO ou encore l'adénosine) induisant la relaxation des vaisseaux artériels et une vasodilatation [117].

L'hémostase secondaire est quant à elle caractérisée par la structuration du caillot par la fibrine résultant du déclenchement de voies de signalisation de la coagulation[118]. Ces voies vont aboutir à l'activation du facteur X en Xa à l'origine de la synthèse de la Prothrombine en Thrombine. Il en résulte la conversion du fibrinogène en fibrine et la formation du caillot de fibrine au sein du clou plaquettaire[117,119].

Enfin la fibrinolyse a pour but d'empêcher l'extension du caillot sanguin, permettant par la suite sa dissolution, en dégradant le réseau de fibrine[120]. L'acteur principal de la fibrinolyse est la plasmine, enzyme protéolytique issue du plasminogène, substance circulante du sang et synthétisée dans le foie. Elle est capable, afin de dégrader le réseau de fibrine, de détruire le fibrinogène ainsi que d'autres facteurs de coagulation. Le plasminogène est activé en plasmine sous l'action de deux types d'activateurs. D'une part l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), principalement synthétisé par les cellules endothéliales au niveau de la lésion[121]. D'autre part, l'urokinase produite au niveau du caillot sanguin à partir de la pro-urokinase[122].

Cette fibrinolyse est assurée par les cellules endothéliales préalablement activées et par les macrophages qui vont produire de nombreuses MMPs, qui sont des activateurs du plasminogène (et de la plasmine) capables de désagréger les membranes basales, le réseau de fibrine et ses structures environnantes[123]. Les inhibiteurs de la plasmine comme l'α2-macroglobuline[124], l'α2-antiplasmine[125], et les inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1 et le PAI-2)[126] assurent l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse[127].

1.3.2 2e étape : la phase inflammatoire

La phase inflammatoire a pour but d'empêcher l'infection de la plaie par des pathogènes extérieurs suite à la rupture de la fonction barrière de la peau. Comme décrit précédemment, elle est initiée lors de l'hémostase par la libération de cytokines vasoactives et pro-inflammatoires. Son rôle est double puisqu'elle sert à la détersion naturelle de la plaie et à sa protection immunitaire (Figure 16).

Une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire locale vont être médiées par la libération d'histamine par les plaquettes activées, ainsi que par la libération de facteurs vasoactifs lors de la rupture de la barrière endothéliale. En effet, lorsque les membranes des cellules sont lésées, l'acide arachidonique est métabolisé par différentes voies à l'origine de la synthèse de facteurs vasoactifs tels que les prostanglandines (PG), les leucotriènes, les EETs et le thromboxane[118]. De plus, la libération de cytokines facilite le passage des neutrophiles de la circulation sanguine à la zone lésée suivant un gradient chimique (chimiotaxie), augmentant la réponse immunitaire et inflammatoire[128].

Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'élimination des corps étrangers, des agents pathogènes susceptibles de contaminer la plaie, mais également dans la suppression des débris cellulaires et tissulaires[129]. Ils vont par la suite entrer en apoptose ou seront phagocytés par les macrophages. Ces derniers arriveront au niveau de la zone lésée suivant des messagers chimiques et participeront à l'attraction des fibroblastes et des cellules musculaires, interviendront dans la régulation inflammatoire, stimuleront l'angiogénèse et amélioreront la formation du tissu de granulation[118]. En effet, les macrophages représentent un important réservoir de facteurs de croissance (tels que le PDGF, le TGFβ, l'IL1-, TNFα, l'EGF (Facteur de croissance épidermique) ou encore du VEGF)[130]. On observe un pic de concentration de macrophages entre 48 et 72 heures après la lésion.

Une inflammation prolongée peut conduire à un retard de la phase de prolifération, exposant la plaie à un risque accru de chronicisation[117]. En effet, bien que médiée par différents facteurs anti-inflammatoires, la diminution de l'inflammation au cours de la cicatrisation contribue à la mise en place de la phase de prolifération[131].

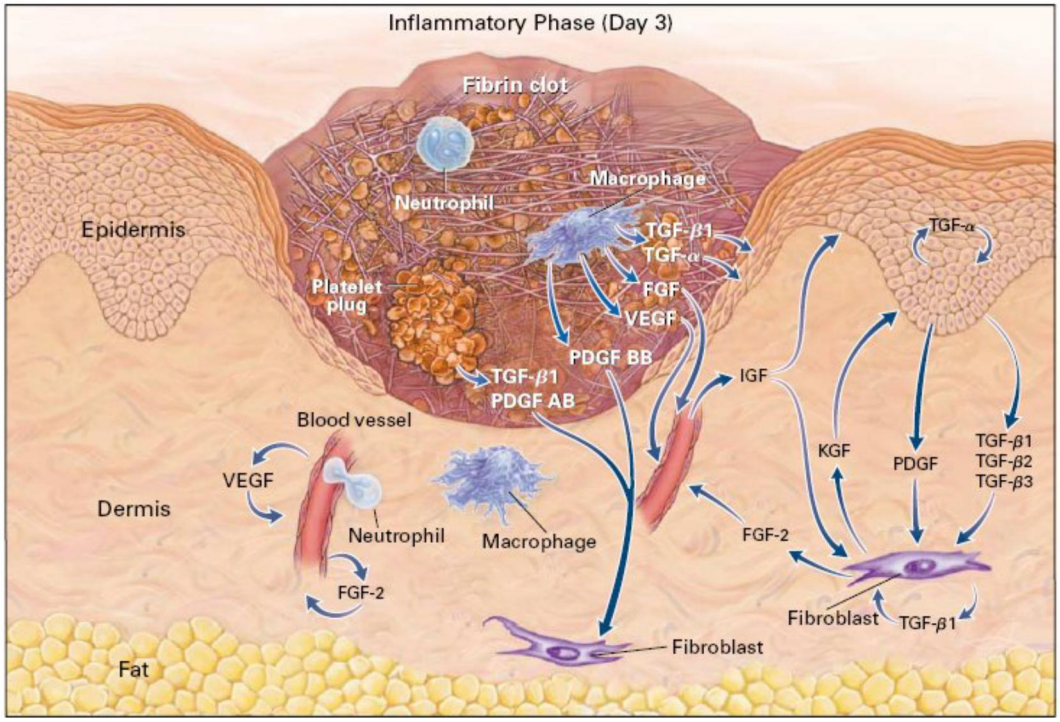


Figure 16: Illustration de la phase d'inflammation[132]

1.3.3 3e phase : phase de prolifération ou de granulation

La stimulation immunitaire et la fermeture précoce de la plaie permettent de limiter les impacts de l'agression perçue. Mais ces adaptations précoces ne sont que temporaires et peu résistantes. Afin de recréer une peau fonctionnelle, des processus de prolifération vont se mettre en place. Trois mécanismes vont interagir : la formation du tissu de granulation, son épidémisation et l'angiogénèse. Cette phase est initiée par des facteurs de croissance et des cytokines libérées par les cellules immunitaires et les plaquettes durant les deux phases précédentes. Elle commence 3 à 4 jours après la formation de la plaie et se poursuit durant deux à 4 semaines.

Lors de la formation du tissu de granulation, les fibroblastes se déplacent vers la plaie grâce aux molécules chimiotactiques produites lors de l'inflammation (FGF, PDGF, TGFβ).

Tout en suivant le réseau de fibrine, les fibroblastes vont le dégrader et constituer à la place un réseau riche en fibronectine et en collagène de type III. Il s'agit de la formation du tissu de granulation[133]. Sous l'effet du PDGF libéré par les plaquettes, les fibroblastes vont se multiplier au niveau de la plaie. Les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales vont sécréter à leur tour des facteurs de croissance[134]. Sous l'effet du TGFβ, les fibroblastes vont progressivement se différencier en myofibroblastes, caractérisés par leur forme allongée[135–137]. Ces myofibroblastes vont, par adhésion de leurs pseudopodes aux protéines matricielles qui les entourent, se contracter et faciliter la fermeture mécanique de la plaie[136,138].

L'étape d'épidermisation a pour but de régénérer une barrière épidermique. Les cellules épithéliales vont migrer à partir des berges de la plaie afin de fermer la zone lésée[139,140]. Cette étape commence de façon précoce après la blessure initiale. Les kératinocytes vont sur-exprimer certaines intégrines (a2b1, a6b4) qui vont faciliter leur migration par une grande affinité avec le collagène et la fibronectine, présents en grande quantité dans le tissu de granulation en cours de formation.

Actuellement deux modèles de migration des kératinocytes sont proposés[141] (Figure 17). Le premier, le modèle « en feuillet » ou par glissement. Les kératinocytes migrent horizontalement jusqu'à ce que la plaie soit complètement recouverte[142,143]. Le second est dit « en saute-mouton » ou par roulement. Les kératinocytes vont migrer les uns par-dessus les autres jusqu'à leur ancrage à la MEC où ils deviennent immobiles[144]. Une fois la totalité de la plaie recouverte, les kératinocytes vont reprendre leur différenciation verticale pour reformer un épiderme sain[145,146].

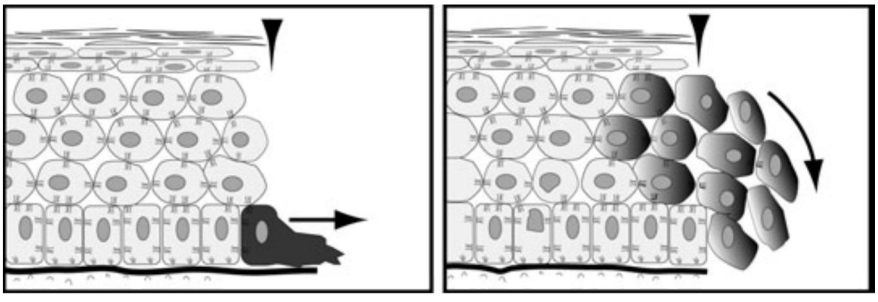


Figure 17 : Modèles de migration des kératinocytes[141]

Enfin la formation de nouveaux vaisseaux est indispensable à la cicatrisation d'une plaie. Elle permet l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules présentes au niveau de la plaie. Elle est déclenchée depuis la création du clou plaquettaire lors de l'hémostase par la

libération de TGFβ, de PDGF et de FGF, et se poursuit jusqu'à la guérison de la plaie. Elle est principalement régulée par les macrophages, les kératynocytes et les cellules endothéliales[133,147]. En réponse à l'hypoxie tissulaire et par l'intermédiaire de HIF-1 (Facteur induit par l'hypoxie 1)[118], les cellules vont sécréter du VEGF, du FGF, du EGF et du TGFβ. L'oxygène apporté par ces nouveaux vaisseaux va se fixer sur HIF-1, bloquant ainsi l'expression du VEGF et régulant l'angiogénèse[118]. Durant la cicatrisation, la zone péri-ulcérée sera donc richement vascularisée donnant une couleur rosée à cette nouvelle peau (Figure 18).

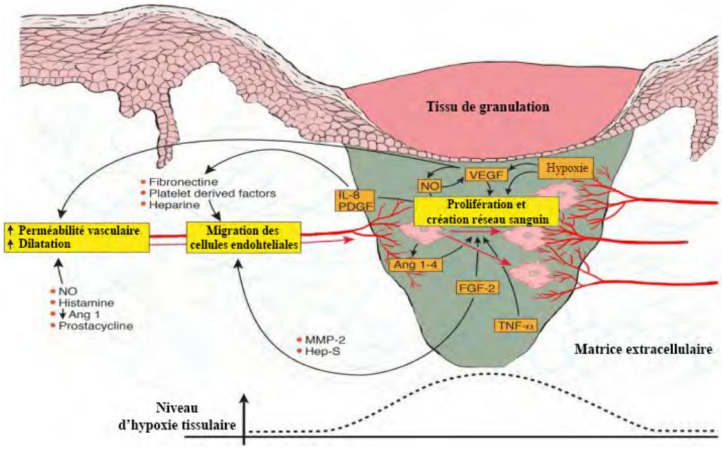


Figure 18 : la phase de prolifération[133]

1.3.4 4e phase : le remodelage

Cette dernière phase du processus de cicatrisation est la plus longue. Elle peut durer de plusieurs semaines à plusieurs mois et permet de finaliser la construction d'une peau saine fonctionnellement et structurellement.

Régulé par les fibroblastes, le processus de dégradation va agir afin de restructurer la MEC par la synthèse et l'activation des MMPs et de leurs inhibiteurs TIMPs. Initialement nécessaires à la migration et à la prolifération cellulaire, la fibronectine, l'acide hyaluronique et le collagène de type III sont progressivement dégradés et remplacés par du collagène de type I, des fibres élastiques et des glycoaminoglycanes constituant une matrice plus résistante à la traction. De plus, l'oxygénation tissulaire ayant retrouvée son niveau physiologique, l'angiogénèse sera moins stimulée, le nombre de vaisseaux créés diminuera mais augmentera en maturité[148,149] observable par une taille plus importante. Cette réorganisation sera visible par une atténuation de la rougeur de la cicatrice.

2 Dysfonction microvasculaire et atteinte des processus de cicatrisation

Dans certains contextes pathologiques, les processus de cicatrisation décrits précédemment sont altérés, engendrant un retard de cicatrisation pouvant aller jusqu'à la perte du membre atteint. Ces anomalies sont dans certains cas étroitement liées à une atteinte de la microcirculation cutanée, qui est à l'origine d'une hypoxie tissulaire.

Nous nous sommes intéressés à deux pathologies qui diffèrent sur le plan physiopathologique, la sclérodermie systémique et le diabète. Pourtant elles sont toutes deux caractérisées par une dysfonction microvasculaire cutanée et par la survenue d'ulcères.

2.1 La sclérodermie systémique

2.1.1 Définition, classification et épidémiologie

La sclérodermie systémique est une maladie auto-immune rare représentant 158 cas/million d'habitants en France[150]. Neuf à quatorze milles patients sont atteints par cette pathologie en France[151,152] pour un ratio femme/homme entre 3/1 et 8/1[150]. Elle se caractérise par une dérégulation du système immunitaire, des lésions vasculaires touchant la micro et macrocirculation[153] et d'une fibrose cutanée et/ou viscérale[154]. La microangiopathie sclérodermique se caractérise par des anomalies de structures et de fonctions vasculaires. Elle est responsable de troubles touchant différentes parties du corps tel que des troubles trophiques des extrémités (ischémie distale et ulcères digitaux), des atteintes vasculaires pulmonaires et cutanées, mais aussi une atteinte rénale, digestive, de l'hypertension artérielle pulmonaire et des atteintes cardiaques[155,156]. L'American College of Rheumatology and l'EUropean Ligue Against Rheumatism (ACR/EULAR) ont défini des critères de classification de la maladie (tableau 19)[157].

Items	Sous-item(s)	Poids/score
Épaississement cutané des doigts des deux mains s'étendant jusqu'aux articulations métacarpophalangiennes (critère suffisant)		9
Épaississement cutané des doigts (ne compter que le score le plus élevé)	Doigts boudinés Sclérodactylie (en distalité des 4 articulations métacarpophalangiennes, mais proximale jusqu'aux articulations interphalangiennes)	2 4
Lésions pulpaires (ne compter que le score le plus élevé)	Ulcères pulpaires Cicatrices pulpaires déprimées	2 3
Télangiectasies	–	2
Anomalies capillaroscopiques	–	2
Hypertension artérielle pulmonaire et/ou atteinte pulmonaire interstitielle (score maximum 2)	Hypertension artérielle pulmonaire Atteinte pulmonaire interstitielle	2 2
Phénomène de Raynaud	–	3
Autoanticorps associés à la SSc (score maximum = 3)	Anti-centromères Anti-topo-isomérase I Anti-ARN polymérase III	3 3 3

*Tableau 19 : Critères de classification ACR/EULAR (*American college of rheumatology *et* European ligue against rheumatism*)*[157]*. Un score de 9 permet d'établir le diagnostic de sclérodermie systémique*.

Ces altérations de la microcirculation cutanée sont impliquées dans la physiopathologie des ulcères digitaux chroniques (Figure 20), qui représentent la principale complication de la vasculopathie sclérodermique. En effet, la prévalence des ulcères digitaux dans la sclérodermie est de l'ordre de 30 à 50%, selon les formes cliniques de la maladie. Dans l'étude EUSTAR de 2006, 43% des patients avec une sclérodermie cutanée diffuse (dSSc) avaient des ulcères contre 33% de ceux ayant une sclérodermie cutanée limitée (lSSc)[158]. Avec un délai moyen de 76.2 jours pour la cicatrisation des ulcères sclérodermiques[159], le risque de complication est important. Les plus fréquentes sont de 2 types[160–162] .

Tout d'abord le risque d'infection. Elle survient dans un tiers des cas, avec l'apparition d'un érythème sensible et extensif, un exsudat purulent et une extension rapide de la nécrose. Deuxièmement, la récidive. Un quart des patients récidivent en moins de 1 an et 32% en moins de 2 ans.

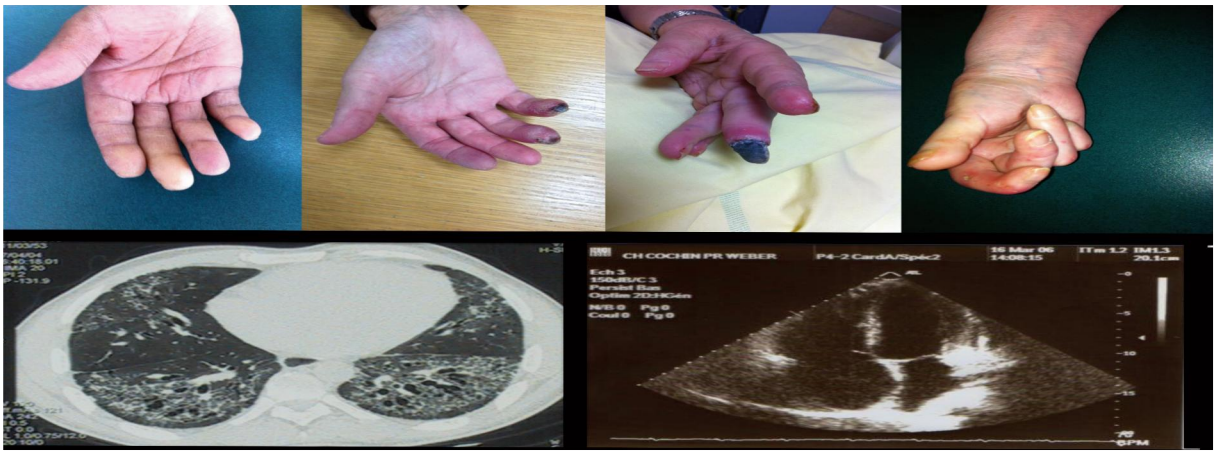


Figure 20. Caractéristiques cliniques de la vasculopathie sclérodermique. De gauche à droite : Syndrome de Raynaud avec spasme des doigts et phase ischémique (ici le majeur), puis aggravation des troubles vasculaires avec nécrose digitale et gangrène. Lésions déformantes sévères intégrant une sclérose cutanée majeure (sclérodactylie) et des déformations articulaires. Adapté de [163]

2.1.2 Physiopathologie de l'atteinte microcirculatoire et de l'ulcère sclérodermiques

La physiopathologie de la SSC est complexe et encore mal comprise, associant des dysfonctionnements des cellules endothéliales, des fibroblastes et du système immunitaire. L'interaction entre des causes environnementales et génétiques est à l'origine des altérations vasculaires, immunitaires, inflammatoires et de la fibrose[164].

Les altérations microvasculaires et l'activation endothéliale apparaissent précocement dans la pathologie[165,166]. Les atteintes microvasculaires, d'abord fonctionnelles, vont progressivement se manifester par des altérations morphologiques caractéristiques visibles à la capillaroscopie (méga-capillaires, ramifications, puis à terme, raréfaction capillaire), avec une prolifération des cellules musculaires lisses et un épaississement de l'intima[167]. Ces adaptations pathologiques vont entrainer une diminution de la lumière vasculaire à l'origine d'une hypoxie tissulaire et d'un stress oxydant[165].

Dans un contexte inflammatoire, les cellules endothéliales vont sur-exprimer à leur surface des molécules d'adhésion (molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM), molécule d'adhésion inter-cellulaire (ICAM), E-selectin) favorisant le recrutement de cellules immunitaires[168,169]. De plus, les cellules endothéliales vont participer activement à l'apparition d'une fibrose vasculaire. En effet, elles vont sécréter des facteurs pro-fibrosants et vasoconstricteurs, tels que ET-1 et le Facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) au détriment de vasodilatateurs (NO et prostacycline (PGI_2))[170–172]. De plus, les cellules inflammatoires recrutées en grand nombre au niveau du site lésé vont être une source

importante de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, et IL-6) et pro-fibrosantes (TGFβ, PDGF) accentuant ce phénomène physiopathologique (Figure 21). Ces facteurs vont participer au recrutement et à la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi qu'à la sur-production des composants de la MEC[172], constitutifs du phénotype fibrotique de la pathologie.

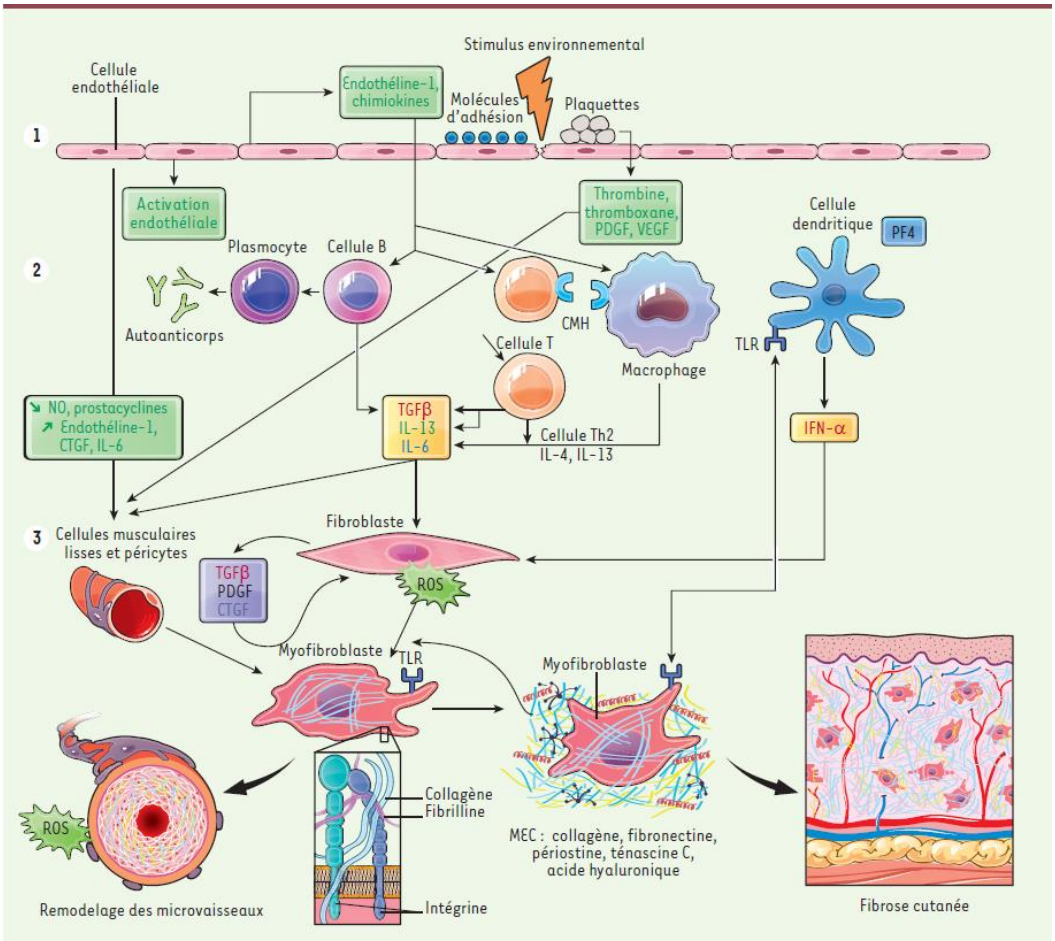


Figure 21 : physiopathologie de la sclérodermie[167]

Un élément clé de cette atteinte est le recrutement de fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes résistants à l'apoptose, qui sont les principaux acteurs de la synthèse de la MEC[173]. L'activation de ces myofibroblastes est orchestrée par de nombreux médiateurs dont le principal est le TGFβ. Sécrété par les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes, le TGFβ sera un acteur pro-fibrosant par son action spécifique sur la voie des Smad (voie impliquée dans la synthèse du collagène) mais aussi par son action sur la synthèse du CTGF, accentuant le déséquilibre pro-fibrotique. Il a aussi été démontré que, même en absence de TGFβ, les fibroblastes de sujets sclérodermiques

possèdent une accumulation d'une forme phosphorylées de Smad3, facilitant la synthèse du collagène ainsi qu'un défaut de rétrocontrôle de cette même voie[174]. D'autres cytokines comme les protéines chimiotractantes des monocytes 1 (MCP-1) sont aussi impliquées.

Toutes ces adaptations accroissent la réponse inflammatoire, ce qui accentue le recrutement de fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes, constituant un cercle vicieux ayant pour conséquence la fibrose tissulaire.

Un autre acteur important est le VEGF, dont la synthèse est stimulée par la perméabilité endothéliale accrue ainsi que par les phénomènes d'hypoxie. Son action qui pourrait représenter une tentative de réparation des dégâts vasculaires, est cependant insuffisante et/ou inefficace. Ceci est illustré par l'augmentation de la concentration sérique de VEGF, corrélée à la présence de zones avasculaires (visualisées en capillaroscopie péri-unguéale) chez des patients sclérodermiques[163]. Le VEGF pourrait également représenter un lien entre l'atteinte vasculaire et la fibrose. En effet, il a été montré sur un modèle murin délété au récepteur de type 2 du TGFβ, un lien entre les voies du TGFβ et celle du VEGF[163].

Ces adaptations pathologiques expliquent la microangiopathie (et dans une moindre mesure, la macroangiopathie) de la maladie (Figure 22). De par l'atteinte endothéliale (fonctionnelle) d'une part, et le remodelage de la paroi vasculaire d'autre part, les vaisseaux perdent leur capacité vasomotrice, aboutissant *in fine* à une hypoxie tissulaire, qui est responsable du risque accru de troubles trophiques[168,175].

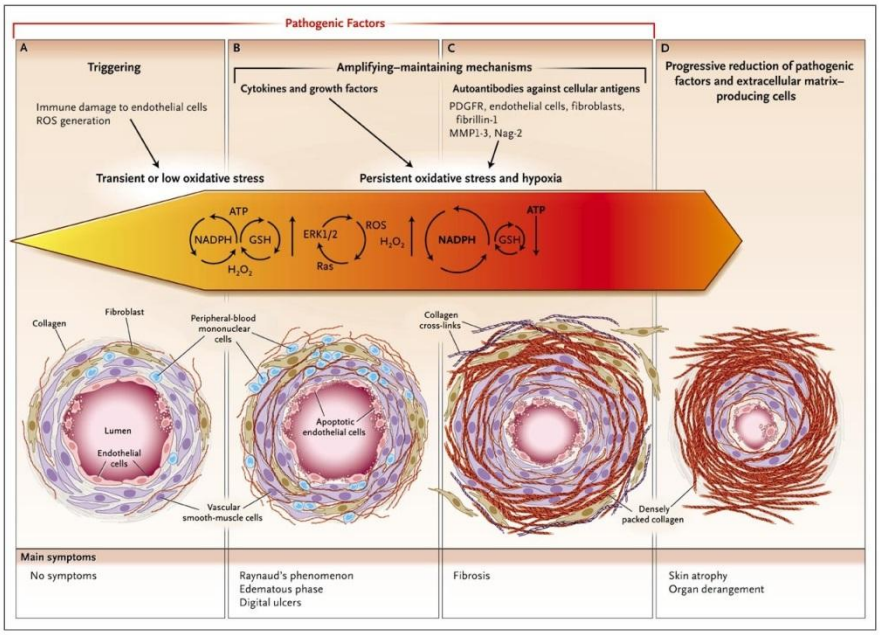


Figure 22 : les différents stades de la sclérodermie systémique[168]

2.2 Le diabète

A l'inverse de la sclérodermie, le diabète est une maladie très répandue. Elle touche près de 422 millions d'adultes à travers le monde et environ 4.8% de la population en France[176,177] (Figure 23).

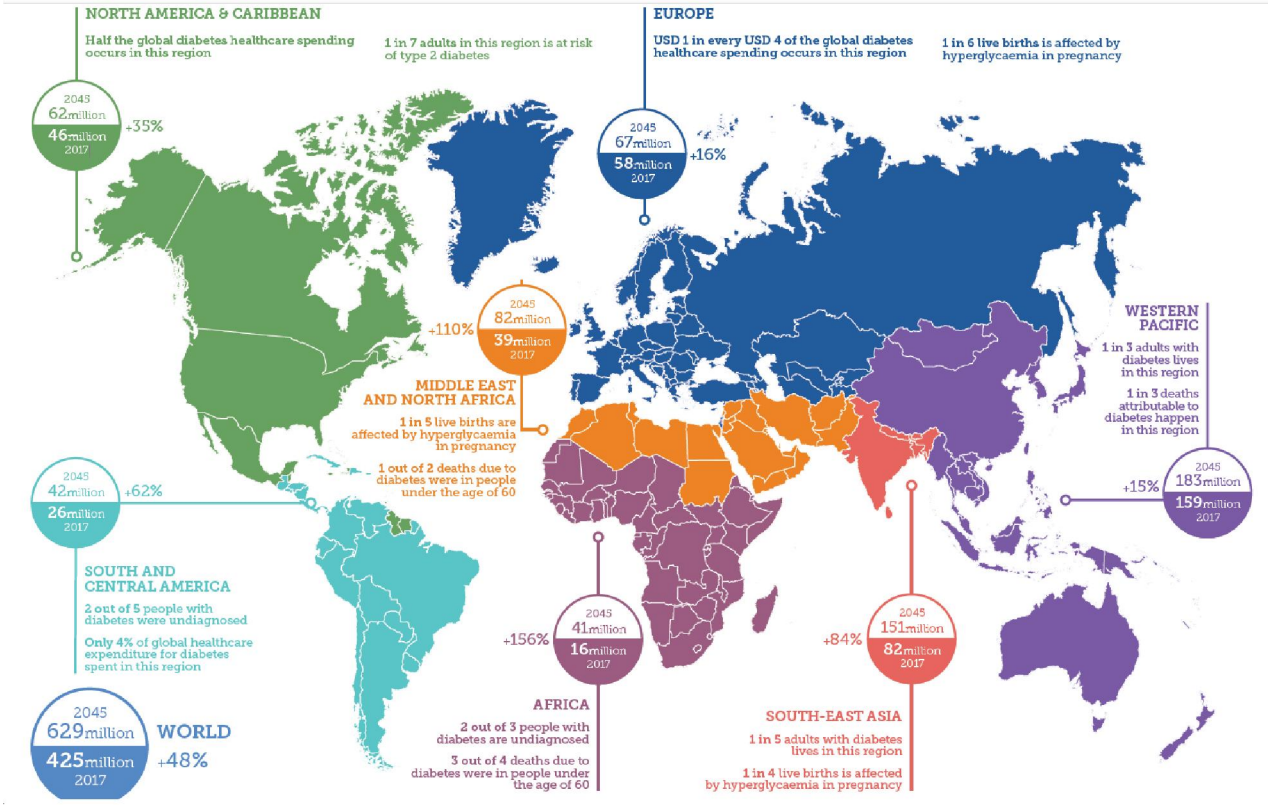


Figure 23 : Nombre estimé de personnes atteintes de diabète au niveau mondial et par région en 2017 et 2045 (20-79 ans) [177]

Appelé familièrement la « maladie du sucre », le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique. On distingue principalement le diabète de type 1, dû à un défaut de sécrétion de l'insuline secondaire à une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques, du diabète de type 2, secondaire à une insulino-résistance et/ou une insulinopénie et associé au surpoids, à l'obésité et au manque d'activité physique chez des personnes génétiquement prédisposées. Cette dérégulation métabolique a pour conséquences des complications vasculaires micro- et macro-angiopathiques, neuropathiques, infectieuses, et affecte différents organes (par exemple l'œil, le rein ou encore le système cardio-vasculaire).

2.2.1 La plaie du pied diabétique (DFU)

La plaie du pied diabétique (DFU) est une complication grave et fréquente du diabète. Près de 15% des patients diabétiques seront affectés par un ulcère au cours de leur vie, et le taux d'amputation du membre lésé comparé à une population non-diabétique est multiplié par 7[178]. Bien connu par les patients, le DFU se retrouve à la croisée des différentes complications diabétiques. En effet, 3 mécanismes sont en jeu : la neuropathie, la micro/macroangioapthie et le risque infectieux.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la microcirculation cutanée est indispensable au processus de cicatrisation. Dans le contexte du diabète, l'atteinte de la fonction mais aussi de la structure des micro-vaisseaux cutanés, très étroitement liée à la neuropathie, contribue à la survenue d'ulcères et à des troubles de leur cicatrisation.

2.2.2 Atteinte structurale de la microcirculation cutanée

Il a été observé chez des patients diabétiques de type 2 un remodelage microvasculaire pathologique. La prolifération excessive des cellules musculaires lisses au sein de la média entraine une augmentation du ratio média/lumière, ce qui caractérise une hypertrophie vasculaire[179]. Cette hypertrophie engendre des altérations de la vasodilatation endothélium-dépendante.

De plus, une diminution de la densité vasculaire a été observée au niveau cutané[180] et endoneural[181]. Ce changement structurel pathologique est plus prononcé dans les jambes de sujets diabétiques, ceci étant possiblement dû à une pression hydrostatique plus importante[182].

Ces adaptations structurelles pathologiques peuvent être expliquées par l'insulinopénie. En effet, l'insulino-thérapie intensive entraine une diminution de la largeur des capillaires de muscles squelettiques en corrélation avec une diminution de l'Hb1Ac[183]. Cela va dans le sens d'une implication de la voie de l'insuline dans la régulation structurelle des vaisseaux.

2.2.3 Dysfonction microvasculaire associée au diabète

Si l'atteinte structurelle de la microcirculation est présente à un stade avancé de la microangiopathie, l'atteinte fonctionnelle a probablement un rôle prédominant dans la survenue de nombreuses complications du diabète.

Au niveau cutané, l'atteinte fonctionnelle généralisée se manifeste notamment par l'altération d'une des principales fonctions de la microcirculation, à savoir la thermorégulation. En effet, la dissipation thermique à l'exercice de sujets atteints de diabète (type 1 ou type 2) est altérée[184,185]. Cette altération est le signe d'une dysfonction microvasculaire. Les anastomoses artério-veineuses (AVAs) permettent de réguler la thermorégulation. Elles permettent de réguler le passage du sang vers la surface cutanée. Par ce principe, elles régulent les échanges thermiques avec l'extérieur du corps. Une altération de cette dissipation est signe d'une altération de fonction microvasculaire.

2.2.3.1 *Caractérisation de l'atteinte de la réactivité vasculaire* in vitro *et* in vivo

Des études *in vitro* ont montré la présence d'une dysfonction endothéliale sur des vaisseaux issus de patients diabétiques de type 1. En effet, une diminution de la relaxation vasculaire a été observée sur des micro-vaisseaux isolés, lors d'une stimulation à l'acétylcholine [186]. Cette baisse de réactivité vasculaire a été retrouvée *in vivo* au moyen de différents tests non invasifs. Tout d'abord, la réactivité vasculaire mesurée par pléthysmographie suite à l'administration systémique d'acétylcholine a montré un lien entre hyperglycémie chronique et défaut de réactivité endothéliale chez des patients diabétiques de type 1[186–188]. Par ailleurs, il existe une altération du recrutement des capillaires cutanés mesuré par vidéo-capillaroscopie lors d'un test d'hyperémie post-occlusive [189]. En effet, les capillaires situés sur le dessus du pied de patients diabétiques semblent déjà recrutés de manière maximale au repos, limitant leur adaptation physiologique à un stimulus.

Comme vu précédemment, le test de vasodilatation, induit par une hyperémie thermique, permet d'évaluer la réactivité neurovasculaire (pic initial) et endothélial-dépendant (plateau) des vaisseaux. Ces deux mécanismes ont été mis en évidence par blocage nerveux ou blocage de la voie du NO[190], avec une implication de récepteurs spécifiques (TRPV1) dans la réponse neurogénique[191]. Ce test d'hyperémie thermique fait intervenir plusieurs processus impliqués dans la vasodilatation réactionnelle permettant un large champ d'étude de ces

mécanismes. Il a ainsi été montré chez des patients diabétiques de type 1 une diminution de la vasodilatation à la chaleur[192,193]. Ces données ont été confirmées chez des enfants et adolescents diabétiques[194,195] ainsi que chez des sujets à risques de développer un diabétiques de type 2[196,197]. Cette baisse de réactivité est plus marquée chez les patients diabétiques neuropathiques[198], voire même seulement présente chez cette population[199].

L'administration locale d'agents vasoactifs est une autre méthode permettant de déterminer la présence d'une dysfonction vasculaire. Couplée à une mesure du flux sanguin cutanée, par exemple par laser Doppler ou LSCI, l'iontophorèse d'acétylcholine permet d'évaluer la vasodilatation endothélium-dépendante. Une diminution de cette vasodilatation a été observée chez des patients avec un syndrome métabolique et diabétiques de type 2[200–202] ainsi que diabétique de type 1[200,203,204]. De son côté, le nitroprussiate de sodium est reconnu comme étant un vasodilatateur non-endothelium-dépendant. Une diminution de cette vasodilatation a été observée chez des patients avec un syndrome métabolique, accentué chez et les patients diabétique de type 2[202]. Avec ce deux tests, il est possible de déterminer la part de l'endothélium et des CML dans la dysfonction microvasculaire[202]. En effet, la dysfonction endothéliale est maintenant bien connue chez les patients diabétiques et l'hypothèse d'une altération précoce de la fonction des CML pourrait contribuer à cette dysfonction microvasculaire[205].

Une méta-analyse en réseau des différentes études évaluant la fonction vasculaire de sujets en surpoids, obèses, intolérants au glucose, porteurs d'un syndrome métabolique, diabétiques sans ou avec complications vasculaires, montre un continuum dans l'atteinte vasculaire entre ces différentes conditions. Cela suggère que l'atteinte vasculaire apparaît précocement dans le spectre de la maladie métabolique (Figure 24).

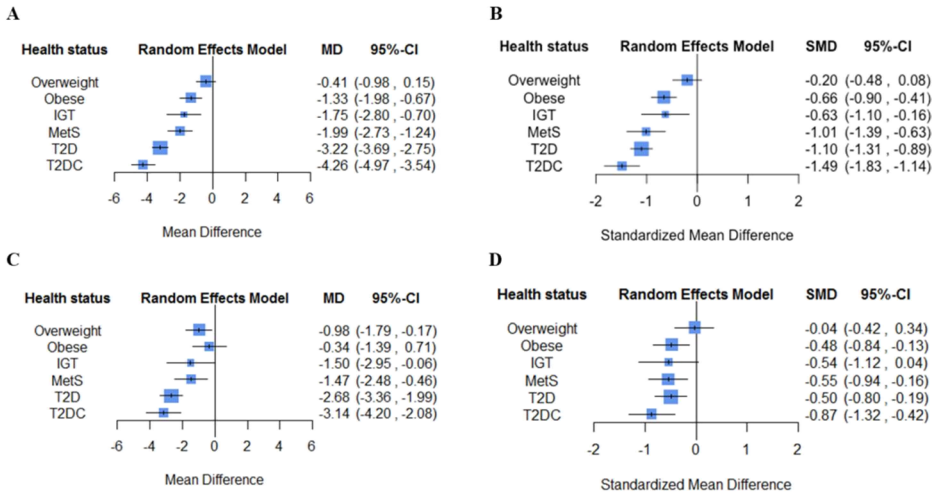


Figure 24 : Méta-analyse en réseau comparant entre différents groupes la fonction endothéliale macrovasculaire (A) et microvascular (B), et la fonction non-endothéliale macrovasculaire (C) et microvasculaire (D). IGT, intolérance au glucose; MetS, syndrome métabolique; T2D, diabète de type 2; T2DC, diabète de type 2 avec complication cardiovasculaire. D'après Loader et al., in press.

2.2.3.2 *La neuropathie diabétique, une complication microvasculaire ?*

Comme nous l'avons présenté dans la première partie de cette introduction, la composante nerveuse joue un rôle essentiel dans la vasomotricité. Des tests de réactivité tels que la PIV ou l'hyperhémie thermique permettent notamment d'explorer cette composante.

Bien que la neuropathie diabétique ait été classifiée comme une complication microvasculaire, le lien entre dysfonction microvasculaire et neuropathie dans le diabète reste complexe et n'a pas encore été complètement élucidé. D'un point de vue mécanistique, la neuropathie et la dysfonction endothéliale partagent une physiopathologie proche[206]. Par exemple, l'augmentation du glucose intracellulaire stimule la voie du sorbitol et induit la différenciation des cellules de Schwann en cellules immatures[207]. De plus, le stress oxydant et les produits de glycation avancée (AGEs) jouent un rôle important dans la physiopathologie de la neuropathie diabétique[206], comme dans celle de la dysfonction endothéliale (détaillée ci-dessous). Il est donc communément admis que dysfonction endothéliale et neuropathie se développent parallèlement, via des mécanismes communs[208] .

Toutefois, des travaux suggèrent un lien de causalité entre dysfonction microvasculaire et neuropathie diabétique. En effet, des travaux anciens utilisant un myographe électronique au niveau des capillaires du nerf sural de patients diabétiques ont montré que l'angiopathie endoneurale était liée à la sévérité de la neuropathie[209]. Par la suite, les mécanismes de cette hypothèse ont été davantage étudiés[210]. Le lien entre la diminution de perméabilité au glucose

et en O_2 dans la dysfonction endothéliale au niveau endoneural serait impliqué dans l'apparition de la neuropathie diabétique. En effet, l'étude de la répartition du flux microvasculaire, du temps de transit érythrocytaire et de la disponibilité en O_2 a permis de mettre en évidence certain mécanismes. Il est bien connu que l'hyperglycémie chronique engendre la formation d'AGE qui induira, par leur interaction avec leur récepteurs (RAGE), une augmentation du stress oxydant[211,212], à l'origine de dommages vasculaires. Par exemple, l'altération de la protéine endothéliale « *glycocalyx* », impliquée dans le flux érythrocytaire, est liée à une dysfonction capillaire[213]. Ces altérations ont aussi été observées lors d'études animales. Des souris ayant reçu une alimentation enrichie en gras (engendrant une augmentation des AGE et du stress oxydant) développeront une diminution de leur vitesse de conduction nerveuse et un déficit sensoriel avant l'apparition d'une intolérance au glucose. Ces données tendent vers une implication d'une dysfonction microvasculaire dans le développement de l'intolérance au glucose en parallèle de l'apparition d'une neuropathie. De plus, l'hypoxie tissulaire aurait un impact délétère dans la dysfonction nerveuse et endothéliale. En effet, il a été observé un taux élevé de NF-kB, facteur pro-inflammatoire, au niveau de nerfs périphériques lors d'études animales[214] et chez l'humain, une forte inflammation des nerfs périphériques est corrélés avec la sévérité de la neuropathie diabétique[215]. D'un autre côté, HIF1, facteur synthétisé en condition hypoxique, par son action sur la NADPH, aura un rôle majeur dans la libération de ROS, aggravant la dysfonction endothéliale[212]. Des travaux récents renforcent cette hypothèse, montrant qu'une atteinte endothéliale est responsable d'une atteinte neuronale, impliquant la voie de signalisation *Desert Hedgehog* (Dhh)[204].

Toutefois le lien peut aussi s'expliquer par une influence de la dysfonction nerveuse sur la réactivité vasculaire. Un exemple concerne la régulation des AVAs par le système sympathique. En effet, la neuropathie diabétique va diminuer les capacités de vasoconstriction des AVAs, ce qui les maintient ouvertes, créant ainsi un shunt artério-veineux au niveau cutané. Ce shunt, par un vaisseau de faible résistance et haute vélocité, redistribue le flux artériel vers le réseau veineux, accentuant la diminution du flux nutritif au niveau du plexus vasculaire superficiel (derme papillaire), ce qui a pour conséquence de majorer l'hypoxie superficielle et le risque d'ulcère[207].

Une autre hypothèse serait l'atteinte de senseurs présents à la fois sur les cellules endothéliales et les nerfs. Des travaux récents ont ainsi suggéré l'implication possible de TRPV1 (stimulés lors de l'hyperhémie thermique) dans la physiopathologie diabétique[35,209].

Par ailleurs, on ne peut pas exclure l'implication d'autres senseurs. Des travaux ont en effet montré que la réponse à la PIV chez des patients diabétiques, avec ou sans neuropathie, était altérée[101,211], ce qui pourrait suggérer l'implication de capteurs neuronaux sensibles aux changements de pression[35].

2.2.3.3 *Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette dysfonction endothéliale*

Le diabète expose l'organisme à une hyperglycémie chronique ayant des répercussions sur les mécanismes en jeu dans la neuropathie et la vascularopathie, au cœur de la dysfonction endothéliale. Trois voies sont touchées : la voie du sorbitol, l'activation de la PKC (Proteine Kinase C)[60] et la formation des AGE ; ces atteintes entraineront une production accrue de ROS instituant la physiopathologie.

La voie du sorbitol (ou polyol pathway) est activée en cas d'hyperglycémie[61,62]. Cette voie utilise du NADPH (forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) pour le synthétiser en NADP+ formant ainsi du sorbitol puis du NAD+ en NADH pour former du fructose. Ces 2 actions vont entrainer la libération de ROS pour la première[62] et des AGEs pour la seconde. En effet, le pool de NADPH disponible dans la cellule va être préférentiellement utilisé pour cette voie au détriment de la voie du glutathion, limitant l'effet anti-oxydant de celui-ci. Les ROS ainsi libérés dans la cellule vont activer PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymérase) à l'origine de l'inhibition de GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Cette inhibition engendrera l'augmentation de la production de AGE, la synthèse de diacylglycerol (DAG) et l'activation de PKC[61]. De plus, NADPH est un cofacteur de la NOS. Lors d'une hyperglycémie chronique, la voie de la NOS sera limitée, favorisant le découplage de la eNOS, diminuant la production de NO et augmentant celle de ROS (Figure 25).

La voie du sorbitol aura donc des effets délétères sur la production de NO, activera la voie de la PKC et augmentera la production de ROS.

La PKC est une enzyme ubiquitaire, impliquée dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Elle a un rôle central dans la fonction vasculaire, la perméabilité vasculaire[63], la synthèse de la MEC, l'angiogénèse ou encore la régulation de la contractilité des CML[224]. La PKC et ses différents isoformes peuvent être activés par les acides gras libres, l'hyperglycémie[208,225], le DAG, le VEGF[223] ou encore par l'inhibition de GAPDH[222].

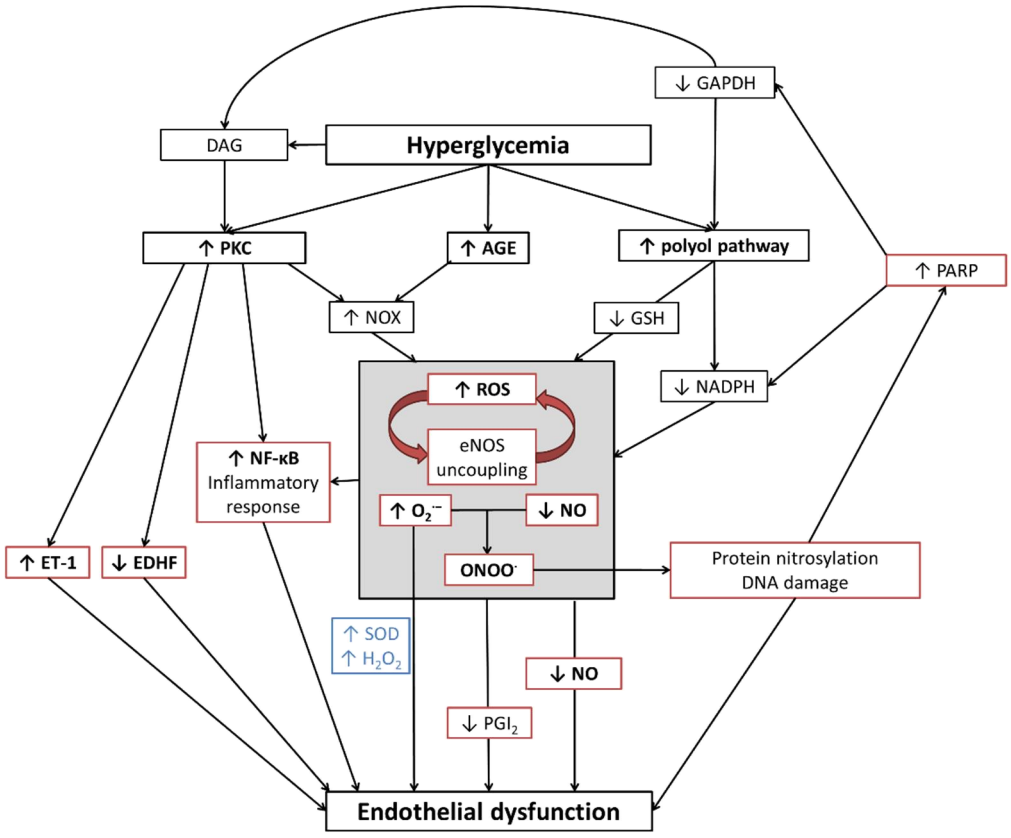


Figure 25 : Effets de la stimulation de PKC suite à une hyperglycémie[221]

En contexte hyperglycémique, la PKC sera activée, entrainant une augmentation de la synthèse de ET1[226,227] et la production de ROS, augmentant ainsi le tonus vasculaire[224]. De plus, l'activation de PKC active des voies inflammatoires (recrutement macrophagique, adhésion vasculaire) et apoptotiques telles que NFkB ou p38MAPK. La stimulation de PKC par l'hyperglycémie[228] entraine une augmentation de VEGF induisant une augmentation de la perméabilité vasculaire par phosphorylation des occludines, un composant des jonctions serrées[229].

Le diabète augmente l'activité de NADPH oxidase et induit l'expression de ET-1, VEGF, TGFβ, CTGF et la synthèse du collagène IV et VI[230,231]. Ces stimulations vont entrainer un remodelage vasculaire pathologique. En plus de ce contexte inflammatoire et vasoconstrictif, la surproduction de ONOO- par la PKC entraine un inhibition de la prostacyclin synthase[232,233] contribuant à la déficience endothéliale, à la vasoconstriction, l'inflammation et l'apoptose endothéliales observée en contexte hyperglycémique.

La stimulation de PKC entraine un remodelage pathologique des vaisseaux, augmente la réponse inflammatoire ainsi que la production accrue de ROS.

En conclusion, la voie de la PKC semble avoir un rôle majeur dans la survenue des DFUs. Une étude récente a démontré *in vivo* que des fibroblastes de patients diabétiques de type 1 possédaient un niveau élevé de PKC, et une inhibition de la voie de l'insuline corrélée à une altération de la cicatrisation[234].

L'hyperglycémie induit également la formation de AGEs intra- et extracellulaire. Dans les cellules endothéliales, les AGEs altèrent la structure et la fonction des protéines matricielles causant des anomalies d'interactions avec les autres protéines matricielles et les intégrines[221]. De plus, l'activation des récepteurs aux AGEs (RAGE) par les AGEs extracellulaires, vont déclencher une cascade de réactions activant la NADPH oxidase. Comme expliqué précédemment, cette activation induit une augmentation de la production de ROS et contribuera à la diminution de production de NO[235]. Une autre cible des RAGE est la voie du NFkB augmentant la réponse inflammatoire et l'adhésion cellulaire (ICAM)[236]. Les AGEs renforcent ainsi la réaction inflammatoire et la production de ROS.

Comme nous venons de le voir, la libération de ROS est un élément commun aux 3 voies décrites précédemment, participant activement à la dysfonction endothéliale, entrainant des dommages vasculaires et endothéliaux importants. En effet, les ROS vont participer à l'activation de la voie de PARP, à l'initiation de remodelage pathologique, de l'inflammation et d'une dysfonction vasculaire[237].

Des mécanismes naturels de protection contre ce stress oxydant existent. Dans la peau des membres inférieurs de patients diabétiques de type 2 sans altération de la fonction endothéliale, la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD) est surexprimée. La SOD permet de transformer les superoxydes en H_2O_2, pouvant entrainer une vasodilatation EDHF-dépendante[238]. Ce résultat suggère que l'augmentation de SOD dans une phase précoce de la pathologie pourrait être un mécanisme compensateur, capable de protéger la cellule contre la formation de ROS mitochondriaux. En revanche, l'incidence de complications microvasculaires est associée à une réduction du taux de SOD plasmatique [239–241], qui traduit une perte de ce mécanisme de protection.

D'une manière plus spécifique au DFU, il est important de préciser l'impact délétère de l'hyperglycémie sur la fonction des fibroblastes, principaux acteurs de la cicatrisation. Cette hyperglycémie entraine une diminution de la capacité de réplication des fibroblastes humains[242]. Le glucose à forte concentration limite la fonction fibroblastique, voire l'annule. Une des causes envisagée est, là encore, la production de ROS. En l'occurrence, une inversion de cet effet a été observé sur des fibroblastes humains incubés avec un anti-oxydant[243]. Il a aussi été constaté une diminution de la production de collagène par des fibroblastes sains en présence de sérum de rats diabétiques[244].

Une altération de la migration de ces cellules est aussi notable[245]. Normalement, en condition hypoxique (les plaies étant relativement hypoxique[246,247]), la migration des fibroblastes et des kératynocytes est augmentée[248,249]. Cependant, toujours en condition hypoxique, la migration de fibroblastes diabétiques n'est pas augmentée[245]. Ceci peut expliquer que durant la phase de prolifération, l'angiogénèse et le dépôt matriciel soient retardés[132,250]. Cette diminution de migration cellulaire est aussi expliquée par la présence des AGEs : ils favorisent l'apotptose des fibroblastes et diminuent leur prolifération. Cet effet est partiellement RAGE-dépendant et est en corrélation avec l'activation de NFkB[251]. Il a aussi été montré *in vitro* que les AGEs sont capables d'induire une sénescence précoce des fibroblastes et des kératinocytes humains sains[252,253].

2.3 Traitements actuels des ulcères du diabète et de la sclérodermie

Outre le traitement étiologique, la prise en charge des ulcères repose dans les deux pathologies sur des soins locaux et le contrôle de l'infection. Dans le cas de la sclérodermie systémique, des traitements médicamenteux sont également indiqués.

L'évaluation des ulcères est, la plupart du temps, basée sur 3 critères principaux à savoir la profondeur de l'ulcère, la présence ou non d'infection et la quantification de l'ischémie locale du membre atteint[254,255].

2.3.1 Les traitements locaux

Les traitements locaux se résument en 6 principales actions[254,256,257] :

Traiter la cause de l'ulcère, surtout lors d'une atteinte du membre inférieur. A l'image du DFU, la neuropathie diabétique altèrera les sensations d'alerte suite à une lésion pouvant provenir d'un choc, un frottement ou encore à une compression. L'Education Thérapeutique du Patient (ETP) peut dans ce cas permettre d'identifier et traiter ces causes (conseils de podologues, vérification orthopédique ou encore par exemple des conseils hygiéno-diététique tel que l'arrêt du tabac). Le contrôle et la régulation de l'équilibre glycémique entrant aussi dans cette catégorie.

Le contrôle de perfusion locale. Une ischémie au niveau du membre lésé est un critère négatif à la cicatrisation.

Le débridement, chirurgical ou biologique, permet le retrait des tissus nécrosés et infectés au niveau de la plaie.

Le traitement de l'infection, qui commence dès le débridement, permet de limiter le développement bactérien et favoriser les mécanismes cicatriciels.

La protection de la plaie permet de maintenir un environnement propice à la cicatrisation, limitant la macération ou encore l'intrusion de corps étrangers.

Spécifiquement pour les atteintes du membre inférieur, et couramment utilisé pour le DFU, la décharge de la zone lésée permet de réduire la pression au niveau de la plaie et prévenir son aggravation.

2.3.2 Les traitements médicamenteux systémiques des ulcères de la sclérodermie

Les traitements systémiques regroupent les différentes approches pharmacologiques à administration systémique[94,98–101].

Les 3 principales cibles dans le traitement des ulcères cutanés sont les voies du monoxyde d'azote (NO), des prostacyclines (PGI2) et de l'endothéline-1 (ET1) (Figure 26).

La voie du NO, puissant vasodilatateur physiologique, est altérée dans certains contextes (tabagisme, diabète, HTAP…). Lors d'un stress oxydant ou d'une dysfonction endothéliale, la eNOS produira du O_2^- qui altèrera la production de Guanosine Monophosphate Cyclique (cGMP) par oxydation de la Guanylate Cyclase soluble (sGC),

empêchant la relaxation des CML. Trois familles de molécules sont utilisées pour stimuler cette voie. Tout d'abord les donneurs de NO ont permis une augmentation du flux microvasculaire chez des patients sclérodermiques[258,259]. Toutefois il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude ayant eu un impact significatif sur la cicatrisation d'ulcères digitaux. Deuxièmement les stimulateurs et activateurs de la sGC[262]. Ils permettent la production de cGMP sans intervention du NO. Toutefois leur effet sur la cicatrisation n'a pas pu être démontré. Pour terminer, les inhibiteurs de la Phosphodiestérase 5 (PDE5) permettent d'inhiber la dégradation de la cGMP, augmentant sa concentration intracellulaire et son action vasorelaxante. Toutefois, cette approche thérapeutique n'a pas démontré son efficacité sur la cicatrisation d'ulcères digitaux sclérodermiques[263].

Les antagonistes des récepteurs de ET-1 vont inhiber ses actions vasoconstrictrices et profibrosantes, limitant ainsi les atteintes vasculaires observables dans la sclérodermie. L'effet positif de cette inhibition sur la survenue de nouveaux ulcères digitaux a été démontré chez des patients sclérodermiques[264].

Enfin l'iloprost, un analogue de la PGI_2, est un puissant vasodilatateur, antiagrégant et anti-fibrosant. C'est aujourd'hui le seul traitement à avoir démontré son efficacité dans le traitement des ulcères digitaux [266]. Toutefois, son administration nécessite une hospitalisation de plusieurs jours et une surveillance étroite liée à des effets secondaires dose-limitant.

Dans le diabète, l'utilisation d'analogues de la PGI_2 par voie systémique a été très peu évaluée[267]. Pourtant leur application dans le traitement des plaies du pied diabétique semble être une piste prometteuse.

3 Utilisation de l'iontophorèse d'analogue de la PGI_2 dans le traitement des ulcères cutanés

Comme nous venons de la voir, les prostacyclines sont déjà utilisées dans le traitement et de certains troubles trophiques. Toutefois, leur administration par voie systémique expose le patient à de nombreux effets indésirables. Ainsi, l'hypothèse de ce travail est qu'un traitement local permettrait de réduire les effets indésirables, tout en augmentant la concentration de médicament au niveau du site de l'ulcère. Cette troisième partie expose ainsi le rôle de la PGI_2 dans les processus de cicatrisation, et présente l'intérêt de l'iontophorèse d'analogue de la PGI_2 comme approche thérapeutique des ulcères de la SSc et du diabète.

3.1 Dysfonction de la voie de la prostacycline et cicatrisation

Les effets vasculaires des analogues de la prostacycline ont déjà démontré leur efficacité dans différentes pathologies telle que l'HTAP. Dans le domaine de la cicatrisation des ulcères cutanés, des études prometteuses ouvrent la voie de l'utilisation des prostacyclines en thérapeutique.

3.1.1 De l'acide arachidonique aux prostacyclines

Les PG sont issues des aides gras polyinsaturés (AGPI) libérés par les phospholipides membranaires. Cette libération implique l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) conduisant à la synthèse de l'acide arachidonique (AA). L'intervention d'enzymes spécifiques permettra la synthèse des AA en différentes PG. Ces enzymes sont au nombre de 3 **:** les COXs, les lipoxygénases (LOXs) et les CYP450 (Schéma 27). Ce travail de thèse traitant d'un analogue de la prostacycline, le reste de ce chapitre s'intéressera spécifiquement au groupe des prostaglandines.

Les COXs (ou Prostagladine H2 synthase) permettent la synthèse des prostanoïdes à partir des AA[1]. Deux isoformes, ayant des actions différentes et parfois opposées, ont été identifiés.

Tout d'abord, COX-1 est une enzyme exprimée dans la plupart des tissus, nécessaire à la synthèse des prostanoïdes et impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques. Il est possible de citer son implication dans la cytoprotection au niveau de la muqueuse gastrique,

dans le maintien du flux sanguin au niveau rénal, ou dans le maintien de l'homéostasie. On la retrouve fortement exprimée au niveau des plaquettes[269], de l'estomac[270], des reins[271] et des cellules endothéliales[272].

La COX-2 n'est quant à elle pas exprimée en temps normal dans la plupart des cellules. De manière constitutive au niveau du cerveau et des reins, elle est inductible dans de nombreuses autres cellules en réponse à un stimulus inflammatoire. Elle se retrouve exprimée par les monocytes, fibroblastes ou sous l'action de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1β, TNFα ou encore des facteurs de croissance[273].

Ces cyclo-oxygénases vont avoir de nombreux effets physiologiques via la synthèse de la PGI_2, des TXA_2, des prostaglandines (PGE_2, PGF_2 et PGD_2) et de l'activation de leurs récepteurs spécifiques (Schéma 27).

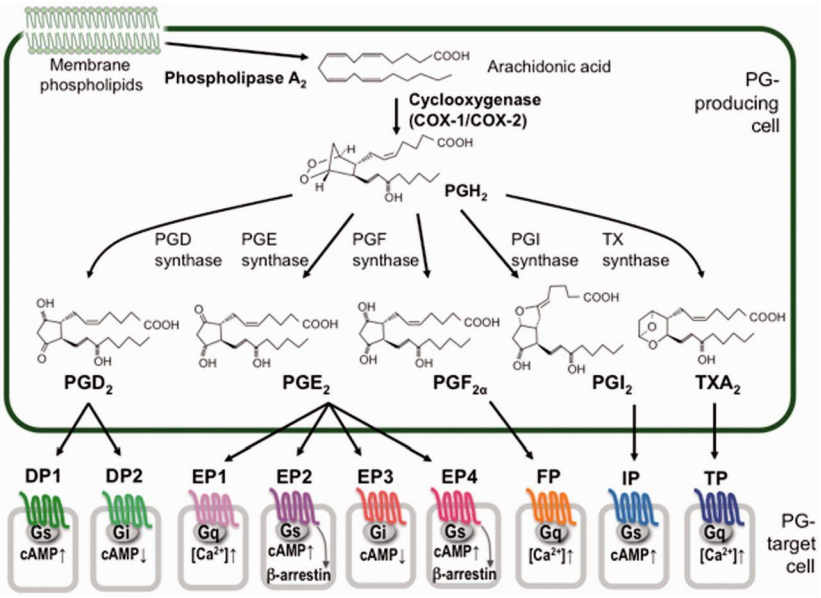


Schéma 27 : la synthèse des prostanoïdes[274]

3.1.2 Prostacyclines, fonction endothéliale, et cicatrisation

La PGI_2 est principalement produite par les cellules endothéliales et les CML[275,276]. Elles sont impliquées dans de nombreuses adaptations physiologiques incluant l'inhibition de l'agrégation plaquettaire[277], la relaxation des CML[278,279], la protection athéromateuse, ou encore l'inhibition de l'adhésion cellulaire[280,281]. De plus, la PGI_2 agit en synergie avec d'autres prostanoïdes dans la régulation de la douleur et de l'inflammation[275,276,282]. Les majeures parties de ces régulations ont lieu par l'intermédiaire de leur récepteur spécifique IP[283]. Couplé à une protéine G qui augmentera l'activité de la cAMP par stimulation de l'Adenylate Cyclase (AC), il activera différentes voies impliquées dans la fonction microvasculaire et la cicatrisation[284].

3.1.2.1 *Implication de la PGI_2 dans la fonction microvasculaire*

Il est maintenant bien connu que la PGI_2 a un effet vasodilatateur. Cette réaction passe en partie par la stimulation de la cAMP. Tel que nous le présente la figure 28 ci-dessous, la stimulation du récepteur IP de la membrane de la CML permettra l'activation de l'AC induisant l'augmentation de la cAMP et la stimulation de la protéine kinase A. Cette stimulation engendrera l'inhibition de la MLCK (Myosin Light Chain Kinase), conduisant à une relaxation musculaire[281,285–287]. Parallèlement, la stimulation du récepteur IP induira une activation de la phospholipase C[288] impliquée, de manière non-significative en condition saine, dans des phénomènes vasoconstrictifs. D'un autre côté, cette vasodilatation sera aussi médiée par l'activation du facteur de transcription PPAR (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes)[289], activé par la cascade réactionnelle du récepteur IP. Cette vasodilatation sera l'effet conjugué de l'activation de la eNOS au niveau endothéliale, par la voie de PI3K/Akt/NOS[290], et de l'inhibition d'agents vasoconstricteurs tel que ET-1[291].

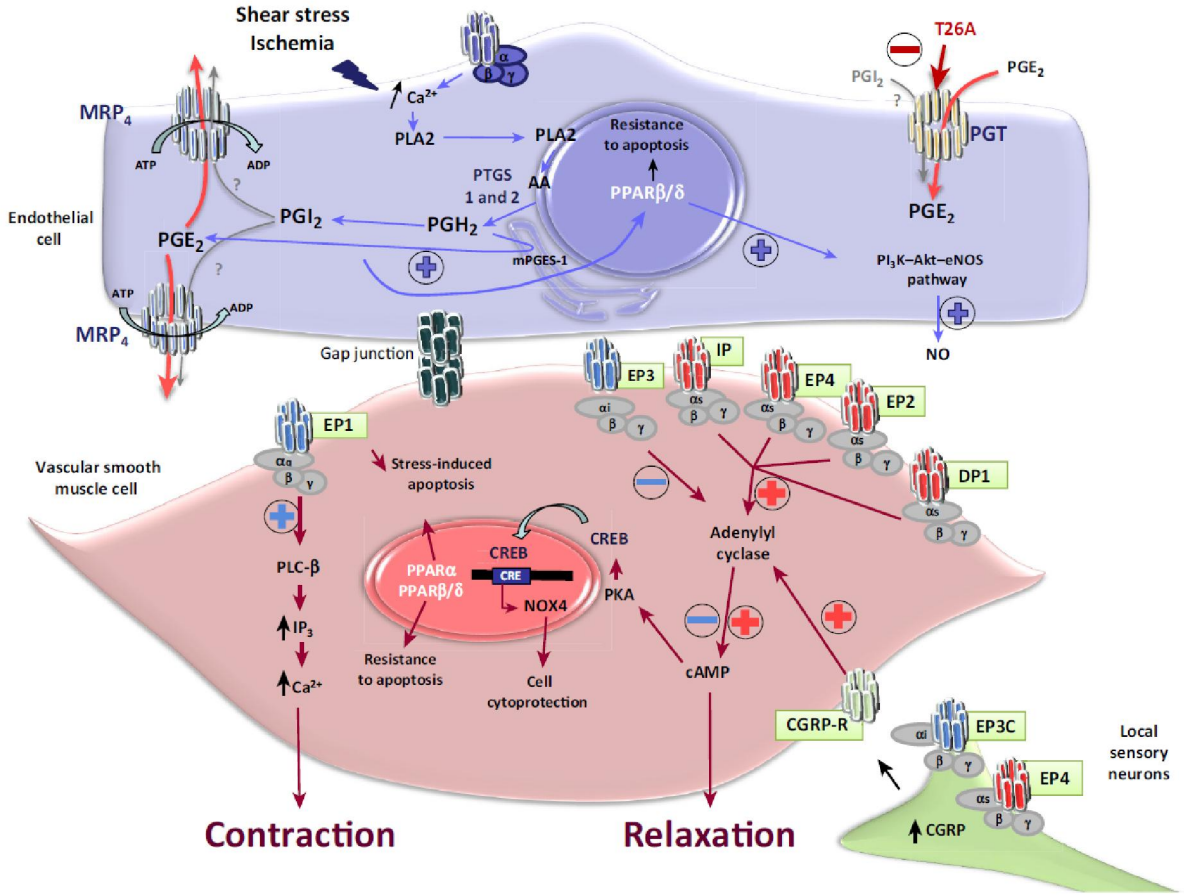


Figure 28 : voies d'action de la prostacycline dans la paroi vasculaire[292]*. La stimulation des cellules endothéliales engendrera la synthèse de PGI_2 qui diffusera vers les CML. Parallèlement, l'activation de la voie de PPAR permettra la stimulation de la voie de PI_3K-Akt-eNOS et la libération de NO. L'activation des récepteurs IP des CML engendrera une relaxation de ces dernières par stimulation de la voie de l'AC et de cAMP.*

La PGI_2 est aussi impliquée dans la régulation de l'inflammation par stimulation de PPAR. En effet, ce dernier va permettre de diminuer la réponse inflammatoire en agissant comme inhibiteur de la libération de IL-6, de l'expression de la COX-2 ainsi que de l'activité du facteur de transcription NFkB[293]. Il a aussi été montré que PPAR inhibe l'agrégation plaquettaire[291], l'adhésion cellulaire[293] et diminue la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages[294].

3.1.2.2 *Implication de la PGI2 dans les processus cicatriciels*

L'interaction entre PGI_2 et VEGF joue un rôle primordial dans l'angiogénèse. En effet, une diminution de l'angiogénèse ainsi que de VEGF a été observée lors d'une étude de cicatrisation sur un modèle murin délété pour le récepteur IP[295]. De plus, une étude in vitro a démontré que les cellules endothéliales synthétisent du VEGF-A lorsqu'elles sont en présence d'un analogue de la prostacycline (le tréprostinil) et que ces conditions potentialisent l'angiogénèse[296]. Un autre analogue de la prostacycline (SM-10902) a aussi démontré son action positive dans l'angiogénèse au cours de la phase précoce de cicatrisation, ainsi qu'une amélioration de la néo-vascularisation tout en favorisant la formation de tissu de granulation et la ré-épthélialisation[297]. Cette implication forte de la voie de la PGI_2 dans l'angiogénèse semble passer par le facteur de transcription PPAR. En effet, dans différents tissus, l'action angiogénique de la PGI_2 par activation du récepteur IP est reconnue[298]. Une étude in vivo a montré qu'en présence d'un analogue des prostacyclines (iloprost), une activation de l'angiogénèse était observable chez des souris saines, mais absente chez des souris délétées pour PPAR[299]. De plus, l'augmentation locale de concentration de PGI_2 par inhibition de PGT (Transporteur des Prostaglandines) a permis d'améliorer la ré-épithélialisation et d'accélérer la cicatrisation de plaies chez un modèle murin sain et diabétique[300,301].

De plus, des données préliminaires recueillies au laboratoire confirment cette implication. En effet, nous avons observé un retard de cicatrisation chez un modèle de souris possédant une délétion pour le récepteur IP (Figure 29). Il est intéressant de noter un effet précoce de ce retard.

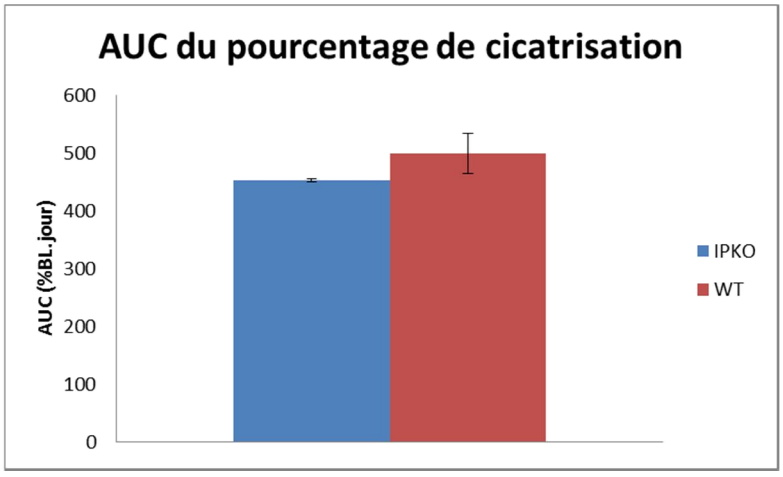


Figure 29 : AUC des pourcentages de cicatrisation des IPKO vs WT

Le facteur de transcription PPAR se retrouve donc au centre de ces régulations physiologiques. Outre son rôle dans l'angiogénèse, l'inflammation ou encore sur la vasodilatation, il est aussi fortement impliqué dans l'inhibition de la migration cellulaire[302], de la prolifération des CML[303–305] et de l'apoptose[275]. Paradoxalement, il induit aussi une prolifération des cellules endothéliales facilitant l'angiogénèse[306,307].

La PGI_2 a aussi un rôle dans le remodelage tissulaire. L'administration d'iloprost à des patients sclérodermiques a permis d'observer une réduction de leur épaisseur cutanée par blocage du CTGF ainsi que l'augmentation de la synthèse de collagène de la part des fibroblastes[308]. Ces données corroborent celles de deux études antérieures ayant montré que la PGI_2 améliore la production fibroblastique de uPA (activateur du plasminogène de type urokinase, facteur impliqué dans la fibrinolyse)[309] et permet une diminution du facteur de transcription Smad4 (facteur impliqué dans la fibrinogénèse)[310]. La PGI_2 permet donc de limiter la fibrose cicatricielle tout en stimulant le remodelage tissulaire.

3.1.2.3 *Altération de la voie de la PGI2 dans le diabète et de la ScS*

Comme abordé dans le paragraphe précédent, le profil pathologique peut impliquer une dérégulation de la voie de la PGI_2. Cette dérégulation est connue depuis de nombreuses années aussi bien dans le diabète[311] que dans la sclérodermie[312]. Parmi ses effets, elle induit une hyper-agrégation plaquettaire, une vasoconstriction, une augmentation de la synthèse de thromboxane ainsi qu'une diminution de celle des prostacyclines [313].

En effet, des cellules endothéliales saines incubées dans du sérum de patients diabétiques ou sclérodermiques induisent une inhibition de leur synthèse de PGI_2[312,314]. Toutefois, cette dérégulation n'est pas homogène au sein du corps puisqu'on observe une augmentation de l'expression de PGI_2 au niveau de poumons de souris diabétiques[315] malgré des atteintes pulmonaires relayées dans la littérature[316].

Dans le cas du diabète, cette dérégulation touche de manière plus large la synthèse des prostanoïdes. Que ce soit sur cellules humaines[317] ou animales[318] le ratio PGI_2/TXA_2 est diminué[319], favorisant le profil vasoconstricteur de la pathologie. En effet, quelques études ont

montré que l'hyperglycémie induit l'expression de COX-2 conduisant à la production de prostanoïdes vasoconstrictrice[317,320]. De plus, cette évolution s'accentue avec l'âge du diabète[318]. Récemment *Randriamboavonjy et al*[321] se sont intéressés aux raisons de cette diminution. Ils ont ainsi montré que l'expression de la PGI_2 synthase est diminuée chez des souris diabétiques. En effet, l'administration de PGI_2 exogène à des souris saines et diabétiques induit une relaxation similaire des CML, démontrant la fonctionnalité des récepteurs IP (IPr). Toutefois, ces récepteurs semblent moins exprimés au niveau plaquettaire chez des patients diabétiques[322] induisant une diminution du niveau de cAMP, qui est restauré en présence d'iloprost. D'un autre côté, l'insuline est reconnue comme permettant d'induire l'augmentation membranaire du nombre des récepteurs IP plaquettaires[323,324]. Ces données laissent à penser que l'insulino-résistance pourrait jouer un rôle dans la diminution de l'expression des IPr.

Concernant plus spécifiquement la sclérodermie, la production excessive d'endothélien-1 est à l'origine de phénomènes vasoconstrictifs[325,326]. Il existe en parallèle une diminution de la production de NO et de PGI_2 ainsi qu'une surexpression du facteur de von Willebrand, contribuant au déséquilibre vasomoteur ainsi qu'à une hyper-coagulation pathologique[327,328].

Dans ces deux contextes, la dysfonction de la PGI_2 participera à la mise en place de la pathologie. En effet, le déséquilibre de synthèse entre les différents acteurs impliqués dans la vasomotricité basculera préférentiellement en faveur d'une vasoconstriction couplée à une réponse inflammatoire surexprimée.

Une étude récente montre que l'inhibition de la dégradation des acides epoxyeicosatrienoic (EETs), qui interviennent dans l'activité des EDHF, prévient la microalbuminurie et l'inflammation rénale chez des souris diabétiques obèses possédant une déficience au NO[329]. Cela suggère que la voie de l'EDHF joue aussi un rôle compensatoire dans le maintien de la fonction microvasculaire dans le diabète lors d'une altération de la voie du NO au côté de la PGI_2. Restaurer la biodisponibilité des EETs en bloquant leur dégradation (blocage de l'époxyde hydrolase soluble sEH) a été proposé comme traitement des complications diabétiques[330].

Toutefois, la stimulation de la voie de la PGI_2 reste une piste prometteuse dans le traitement des ulcères diabétiques et sclérodermiques principalement au travers de ses effets anti-fibrosants, pro-angiogéniques ou encore antiagrégants.

3.1.3 Utilisation d'analogues de la PGI_2 en thérapeutique et effets indésirables

Le traitement par analogues de la prostacycline, déjà couramment utilisé dans l'HTAP, est depuis quelques années une thérapeutique courante dans le traitement des ulcères cutanés de la sclérodermie[266,331,332].

Toutefois, leur administration par voie intraveineuse expose les patients à de nombreux effets indésirables liés à l'effet vasodilatateur de la PGI_2[333–335]. Parmi eux, on note notamment des hypotensions, maux de tête, nausées, vomissements, flush. Ces effets indésirables sont dose-limitants, la posologie est en effet adaptée à la tolérance du patient. De plus, l'administration par voie intraveineuse d'iloprost dure plusieurs heures, et doit être répétée sur plusieurs jours consécutifs. Ces contraintes justifient une hospitalisation, ce qui diminue la qualité de vie des patients et augmente les coûts liés à cette prise en charge.

Parallèlement, du fait de la diminution de la densité capillaire et du rétrécissement de la lumière vasculaire, les médicaments administrés par voie systémique vont avoir plus de difficulté à atteindre leur site d'action.

Afin de remédier à ce paradoxe thérapeutique opposant effets pharmacologiques avec les EI de ces molécules, le développement de méthodes d'administration locale permettrait l'optimisation de l'effet recherché en préservant la qualité de vie du patient.

3.2 Approche locale : intérêt de l'iontophorèse

De nombreuses techniques d'administration locale de molécules existent, qu'elles soient invasives (injection sous-cutanée, intradermique,…) ou non-invasives (gel, nanoparticules,…). Pour ses différents avantages, nous nous sommes intéressés à l'iontophorèse.

3.2.1 Mécanismes d'action

L'iontophorèse est une méthode non-invasive d'administration de molécules chargées au moyen d'un courant électrique de faible intensité[102,336]. C'est une voie principalement cutanée qui permet, selon les caractéristiques des molécules utilisées, une administration systémique ou locale[337].

Expliqué simplement, le dispositif d'iontophorèse est constitué d'un générateur en contact avec la peau par deux électrodes : l'une dite « passive », l'autre dite « active ». L'électrode active est reliée au compartiment contenant la solution à administrer. En effet, en fonction du sens du courant et de la charge de la molécule d'intérêt, l'appellation « active » pourra concerner la cathode ou l'anode (Figure 29). L'électrode passive est située à distance et permet de fermer le circuit électrique, qui intègre ainsi les propriétés conductrices de la peau.

L'administration iontophorétique repose sur deux modes d'action spécifiques : l'électromigration et l'électroosmose. L'électromigration, autrement appelée électrorépulsion, désigne le déplacement de molécules chargées (cations ou anions) en fonction de la polarité du courant électrique, et représente le principal mécanisme responsable du transport iontophorétique[336]. Concrètement, une molécule chargée positivement placée au niveau de l'anode (pôle positif du système électrique), est « repoussée » par l'anode et attirée par la cathode. La présence d'un courant électrique fait donc migrer les cations de l'anode vers la cathode. Il en va de même pour les anions qui migreront en parallèle de la cathode vers l'anode. Ainsi, lorsque la molécule d'intérêt est chargée négativement, et est donc placée à la cathode, cette dernière est qualifiée d'électrode active, et l'anode de passive.

Le second mécanisme, l'électroosmose, est moins intuitif. Lorsqu'un courant électrique est appliqué sur la peau, il entraîne des mouvements ioniques ne concernant pas les molécules d'intérêt, mais les électrolytes présents dans la peau. Les plus abondants sont les ions Na^+ et Cl^-, qui migreront respectivement vers la cathode et vers l'anode. A pH neutre, le point isoélectrique (pI) de la peau se situant autour de 4-4.5, elle sera chargée négativement : les anions Cl^- sont donc freinés durant leur migration vers l'anode tandis que celle des cations sera facilitée. Ce flux d'ions Na^+ entraîne un mouvement d'eau, appelé flux électroosmotique, qui facilite le transport iontophorétique anodal, et peut même permettre de transporter des molécules solubles non chargées[4]

.

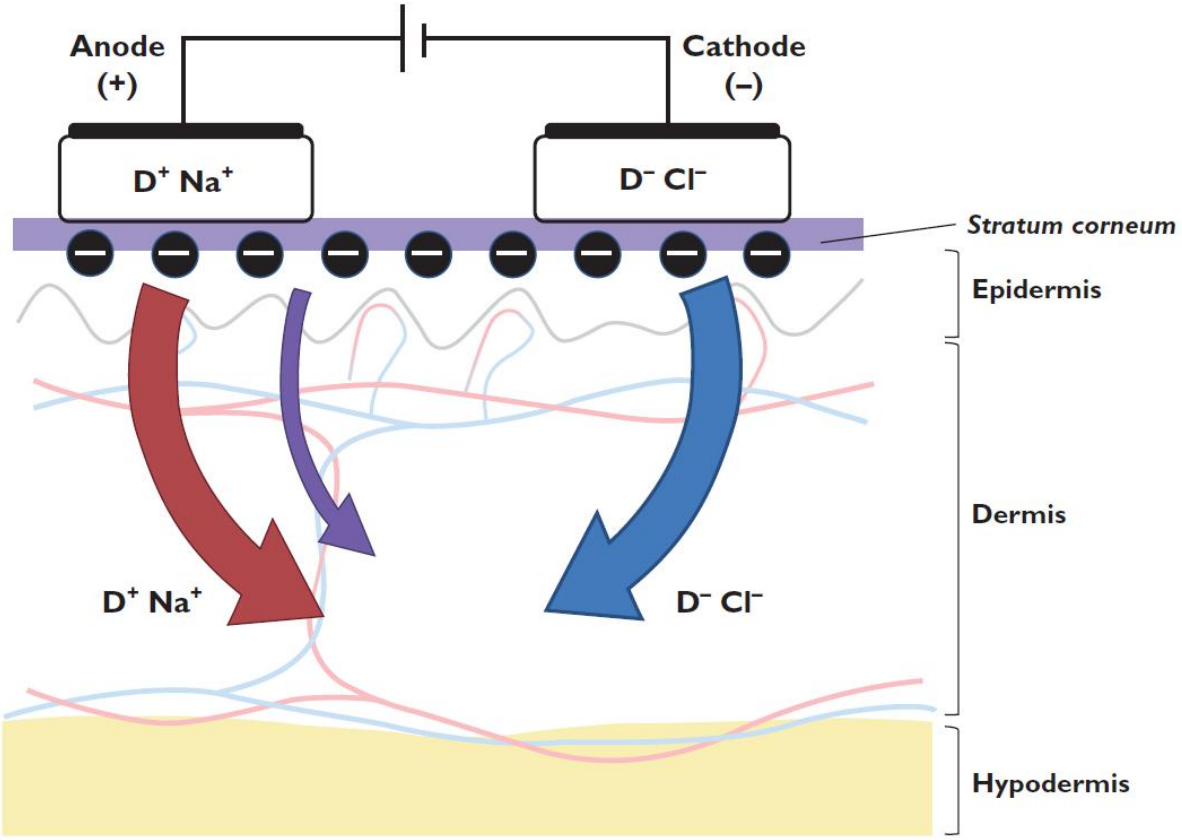


Figure 30 : Représentation du transport iontophorétique. Les charges positives (D+) migrant depuis l'anode tandis que les charges négatives (D-) migrant depuis la cathode. Les flèches bleue et rouge représentent, respectivement, le sens anodal et cathodal. La flèche violette représente l'électro-osmose.

Bien que moins impliqué dans le transport iontophorétique, le transfert par « shunt » permet de faire passer certaines molécules dans et/ou à travers la peau. Le courant électrique empruntant le chemin le moins résistif, certaines voies seront donc préférentiellement utilisées telles que les follicules pileux, les glandes sébacées ou les zones lésées de la peau[5,6]. De plus, une réorientation protéique induite par le courant électrique engendrera la formation de micropores, facilitant le passage des molécules[7].

3.2.2 Facteurs influençant l'iontophorèse

Certains facteurs influencent le transport iontophorétique. Comme dans tout circuit électrique, les caractéristiques de l'iontophorèse dépendent des éléments qui composent le système.

Facteurs liés à la peau.

La peau est notre principale interface avec l'extérieur. Son épaisseur varie en fonction de la zone du corps, permettant une protection plus ou moins importante face aux agressions et intrusions, plus spécifiquement grâce au SC. Le passage iontophorétique est donc fortement influencé par l'épaisseur du SC.[4]

Enfin la composition de la peau, qui varie selon les individus, a une influence sur sa résistance électrique, ce qui *in fine* influence le transport iontophorétique.

Facteurs liés au circuit électrique.

Il en existe deux principaux, à savoir le sens du courant et sa quantité. Le premier élément, le sens du courant, peut comme expliqué précédemment, et selon la polarité du courant, associer les phénomènes d'électromigration et d'électro-osmose.

La quantité de courant (Q), exprimée en coulombs, est fonction de l'intensité du courant (I, exprimée en ampères) et de sa durée d'application (t, en secondes). Elle est définie par l'équation $Q = I \times t$. Il existe une relation entre la quantité de courant et le flux iontophorétique[8,9], il est donc possible de faire varier le temps d'application ou l'intensité du courant délivré afin de faire varier la dose administrée. Toutefois, la difficulté à contrôler la dose de médicament administrée reste la principale limite de cette technique du fait des différents facteurs en jeu. La quantité de courant administrée sera également influencée par la surface de l'électrode en contact avec la peau. On parle ainsi de « densité de courant », qui représente la quantité de courant par unité de surface (en général des cm^2). Il faut noter que les densités de courant utilisées chez l'Homme sont très variables, allant de quelques $\mu A\ cm^{-2}$ à 500 $\mu A\ cm^{-2}$, qui est souvent considérée comme la densité maximale du fait du risque de brûlure au-delà[337]. Enfin le type de courant appliqué a également une influence. Différents protocoles de courants continus ou pulsés ont été testés, et modifient le transport iontophorétique[344].

Facteurs liés à la molécule.

Comme pour le sens du courant, la charge de la molécule sera le premier critère à prendre en compte puisqu'il définira la polarité de l'iontophorèse. Le second élément sera la

concentration de la solution. En théorie, plus la concentration de la solution est importante, plus le passage iontophorétique sera facilité. En pratique ce lien n'est pas toujours linéaire, du fait de la possibilité d'un effet plateau par saturation du passage iontophorétique[336]. Le facteur clef sera d'avantage la présence de compétition ionique[11]. Le courant électrique agissant sur toutes les molécules ionisées, l'ensemble les éléments chargés de la solution seront susceptibles de migrer. Comme nous l'avons vu précédemment, la quantité de courant peut être contrôlée et transportera les éléments de même charge, que ce soit la molécule d'intérêt ou bien les ions de charge identique, appelés co-ions. Cette compétition ionique reste toutefois inévitable puisque les solutions de solubilisation et de stabilisation des drogues à administrer en sont pourvues.

Le troisième élément est le lien entre pH de la solution et le point isoélectrique de la peau, qui implique que la charge de la peau (négative à pH neutre, comme expliqué plus haut) s'inverse pour des solutions de pH inférieur à 4. Ceci est très peu observé en pratique chez l'Homme, puisque des solutions trop acides ou trop basiques ne sont pas utilisées pour des raisons de sécurité.

En revanche, le degré d'ionisation de la molécule en fonction de son pKa (ou de son pI si elle comporte plusieurs fonctions) et du pH de la solution est un élément primordial. En effet, selon l'équation d'Henderson–Hasselbalch, à pH=7 un acide faible de pKa=4 sera 1000 fois plus présent sous forme ionisée que sous forme non-ionisée ; en revanche, à pH=7 une base faible de pKa=8 sera seulement 10 fois plus présente sous forme ionisée. Il est donc indispensable de contrôler le pH de la solution afin d'augmenter la forme ionisée et de maximiser ainsi le transport iontophorétique.

Pour illustrer ces facteurs, prenons l'exemple du tréprostinil, un analogue de la prostacycline que nous avons largement utilisé au cours de nos travaux (figure 30). Au-dessus d'un pH 5 en solution, cette molécule reste fortement chargée négativement. En dessous d'un pH 5 (plus précisément à partir de pH 2), elle perd des charges négatives et devient neutre. Pour réaliser une administration iontophorétique de cette molécule, il sera préférable de la garder chargée négativement, à pH neutre par exemple, afin de profiter de l'électromigration en la plaçant au niveau de la cathode. En revanche dans la situation théorique d'un pH inférieur à 2, notre molécule serait neutre et nous pourrions utiliser le flux électroosmotique afin de l'administrer. Suite à l'inversion de la polarité cutanée, nous la placerions toutefois à la cathode.

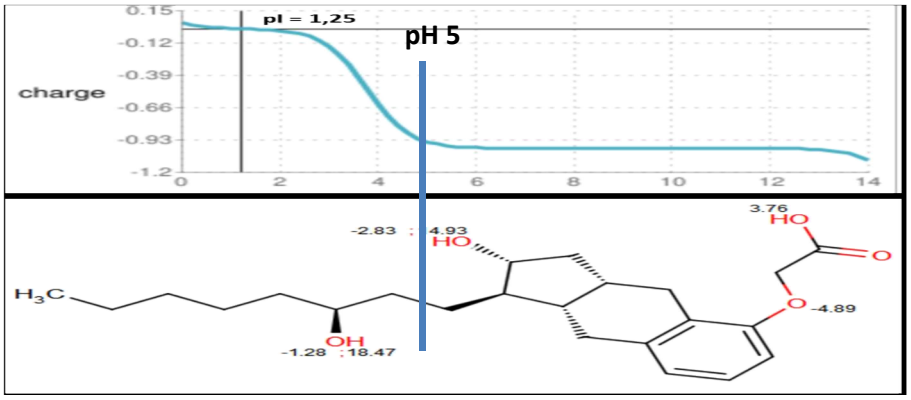


Figure 31 : Profil d'ionisation du tréprostinil

3.2.3 Avantages et limites de l'iontophorèse

L'avantage principal de l'iontophorèse thérapeutique est qu'elle permet l'administration d'une molécule par voie cutanée de manière non-invasive (avantage par rapport à la microdialyse ou aux micro-injections) et active grâce au courant électrique (avantage par rapport aux formes topiques classiques comme les crèmes, les pommades ou les gels). Toutefois, l'administration locale n'est pas synonyme d'effet local, puisque comme toutes les voies d'administration cutanée, il peut y avoir une absorption non négligeable, avec pour conséquence des effets systémiques. Cela a été mis à profit dans le développement de plusieurs médicaments (fentanyl, triptans, etc). Toutefois, l'absorption dépend étroitement des propriétés de la molécule et de l'état de la peau. Dans d'autres situations, un effet local est recherché, et l'iontophorèse cutanée ou ophtalmologique ont largement été étudiées avec cet objectif.

Malgré ces avantages, l'iontophorèse présente plusieurs limites. La première est que la quantité de médicament administrée n'est pas connue précisément ; en effet, une quantité importante de principe actif reste au niveau de l'électrode, une autre partie, très variable, reste au niveau du tissu où elle a été administrée, et une partie diffuse dans la circulation générale. Les méthodes permettant de quantifier le transport iontophorétique *in vivo* sont par ailleurs complexes à mettre en œuvre et coûteuses. Enfin, l'iontophorèse peut entraîner des réactions liées au courant électrique, telles que des vasodilatations courant-induites, des érythèmes, un prurit, ou plus grave des œdèmes ou des brûlures.

3.3 Courant électrique et cicatrisation

3.3.1 Effets cellulaire du courant électrique

Utiliser le courant électrique en thérapeutique n'est pas chose nouvelle. Dès 1794, Luigi Galvani a découvert qu'il existait un courant endogène au corps humain[346]. Par la suite il a été montré que les cellules pouvaient se déplacer en fonction de ce courant. Ce mouvement cellulaire sous l'effet d'un champ électrique est appelée la « galvanotaxie » (ou « électrotaxie »).

De nombreuses études ont depuis permis d'en connaitre d'avantage sur l'effet du courant électrique sur la physiologie humaine. C'est ainsi qu'au XIXe siècle, Emil Du-Bois Reymond réalisa le premier enregistrement d'un courant endogène au niveau d'une plaie[347] et qu'au XXe les premiers traitements de plaies chroniques par courant électrique virent le jour. Depuis le début du XXIe siècle, l'utilisation du courant électrique est proposée comme une option dans la prise en charge non pharmacologique de certains types d'ulcères. En effet, son utilisation est reconnue et soumise à remboursement par la FDA en cas d'échec thérapeutique pour le traitement des ulcères de pression et les ulcères diabétiques.

Sur le plan mécanistique, l'application d'un courant exogène vise à renforcer les effets du courant endogène, présent de manière physiologique au niveau de la peau saine. En effet il existe une différence de potentiel « verticale » au sein de la peau : des canaux Na^+/Cl^- maintiennent cet équilibre entre la surface de la peau, et la jonction dermo-épidermique, aux environs de +25 à +40 mV. (schéma 31) En cas de lésion cutanée, cet équilibre sera rompu et un nouveau champ électrique, « horizontal » cette fois, sera créé, permettant le déclenchement d'une cascade de réponses cellulaires impliquée dans la cicatrisation[347].

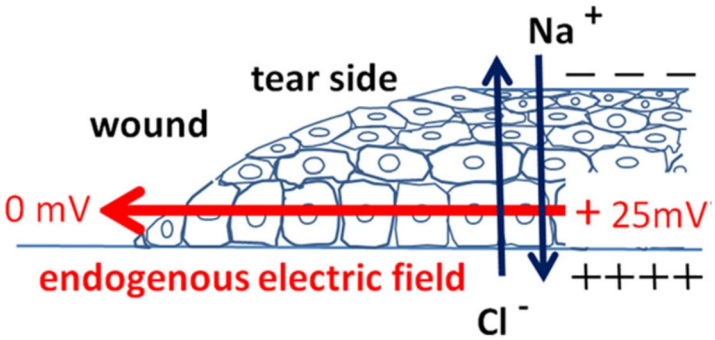


Figure 32 : courant électrique endogène au niveau d'un ulcère[347].

Des études in vitro ont permis d'en connaitre davantage sur les caractéristiques de ce phénomène. En effet, le courant joue un rôle primordial dans la migration cellulaire. Cela a été montré à de nombreuses reprises sur différents types cellulaires (macrophages[348], neutrophiles[349], neurones[350], cellules endothéliales[351] ou encore fibroblastes[352]). De plus, le sens de migration est dépendant du type cellulaire. Ainsi en présence d'un courant électrique, les kératinocytes migreront de l'anode vers la cathode, tandis que les fibroblastes et les macrophages migreront dans le sens opposé[352–356].

Le courant électrique intervient aussi dans la différenciation, la régénération cellulaire, et l'inflammation. Chang *et al.* ont exposé des cellules souches nerveuses (NPCs) de souris à un courant pulsé[357]. Ils ont pu observer des modifications morphologiques et phénotypiques conduisant à la différenciation des NPCs en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Falanga *et al.* ont exposé ces cellules à un courant continu et ont observé une augmentation de production de TGFβ, cytokine fortement impliquée dans le processus de cicatrisation[358]. De plus, en présence d'un courant de type pulsé de haut voltage (HVPC), les fibroblastes en culture ont une augmentation de leur synthèse de collagène[359] ainsi que de leur production de FGF1 et FGF2[360]**.** Enfin, il a aussi été observé qu'une diminution de l'inflammation chez des rats exposés à un courant continu était corrélée avec une diminution de molécules pro-inflammatoires IL1α, IL2 et l'expression de NFkB[361,362].

L'explication de ces différents effets du courant électrique au niveau cellulaire n'est pas complètement clarifiée. *Zimolag et al.* propose l'hypothèse de l'implication de la voie PI3K/Akt dans la migration de cellules souches mésenchymateuse (MSCs). Il est connu que le complexe PI3K/Akt est impliqué dans de nombreuses réactions physiologiques, telles que la prolifération, la migration et la survie cellulaire[363]. En effet, suite au blocage pharmacologique de PI3K, il a été observé un arrêt de la migration cellulaire de MSCs. A l'opposé, la délétion d'un antagoniste de cette voie favorise la migration cellulaire. Toutefois, cette migration cellulaire semble être médiée par plusieurs facteurs. *Sato et al.* ont ainsi mis en évidence le lien entre PI3K et cGMP dans cette migration[364]. En effet, l'inhibition de ce complexe semble induire une migration cathodale, alors qu'un changement de concentration en cGMP peut inverser ce sens.

3.3.2 Courant électrique et cicatrisation

L'effet bénéfique du courant électrique sur la cicatrisation est connu depuis longtemps, même si son efficacité repose sur un niveau de preuve variable, globalement assez médiocre. Des travaux ont été conduits sur la cicatrisation des ulcères de pression[365], des ulcères veineux[366], ou encore pour diminuer l'insuffisance veineuse diabétique[367]. Le courant jouerait un rôle dans chaque étape de la cicatrisation[362].

Par ailleurs, l'efficacité pourrait également dépendre du type de courant à appliquer. En effet, il existe presque autant de protocoles d'application de courant électrique que d'études, rendant la comparaison et le choix thérapeutique complexe. On peut distinguer trois principaux types de courants : le courant continu (DC), le courant alternatif (AC) et le courant pulsé (pC) (Figure 32). Il existe au sein de ces trois groupes des sous-groupes plus spécifiques, comme par exemple le HVPC ou encore le courant pulsé de faible voltage (LVPC)[356,368]. De manière générale, dans le traitement des ulcères il est recommandé d'utiliser un courant de faible intensité afin d'éviter tout risque de lésion pour le patient[369].

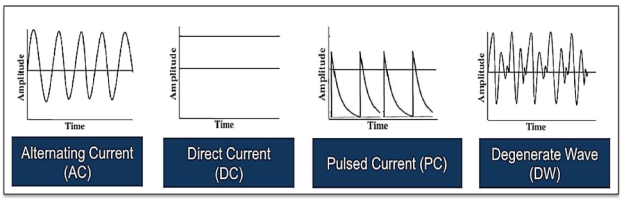


Figure 33 : Les 3 principaux types de courant[356].

Récemment, une méta-analyse conduite par notre équipe a mis en évidence le faible niveau de preuve des essais évaluant l'utilisation d'un courant électrique sur la cicatrisation[370]. Parmi les différents protocoles, le courant HVPC semblait être celui ayant la plus grande efficacité sur la cicatrisation cutanée. Ces données confirment celles obtenues par *Polak et al.*[371] en 2014. Cet effet bénéfique de l'HVPC pourrait venir du fait que ce type de courant stimulerait d'avantage le champ électrique endogène horizontal, diminuerait le risque de brûlures et augmenterait la profondeur de pénétration du courant[372]. Toutefois, aucune indication quant au sens du courant à utiliser n'est proposée.

Le courant électrique possède aussi deux autres fonctions pouvant avoir un impact fort pour la cicatrisation. Tout d'abord son effet bactéricide[373]. Les mécanismes en jeu ne sont pas complètement connus. Trois hypothèses ont été formulées. Les deux principales concernent la

destruction de la paroi bactérienne et le blocage de la multiplication cellulaire[374]. La troisième hypothèse serait liée aux peptidoglycanes situés au niveau de la membrane. Ces éléments sont chargés négativement ce qui attirerait les bactéries vers l'anode, lieu d'attraction des macrophages, améliorant l'efficacité de ces derniers[375]. Enfin les courants génèrent aussi la production de certains radicaux libres qui pourraient avoir un effet sur les bactéries[376].

3.3.3 Courant électrique et PGI_2

Le courant électrique seul est aussi reconnu pour son action vasodilatatrice (CIV). Des études sur l'iontophorèse d'eau ionisée a permis d'observer une vasodilatation locale au niveau des électrodes[377,378]. L'amplitude de cette réponse est dépendante de la charge électrique appliquée[379] ainsi que du type de courant appliqué. A charge égale, un courant de type discontinu répété aura un effet supérieur à celui du courant continu[377].

La CIV est principalement médiée par les nerfs sensitifs. En effet, elle disparait lors d'une anesthésie locale et est fortement réduite après une désensibilisation des fibre-C nociceptives par traitement à la capsaïcine[379]. La stimulation des récepteurs ASIC3 et TRPV1 permettra la libération de CGRP qui, après fixation sur leur récepteur CGRPr, activera la voie de l'AC permettant la relaxation de la CML[43,380]

Il a aussi été démontré l'implication de la voie de la PGI_2 dans cette réponse vasomotrice. Cette CIV est diminuée par l'administration d'aspirine ou d'indométhacine (deux inhibiteurs non spécifiques des COX[379,381]) mais pas par le celecoxib (inhibiteur spécifique de COX-2[377,379,381]), suggérant le rôle principal de COX-1 dans cette réaction. En effet, lors d'une CIV, l'activation de COX-1 permettra la synthèse de PGI_2 qui, par son action sur IPr, engendrera une relaxation vasculaire (Figure 33). Toutefois, elle n'implique pas la voie du NO[382].

Il est possible d'observer une CIV au niveau des deux électrodes (cathode et anode), mais elle sera trois fois plus importante au niveau de la cathode[379,383,384].

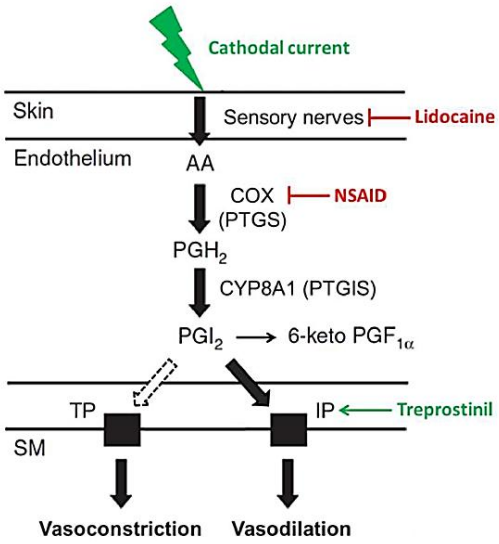


Figure 34 : Voie de signalisation de la vasodilatation induite par le courant. Adapté de [382]

Hypothèses et objectifs de travail

Le diabète et la sclérodermie systémique sont deux pathologies associées à une dysfonction endothéliale et un retard de cicatrisation. Comme nous venons de le voir, la voie de la PGI_2 semble fortement impliquée dans les processus de cicatrisation et sa stimulation exogène pourrait être une piste prometteuse dans le traitement de ces ulcères chroniques. Toutefois, la prostacycline endogène possède une demi-vie très courte. Plusieurs analogues de la PGI_2, possédant des caractéristiques plus stables, existent sur le marché à l'exemple de l'iloprost (demi-vie de 30 à 60 minutes) ou encore le tréprostiniil (demi-vie longue de 3 à 5 heures). Toutefois leur administration par voie systémique expose le patient à de forts effets indésirables et un suivi en structure hospitalière.

Afin de limiter les effets négatifs de la voie systémique, nous avons développé dans notre équipe l'administration locale d'analogues de la PGI_2 par iontophorèse. Nous avons tout d'abord screené différentes molécules chez le rongeur, et démontré la faisabilité de l'administration iontophorétique d'un analogue de la PGI_2, le tréprostinil, qui permet d'induire une vasodilatation cutanée prolongée[385]. Ces résultats ont été confirmés ensuite chez des sujets sains[386], en montrant que cette méthode permettait d'obtenir une concentration dermique élevée, et une concentration systémique faible[387]. Dans la continuité de ces travaux, deux études cliniques ont permis de montrer que l'effet vasodilatateur prolongé était également observé chez des patients sclérodermiques[387] et diabétiques[388] sans ulcère.

Dans le cas spécifique de la cicatrisation, nous émettons l'hypothèse qu'un traitement iontophorétique permettrait de coupler l'effet pharmacologique du médicament administré avec l'effet courant du dispositif. Cela permettrait d'administrer une concentration suffisante d'analogue de la PGI2 au niveau de la plaie, tout en limitant la toxicité. Le courant potentialiserait quant à lui cet effet de par son action sur la voie de la PGI2[382], et sur la migration cellulaire dans les processus de cicatrisation[363].

Se basant sur ces résultats, l'objectif de cette thèse est d'établir la preuve de concept que l'administration iontophorétique de tréprostinil améliore la cicatrisation d'ulcères cutanés réalisés sur des modèles murins pathologiques.

Dans un premier temps nous avons évalué l'effet de l'iontophorèse de tréprostinil sur la cicatrisation cutanée d'ulcères par excision sur un modèle murin sclérodermique. Ensuite, nous nous sommes intéressés à son effet sur la cicatrisation d'ulcères cutanés ischémiques ou par excision, sur un modèle murin diabétique.

Partie 1

Effet de l'iontophorèse de tréprostinil dans le traitement des ulcères cutanés sur un modèle murin sclérodermique.

La sclérodermie systémique, comme nous venons de la voir, est caractérisée par une dysfonction microvasculaire associée à la survenue d'ulcères digitaux chroniques. De son côté, la PGI_2 possèdent de nombreux arguments soutenant son implication dans les processus de cicatrisation. Toutefois, les traitements par administration systémique exposent les patients à de forts effets indésirables. L'utilisation d'une administration locale par iontophorèse, permettrait de diminuer la dose administrée au patient en maintenant un effet médicament local fort.

L'objectif de cette étude Succinctement, lors de cette étude, nous avons tenté d'évaluer l'efficacité d'un traitement par iontophorèse de tréprostinil sur la cicatrisation d'ulcères cutanés excisionnels sur un modèle murin sclérodermique. Nous avons choisi un modèle génétiquement modifié, uPAR, qui possède une délétion du gène codant pour le récepteur de l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA-Receptor). Ce uPAR intervient dans de nombreux processus cellulaire comme la différenciation, la prolifération, la migration et l'adhésion. Mais il joue surtout un rôle central dans le système fibrinolytique et dans le remodelage tissulaire. Il est le plus récent des modèles de sclérodermie publié. Se basant sur les travaux du Dr Kotzki, nous avons réalisé des ulcères excisionnels sur le dos épilés de ces animaux (un ulcère par animal). Afin de répondre à la problématique de la fermeture mécanique de la plaie des rongeurs, nous avons utilisé une attelle anti-contraction à laquelle nous avons ajouté une électrode de iontophorèse afin de réaliser notre protocole de traitement. Dans un souci d'étanchéification, nous avons maintenu le dispositif au moyen de 6 points de suture et de la résine epoxy. Ainsi équipé, il nous a été possible de réaliser nos sessions de traitement sans avoir à mobiliser la zone laissée (par mouvement cutanée).

Les résultats principaux de cette étude sont doubles. Tout d'abord nous avons pu démontrer que les souris $uPAR^{-/-}$ possèdent un retard de cicatrisation comparé à leur contrôle ($uPAR^{+/+}$). Deuxièmement, nous avons pu mettre en évidence une amélioration du délai de cicatrisation des ulcères traités. En effet, on observe une amélioration du délai de ré-épithélialisation lors de l'administration iontophorétique de tréprostinil. A l'inverse de ce que

nous attendions au vu de la littérature, nous n'observons pas d'effet courant seul sur la cicatrisation.

En conclusion de ce travail, nous avons tout d'abord validé le modèle uPAR-/- comme possédant un retard de cicatrisation. Ce point nous permet de renforcer le postulat de son utilisation dans les études pré-cliniques concernant la sclérodermie. Dans un second temps, nous démontré la faisabilité et l'efficacité de l'iontophorèse de tréprostinil dans le traitement local des ulcères excisionnels sur ce modèle.

Vous trouverez à la suite de cette introduction, l'article issu de cette étude.

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

Sylvain KOTZKI[1,2*], Yann SAVINA[1,2*], Raphael BOUVET[1], Houda ABLA[1], Aurélie PAGNON[3], Océane COMBE[1], Claire ARNAUD[1,2], Diane GODIN-RIBUOT[1,2], Françoise STANKE-LABESQUE[1,2,4], Jean-Luc CRACOWSKI[1,2,5], Matthieu ROUSTIT[1,2,5]

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

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

3 Novotec, 69007 Lyon, France ;

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

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

*equally contributed to this work

Corresponding author:

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

Tel +33 4 76 76 92 60

Fax +33 4 76 76 92 62

E-mail: MRoustit@chu-grenoble.fr

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

INTRODUCTION

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare, chronic disease characterized by fibrosis, autoimmune abnormalities and vascular alterations, the latter leading to Raynaud's phenomenon and digital ulcerations (DUs) [1]. DUs affect about 30% of SSc patients each year, and complications include pain, functional impairment, gangrene and amputations, with a major negative impact on the quality of life [2,3]. Few drugs have been shown to be effective to enhance wound healing of SSc-related ulcers. Bosentan has been indicated to prevent DUs in patients at risk, but it has no efficacy on existing ulcers [4]. A recent randomized, controlled trial has failed to demonstrate efficacy of sildenafil, this remains to be confirmed given that the primary end point was not reached [5].

To date, intravenous iloprost, a prostacyclin analogue, is the only recommended treatment for active SSc-related DUs [6]. However, its benefit is counterbalanced by dose-limiting, vasodilatation-induced side effects (e.g. severe headaches, flushing, tachycardia and hypotension). These safety issues require hospitalization and close monitoring, which increase costs. The paradox is that impaired digital microvasculature in SSc prevents the drug, when administered intravenously, from diffusing properly to the wounded area.

Local treatment may be proposed to get around this issue. We previously demonstrated that digital iontophoresis, a noninvasive, current-driven drug delivery method, could be used to administer treprostinil, another prostacyclin (PGI_2) analogue, into the skin of rodents, healthy subjects and SSc patients, leading to a significant increase of skin perfusion [7–9]. This original approach combines the pharmacological effect of the drug to the effect of the current itself. Indeed, endogenous electrical signals within the wound are known to play a role in healing, by increasing the directed migration of keratinocytes, fibroblasts and neutrophils [10]. Exogenous electric stimulation mimics this phenomenon with a positive impact on wound healing [11].

However, whether iontophoresis of treprostinil enhances healing of SSc-related ulcers has never been demonstrated. Given that iontophoresis protocols on human wounds are complex to set up, experimental data are required to establish the safety and the proof-of-concept before moving on to clinical studies. The present study aimed at developing a mouse model of SSc-related ulcerations, and at assessing the efficacy and the safety of iontophoresis of treprostinil in this model.

METHODS

Animals and study design

The protocol was approved by our local institutional review committee (APAFIS#6666-2016031415341059v7) and conducted in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. We used a genetic mice model of systemic sclerosis (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor gene, uPAR$^{-/-}$) and their controls. The uPAR$^{-/-}$ mouse model is a recent model of SSc mimicking the vascular and fibrotic features of SSc [12]. uPAR$^{-/-}$ mice were graciously provided by Prof. Meuth (Munster University, Germany) and crossed with wild-type (uPAR$^{+/+}$) mice on a C57BL/6J background to generate heterozygous mice. The latter were subsequently crossed to generate uPAR$^{-/-}$ and their uPAR$^{+/+}$ littermates as controls. PCR of tail-tip genomic DNA was performed to determine the absence or presence of a functional uPAR gene.

Ninety-three twelve-week old mice (46 uPAR$^{-/-}$ and 47 uPAR$^{+/+}$) mice were used from our breeding. These mice were allowed to acclimate to the photoperiod (12-hour light/12-hour dark) and temperature conditions (22±1°C) for one week prior to the start of the study with food and water *ad libitum*.

In order to account for sex, male and female were subsequently separated and each sex-group was randomized into three sub-groups, according to the treatment to be administered: sham (untreated wound), control (current + vehicle), treprostinil (current + treprostinil). From day 0 (wounding) until complete re-epithelialization, the treatment was administered once daily, five days a week. Our primary objective was to assess whether the combination of treprostinil and current (iontophoretic administration) accelerates wound healing, as compared with current alone and sham condition.

Excisional wound model (EW)

Mice were anesthetized with isoflurane (induction during 3 min at 3%, and kept at 1.5% during all the procedure) and analgesia was induced just before wounding, using buprenorphin at 0.1 mg/kg (Buprecare®). Mice were shaved and a full-thickness, skin excision wound extending through the *panniculus carnosus* was then performed on the dorsal midline, with a sterile 6-mm biopsy punch. A rubber ring (20/27 mm) was centered and fixed around the wound with a bi-component epoxy glue, and secured with interrupted

3/0 nylon sutures as previously described [13]. Rubber ring splinting was used to minimize wound contraction [14]. Synthetic epoxy resin was applied to the perimeter of the rubber ring to improve adhesion to the skin and to protect it from mice bites. Excised tissue was fixed during 24h in an alcohol-formalin-acetic acid solution and then paraffin-embedded for histopathological analysis.

Iontophoresis protocols

The treprostinil solution was prepared from a commercial solution at 2.5 mg /mL (6.4 mM) (Remodulin®, Bioprojet Pharma, Paris, France), diluted in isotonic sodium chloride (NaCl 0.9%) (Aguettant, Lyon, France) to obtain a 0.64 mM solution. The same NaCl 0.9% solution was used as control. Treatment was applied daily from day 0 to day 4 (week 1) and from day 7 to day 12 (week 2). Solutions were administered during 20 minutes using a 100 µA cathodal continuous current, since treprostinil is negatively charged at the skin physiological pH. We previously showed that this iontophoresis protocol induces sustained vasodilation [15,16].

Assessment of wound healing

Wound healing was quantified daily from photographs taken with a digital camera and a 14 mm^2-diameter ring placed around the ulcer, in order to have a size reference. Analyses were made blinded to the group using ImageJ software [17], and were expressed as wound area (mm^2) and its daily percent decrease from baseline (day 0) wound area. Areas under the curve (AUC) of wound healing over time were subsequently calculated.

Assessment of microvascular reactivity

Before wounding and after complete re-epithelialisation, endothelial and non-endothelial skin microvascular reactivity were explored. Skin blood flow was continuously recorded using laser Doppler Imaging (PIM3; Perimed, Järfälla, Sweden) before and during iontophoresis of vasodilators on the hairless back, using a 1.2 cm^2 electrode. Endothelium-dependent function was assessed using iontophoresis of acetylcholine (ACh) at 20 mg/mL (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) with a 100 µA anodal current during 10 min. Endothelium-independent function was assessed using iontophoresis sodium nitroprusside (SNP) at 20 mg/mL (Nitriate; SERB, Paris, France) with a 100 µA cathodal current during 10 min. Data were digitized, stored on a computer, and analysed offline with signal processing

software (PimSoft v1.5.4.8078, Perimed, Järfälla, Sweden). Baselines were expressed as arbitrary perfusion units (APUs) and vasodilatory responses as a percent change from baseline (%BL). The iontophoretic dose is defined as current multiplied by time of application Dose (µA.second)=current (µA) x time (seconds), and the amount of drug delivered is directly proportional to the iontophoretic dose applied [18].

Histology

Skin tissue samples were made at day 0 (D0) and after complete re-epithelialisation (FD). Biopsy were harvested and fixed in 4% formalin during 24 hours. After imbedding in a paraffin block, five-micrometer thickness sections were cut and hematoxylin, eosin and safran staining (Leica Autostainer XL, LeicaBiosystems®) was performed to evaluate morphological characteristics of the epidermis, dermis and hypodermis regions.

All samples were examined by a dermatopathologist blinded to the group, using an optical microscope (OLYMPUS BX51). Microvessel density was quantified by counting the number of microvessels per high power field (400 x magnification, diameter of field of view= 0.62 mm), by differentiating new blood vessels, which are tufted and have turgescent endothelial lining, from pre-existing vessels. Two different regions were observed: the edge of the wound (EW) and the center of the wound area (WA) (Figure 1).

Collagen deposition and its distribution were evaluated using a microscope with polarised light. Four groups were identified: 1, well organized collagen bundles; 2, disorganized and organized bundles; 3, disorganized fine fibres; and 4, no refringence.

The density of the inflammatory infiltrate was graded semi-quantitatively, as follows: 1, no inflammation; 2, discreet inflammation; 3, moderate inflammation; and 4, intense inflammation.

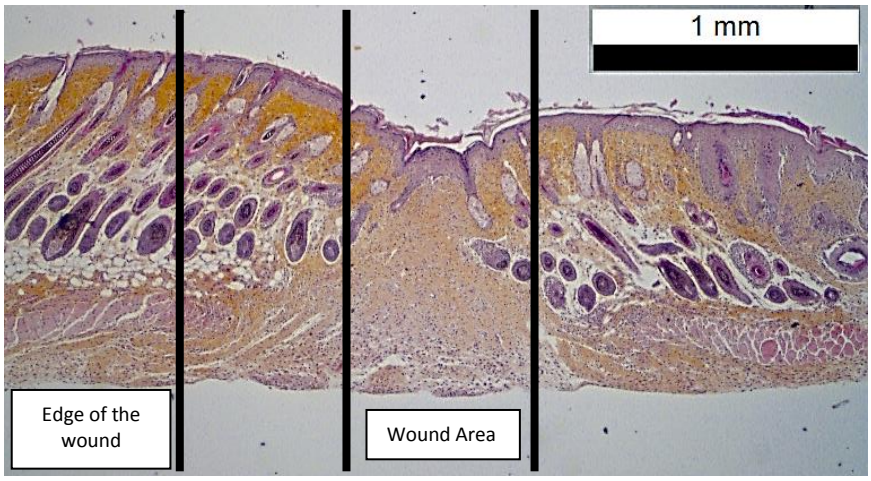


Figure 1: Histological regions

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SD, or as median [1st-3rd quartiles] when not normally distributed. Wound healing was analysed using general linear models. To validate the mouse-model and assess whether sex has an influence, genotype and sex were used as fixed factors, and the genotype*sex interaction was included in the model. The effect of treprostinil iontophoresis was assessed by including the treatment effect as a fixed factor. The Bonferroni method was used to account for multiple comparisons. In order to take into consideration wound area at baseline, the latter was introduced as a covariate in all models. Histological and biochemical data were evaluated using non-parametric tests. A p-value of 0.05 or less was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS 21.0 for Windows (IBM, SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Validation of a mouse model of SSc-related ulcers

uPAR$^{-/-}$ mice exhibited reduced wound healing over time compared with controls (AUC were 1765 ± 100 vs 1873 ± 59 %D0, respectively ; p=0.001) (Figure 2.A). We observed no significant difference in wound healing between female and male (1836.18 ± 27 vs 1794.64 ± 21 %D0, respectively; p=0.14). Moreover, the sex*genotype interaction was not significant (p=0.66), suggesting that impaired wound healing in uPAR$^{-/-}$ mice was comparable between male and female (Figure 2.B).

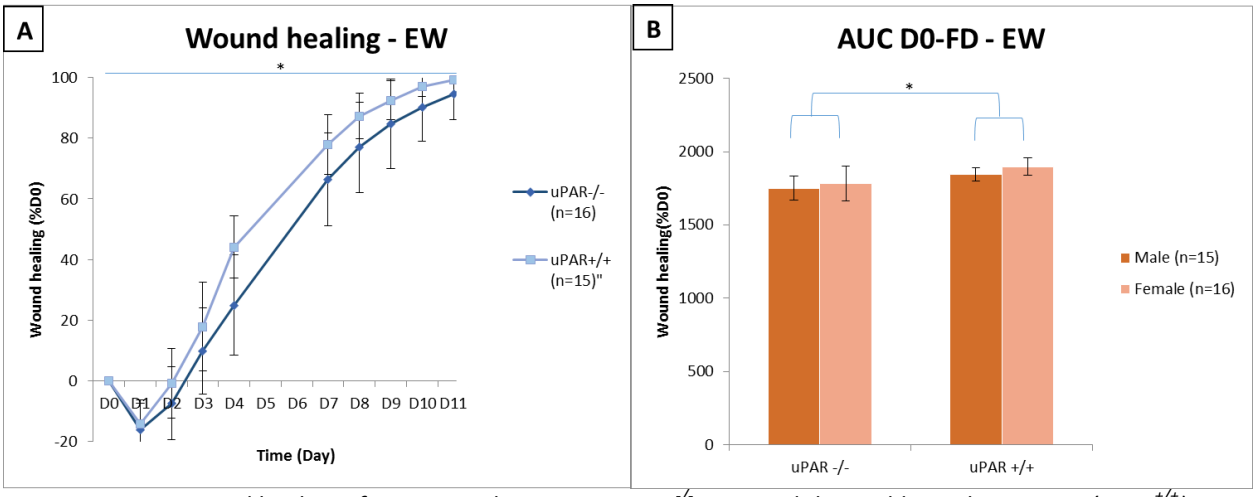


*Figure 2: Wound healing after a 6-mm biopsy in in uPAR$^{-/-}$ mice and their wild type littermates (uPAR$^{+/+}$), over 12 days, expressed as the daily percent decrease in wound area from baseline (D0) (A), and as its AUC between males and females (B). *p<0.05 for the effect of genotype (from the mixed effects model).*

We repeated these analyses on the early phase of the response (week 1) as a *post hoc* exploration, to see whether changes in wound healing were observed within the first 5 days of treatment. The results were comparable, with impaired wound healing in uPAR$^{-/-}$ mice compared with controls (399 ± 8 vs 425 ± 8 %D0, respectively; p=0.045) (Figure 3.A) but no significant difference between female and male (419 ± 9 vs 403 ± 8 %D0, respectively; p=0.22), and no gender*genotype interaction (p=0.971) (Figure 3.B).

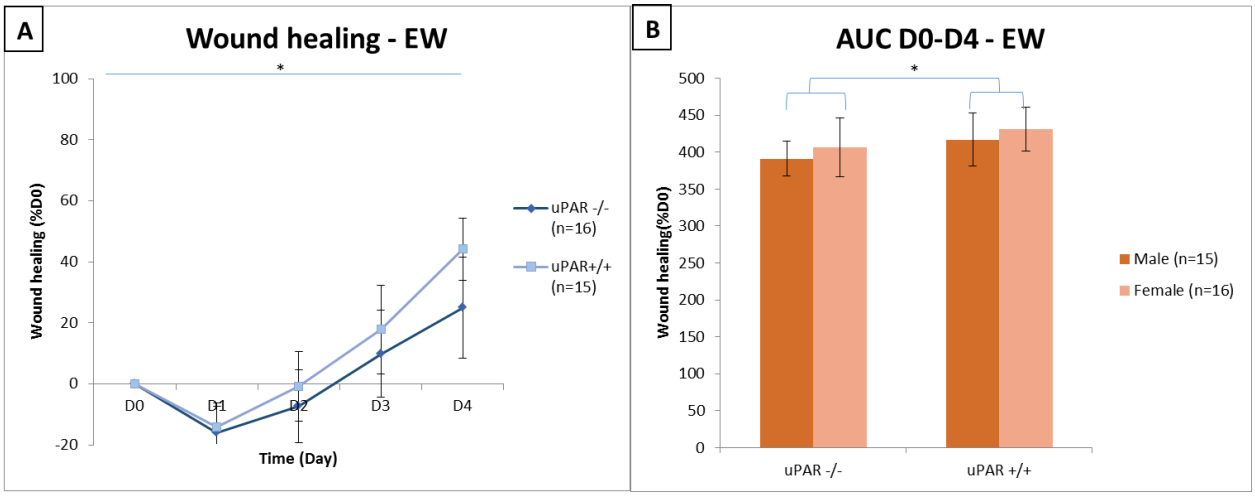


*Figure 3: Wound healing after a 6-mm biopsy in in uPAR$^{-/-}$ mice and their wild type littermates (uPAR$^{+/+}$), over 5 days, expressed as the daily percent decrease in wound area from baseline (D0) (A), and as its AUC between males and females (B). *p<0.05 for the effect of genotype (from the mixed effects model).*

Since no significant effect of sex was observed, we combined male and female in subsequent analyses.

No significant differences were observed on histological analysis between uPAR$^{-/-}$ and controls at baseline and after re-epithelialization (Table 1).

			uPAR$^{-/-}$			uPAR$^{+/+}$			p
			Median (IQ)		n	Median (IQ)		n	
D0	Edge of the wound	Vessels	3.0	[1.5-5.5]	5	1.5	[1.0-2.0]	8	0.147
		Neovessels	0.0	[0.0-0.0]		0.0	[0.0-0.0]		1.000
		Macrophages	1.0	[1.0-1.0]		1.0	[1.0-1.0]		1.000
		Collagen	0.0	[0.0-0.0]		0.0	[0.0-0.0]		1.000
FD	Edge of the wound	Vessels	1.0	[1.0-1.75]	8	1.0	[1.0-1.0]	11	0.324
		Neovessels	0.0	[0.0-0.0]		0.0	[0.0-0.0]		1.000
		Macrophages	1.0	[0.25-1.75]		1.0	[0.0-2.0]	15	0.946
		Collagen	0.0	[0.0-0.0]	9	0.0	[0.0-0.0]	14	1.000
	Wound Area	Vessels	1.0	[0.25-2.0]	8	0.0	[0.0-2.0]	11	0.632
		Neovessels	0.0	[0.0-1.5]		0.0	[0.0-10.0]		0.196
		Macrophages	1.0	[1.0-2.0]		2.0	[1.0-3.0]	15	0.596
		Collagen	0.0	[0.0-1.0]	9	1.0	[0.75-1.25]	14	0.061

Table 1: Histological data of edge of the wound and wound area in function of mice genotype. Data are expressed as median [1st-3rd quartiles].

Moreover, uPAR -/- microvascular response showed a slightly decreased for Ach in comparison with uPAR+/+ but data were not significantly different (SNP: uPAR-/-: 60.14 ± 28; uPAR+/+: 55.7 ± 24; p=0.738; Ach: uPAR-/-: 30.2 ± 27; uPAR+/+: 43.0 ± 23; p=0.718) ((Figure 4).

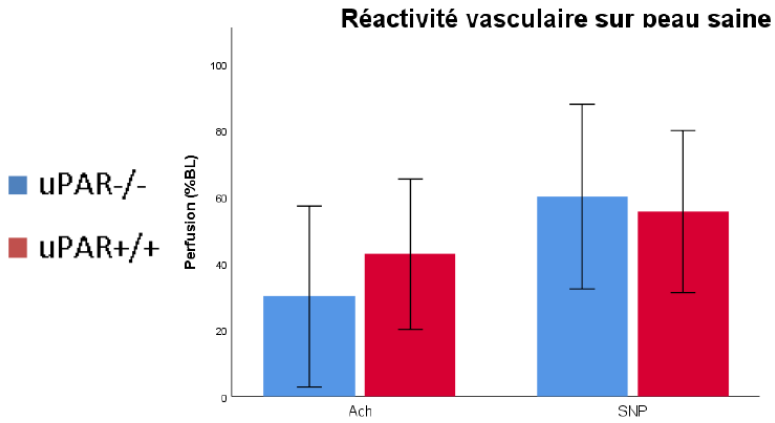


Figure 4: Basal skin microvascular response to SNP and Ach iontophoresis on uPAR-/- mice in comparison with their respective control. Data are expressed as increase of percentage of baseline.

Treprostinil iontophoresis enhances healing in uPAR model

Iontophoresis of treprostinil improved wound healing in comparison with control groups (AUC were, for treprostinil : 1890.5 ± 53, NaCl : 1786.0 ± 99, sham : 1765.7 ± 100 %D0; p=0.001) (Figure 3). Adjusted paired comparisons showed that treprostinil was significantly superior to both NaCl and sham groups (p=0.008 and p=0.001, respectively), while these two did not differ in a significant way (p=1.00) (Figure 4.A). There was no significant influence of gender on the effect of treprostinil iontophoresis (p=0.068 for the treatment*sex interaction).

Post hoc exploration on the early phase of the response yielded similar results (AUC were, for treprostinil : 452.5 ± 20, NaCl : 411.7 ± 41, sham : 398.9 ± 33 %D0 ; p<0.001) with significant differences between treprostinil and the NaCl and sham control groups (p=0.003 and p<0.001, respectively) (Figure 4.B).

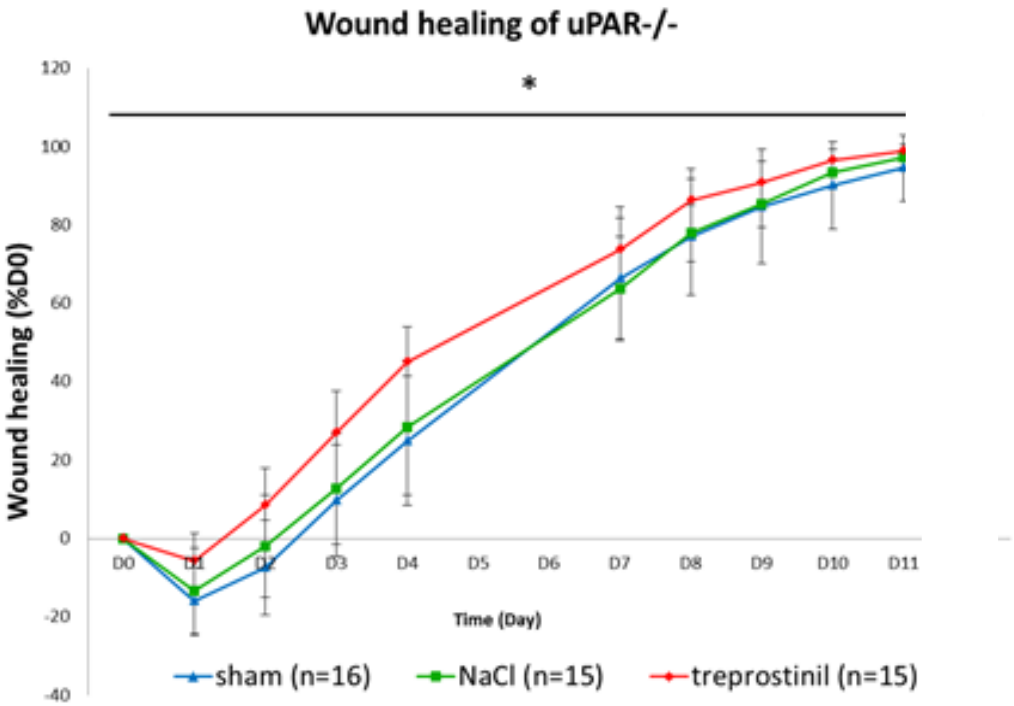


*Figure 3: Effect of treprostinil iontophoresis vs NaCl iontophoresis and sham control on wound healing expressed as the daily percent decrease in wound area from baseline over 12 days. *p=0.001 for the effect of treatment (from the mixed effects model); treprostinil vs NaCl and SHAM,*

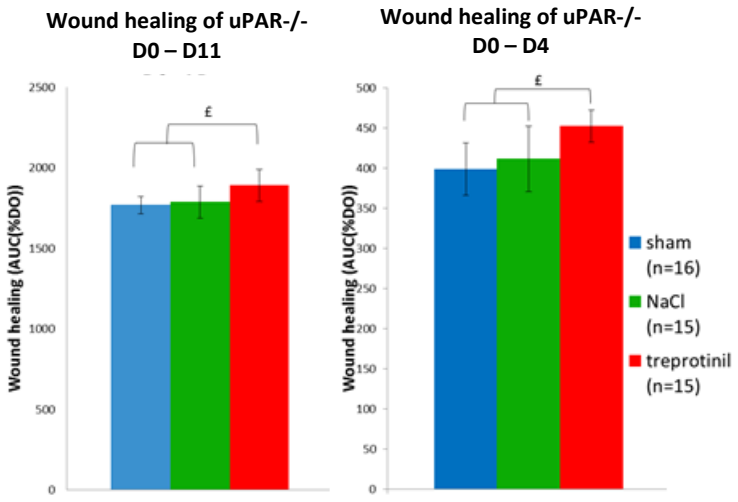


Figure 4:(A) AUC of wound healing over 12 days (B) and over the first five days of treatment .£<0.01 treprostinil vs NaCl and Sham.

Effect of the iontophoresis of treprostinil on angiogenesis

Treprostinil iontophoresis increased the number of vessels in the edge of the wound, as well as in the wound area, in comparison with controls. The number of neovessels was also increased with treprostinil iontophoresis but only in the wound area (Table 2).

		NaCl			Sham			treprostinil			p-value
		Median (IQ)		n	Median (IQ)		n	Median (IQ)		n	
Edge of the wound	Vessels	1	[1.0-1.75]	16	1	[1.0-1.0]	19	2	[1.0-3.0]	23	0.000
	Neovessels	0	[0.0-0.0]		0	[0.0-0.0]		0	[0.0-0.0]		0.269
Wound Area	Vessels	0	[0.0-0.0]		1	[0.0-2.0]		0	[0.0-1,0]		0.003
	Neovessels	5.5	[4.0-9.75]		0	[0.0-4.0]		5.5	[0.0-10.5]	22	0.003

Table 2: vessels and neovessels histological data of edge of the wound and wound area. Data are expressed as median [1st-3rd quartiles].

Paired analyses showed a significant increase in the number of vessels in the edge of the wound for the treprostinil group compared with NaCl and sham (p=0.007 and p<0.001, respectively)(Figure 5). In the wound area, the number of vessels was decreased in the NaCl group compared with treprostinil (p=0.01) and sham (p<0.001), while the number of neovessels was significantly increased in the treprostinil and NaCl groups, compared with sham (p=0.012 and p=0.001, respectively).

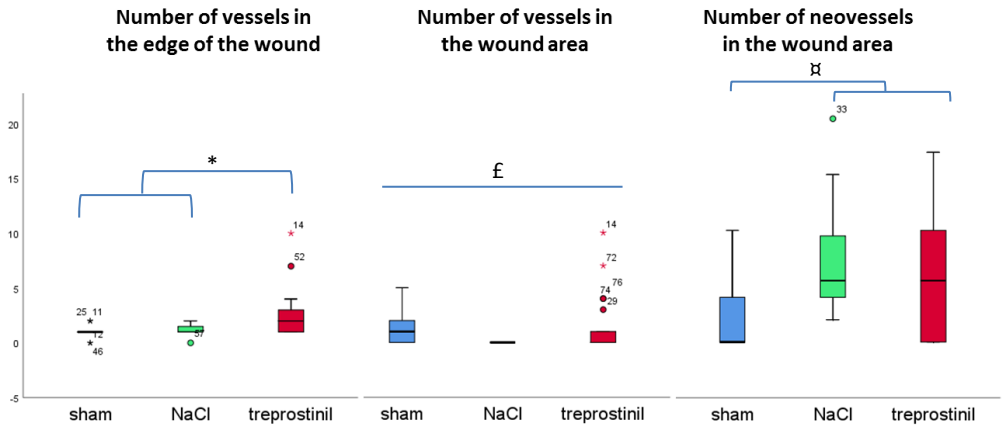


*Figure 5: quantity of vessels and neovessels in the edge of the wound and the wound area. *p<0.017 for treprostinil vs NaCl and SHAM, £p<0.017 for NaCl vs treprostinil and SHAM, ¤p<0.017 for SHAM vs treprostinil and NaCl (non-parametric tests, with Bonferroni correction).*

Treprostinil iontophoresis decreases inflammation in the edge of the wound

The histological analysis of inflammation showed a significant difference between groups in the wound area and the edge of the wound (Table 3). Treprostinil iontophoresis decreased inflammatory infiltrate in the edge of the wound in comparison with NaCl (p=0.007) and sham (p=0.004). In the wound area, we observed an opposite effect, namely an increase in markers of inflammation in NaCl compared to sham groups (p=0.006) (Figure 6).

	NaCl		sham		treprostinil		p-value
	Median (IQ)	n	Median (IQ)	n	Median (IQ)	n	
Edge of the wound	1 [0.0-2.00]	16	1 [1.0-2.0]	19	0 [0.0-1.0]	23	0.006
Wound Area	2 [2.0-3.0]		1.5 [1.0-2.0]		2 [1.0-3.0]		0.019

Table 3: Histological analysis of the inflammatory infiltrate in the edge of the wound and the wound area. Data are expressed as median [1st-3rd quartiles].

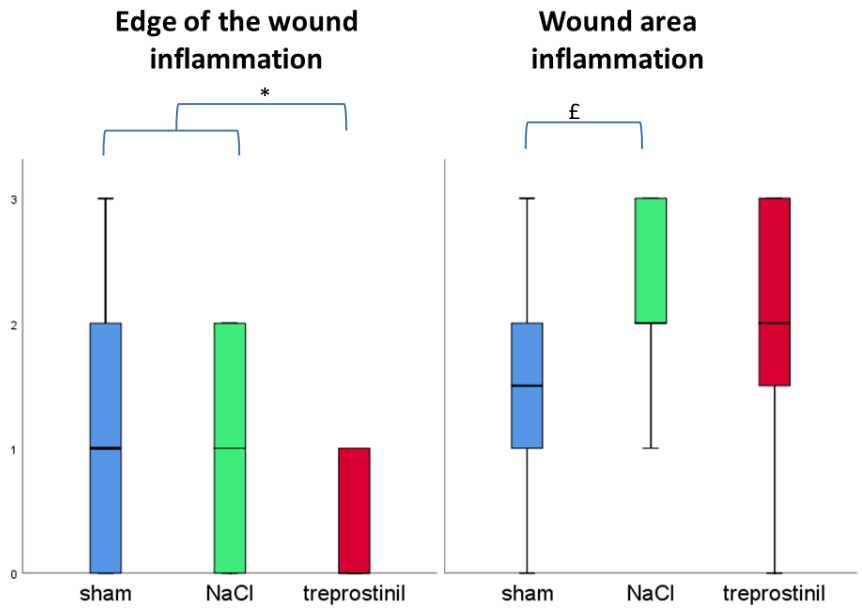


*Figure 6: Inflammation in the edge of the wound and the wound area. Data are expressed as median [1st/3rd quartiles].*p<0.017 for treprostinil vs NaCl and sham and £<0.017 for sham vs NaCl.*

DISCUSSION

In this study we investigated the effect of a new pharmacological approach on skin wound healing, using an innovative mouse model of scleroderma-related ulcers. Indeed, the pathophysiology of ulcers in patients with SSc is complex, and primary involves microvascular disorders. Yet, to date, there is no animal model adequately capturing the vasculopathy of SSc. Indeed, most models share characteristics of the fibrotic and immune disorders found in SSc [19–22]. The originality of the genetic uPAR$^{-/-}$ mouse model is that it also presents abnormal peripheral microvasculature [12], a key feature when studying SSc-related ulcers. Indeed, the inactivation of the urokinase-type plasminogen activator receptor is implicated in SSc-related microvascular alterations, excessive extracellular matrix production and impaired angiogenesis [23]. The present study provides further data supporting the use of uPAR$^{-/-}$ mice as an animal model of SSc microangiopathy, and more specifically for the study of SSc-related ulcers. Indeed, the traditional excisional wound model that we have used shows delayed healing in uPAR$^{-/-}$ mice.

The main objective of this study was to explore the effect of iontophoresis of treprostinil on this model. Our results show an improvement of wound healing, suggesting a pharmacological effect of treprostinil. Interestingly, treatment effect appears early in the healing process, since significant between-groups differences were observed within the first five days of treatment. However, there was no trend towards a superiority of current alone vs sham, suggesting the absence of any potentiation between the effect of the current and the effect of treprostinil. This was not expected, as a theoretical advantage of our approach was to take advantage of the effect of the current itself on wound healing. Indeed, exogenous currents can mimic endogenous skin currents, and stimulate motility of inflammatory cells [24] and fibroblasts [25], and improve angiogenesis [26]. Finally, cathodal currents are known to increase microvascular skin perfusion through PGI_2–dependent mechanisms, commonly referred to as “current-induced vasodilation” [27,28]. Although it did not translate into improved wound healing, we observed a significant effect of the current on angiogenesis, with an increase in the number of neovessels in the wound area with both iontophoresis groups compared to sham.

We cannot exclude that other current modalities would enhance wound healing. Unfortunately, in this protocol we were not able to test various current shapes and intensities like we ever did before [31] but this could be proposed to further explore the electrical effect on wound healing. To date, the choice between direct, alternative, high-voltage pulsed or low-intensity direct currents to improve cutaneous wound healing is still under debate [32,33].

Although we did not thoroughly explore this issue, these results therefore suggest that the effect of treprostinil on wound healing is more likely related to its potent vasodilatory effect through IP receptor stimulation, than through its angiogenic properties, which rely on IP-dependent mechanisms, but may also involve peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα)-dependent mechanisms [30]. Interestingly, the early effect of the administration of a PGI_2 is consistent with a prominent role of an IP-dependent pathway. Indeed, preliminary experiments

conducted in our lab have shown very early impairment in the wound healing process in IP-KO mice. This would explain why most of the effect was observed within the first five days of treatment.

This study has several limitations. The first one concerns the mouse model. To maintain waterproofing around the iontophoretic electrode, we fixed the splint with stitches, with a possible interaction with inflammation in the area. However, this is the best mice model for the wound healing mice experimentation. The development of a new splint model should be interesting to limited model interaction with wound healing processes. Another limitation concerns the imprecision of histological analyses, which were graded in a semi-quantitative way. Along with the small sample size, this may explain why we observed no difference between the two genotypes. Further exploration of the properties of the skin of uPAR$^{-/-}$ mice is therefore needed.

In conclusion, iontophoresis of treprostinil improves wound healing in a mouse model of SSc-related ulcers. This effect is mostly observed within the first few days of treatment, and is associated with enhanced angiogenesis. It is worth noting that current alone did not improve wound healing. These results provide evidence that iontophoresis of treprostinil should now be tested in patients with SSc-related digital ulcers.

REFERENCES

1 Gabrielli A, Avvedimento E V., Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;**360**:1989–2003. doi:10.1056/NEJMra0806188

2 Steen V, Denton CP, Pope JE, *et al.* Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl* 2009;**48 Suppl 3**:iii19-24. doi:10.1093/rheumatology/kep105

3 Hachulla E, Clerson P, Launay D, *et al.* Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol* 2007;**34**:2423–30.

4 Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, *et al.* Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:32–8. doi:ard.2010.130658 [pii]10.1136/ard.2010.130658

5 Hachulla E, Hatron P-Y, Carpentier P, *et al.* Efficacy of sildenafil on ischaemic digital ulcer healing in systemic sclerosis: the placebo-controlled SEDUCE study. *Ann Rheum Dis* 2016;**75**:1009–15. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207001

6 Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, *et al.* Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017;**76**:1327–39. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209909

7 Blaise S, Roustit M, Millet C, *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br J Pharmacol* 2011;**162**:557–65. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01045.x

8 Blaise S, Roustit M, Hellmann M, *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil induces a sustained increase in cutaneous blood flux in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2013;**53**:58–66. doi:10.1177/0091270011434352

9 Roustit M, Gaillard-Bigot F, Blaise S, *et al.* Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clin Pharmacol Ther* 2014;**95**:439–45. doi:10.1038/clpt.2013.255

10 Zhao M, Song B, Pu J, *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* 2006;**442**:457–60. doi:nature04925 [pii]10.1038/nature04925

11 Huttenlocher A, Horwitz AR. Wound healing with electric potential. *N Engl J Med* 2007;**356**:303–4. doi:10.1056/NEJMcibr066496

12 Manetti M, Rosa I, Milia AF, *et al.* Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Ann Rheum Dis* 2014;**73**:1700–9. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203706

13 Galiano RD, Michaels V Joseph, Dobryansky M, *et al.* Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;**12**:485–92. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x

14 Windsor ML, Eisenberg M, Gordon-Thomson C, *et al.* A novel model of wound healing in the SCID mouse using a cultured human skin substitute. *Australas J Dermatol* 2009;**50**:29–35. doi:10.1111/j.1440-0960.2008.00512.x

15 Blaise S, Roustit M, Millet C, *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br J Pharmacol* 2011;**162**:557–65. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01045.x

16 Kotzki S, Roustit M, Arnaud C, *et al.* Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *Eur J Pharm Sci* 2015;**72**:21–6. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.012

17 Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:671–5. doi:10.1038/nmeth.2089

18 Turner J, Belch JJF, Khan F. Current Concepts in Assessment of Microvascular Endothelial Function Using Laser Doppler Imaging and Iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med* 2008;**18**:109–16. doi:10.1016/j.tcm.2008.02.001

19 Asano Y, Sato S. Animal Models of Scleroderma: Current State and Recent Development. *Curr Rheumatol Rep* 2013;**15**:1–9. doi:10.1007/s11926-013-0382-7

20 Batteux F, Kavian N, Servettaz A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;**23**:511–8. doi:10.1097/BOR.0b013e32834b1606

21 Maeda T, Yamamoto T, Imamura T, *et al.* Impaired wound healing in bleomycin-induced murine scleroderma: a new model of wound retardation. *Arch Dermatol Res* 2016;**308**:87–94. doi:10.1007/s00403-015-1614-7

22 Beyer C, Schett G, Distler O, *et al.* Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum* 2010;**62**:2831–44. doi:10.1002/art.27647

23 D'Alessio S, Gerasi L, Blasi F. uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR-dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 2008;**121**:3922–32. doi:10.1242/jcs.037549

24 Hoare JI, Rajnicek AM, McCaig CD, *et al.* Electric fields are novel determinants of human macrophage functions. *J Leukoc Biol* 2016;**99**:1141–51. doi:10.1189/jlb.3A0815-390R

25 Simpson MJ, Lo K-Y, Sun Y-S. Quantifying the roles of random motility and directed motility using advection-diffusion theory for a 3T3 fibroblast cell migration assay stimulated with an electric field. *BMC Syst Biol* 2017;**11**:39. doi:10.1186/s12918-017-0413-5

26 Bai H, McCaig CD, Forrester JV, *et al.* DC Electric Fields Induce Distinct Preangiogenic Responses in Microvascular and Macrovascular Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:1234–9. doi:10.1161/01.ATV.0000131265.76828.8a

27 Gohin S, Sigaudo-Roussel D, Conjard-Duplany A, *et al.* What Can Current Stimulation Tell Us about the Vascular Function of Endogenous Prostacyclin in Healthy Rat Skin In Vivo? *J Invest Dermatol* 2011;**131**:237–44. doi:10.1038/jid.2010.267

28 Roustit M, Cracowski J-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci* 2013;**34**:373–84. doi:10.1016/j.tips.2013.05.007

29 Engel G, Rockson SG. Treprostinil for the treatment of severe digital necrosis in systemic sclerosis. *Vasc Med Lond Engl* 2005;**10**:29–32. doi:10.1191/1358863x05vm579cr

30 Biscetti F, Gaetani E, Flex A, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is crucial for iloprost-induced in vivo angiogenesis and vascular endothelial growth factor upregulation. *J Vasc Res* 2009;**46**:103–8. doi:10.1159/000143793

31 Kotzki S, Roustit M, Arnaud C, *et al.* Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci* 2015;**72**:21–6. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.012

32 Gardner SE, Frantz RA, Schmidt FL. Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: a meta-analysis. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*;**7**:495–503.

33 Thakral G, LaFontaine J, Najafi B, *et al.* Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabet Foot Ankle* 2013;**4**:1343–9. doi:10.3402/dfa.v4i0.22081

Partie 2

Effet de l'iontophorèse de tréprostinil dans le traitement des ulcères cutanés sur un modèle murin diabétique.

Le diabète est aussi caractérisé par une dysfonction endothéliale et des ulcères chroniques. Comme nous l'avons vu précédemment, l'administration iontophorétique de tréprostinil pourrait aussi dans ce cas améliorer le délai de cicatrisation des ulcères cutanés.

Comme pour l'étude précédente, nous avons évalué l'efficacité du traitement par iontophorèse de tréprostinil sur la cicatrisation d'ulcères excisionnels, mais aussi ischémiques, sur un modèle murin diabétique. Succinctement, nous avons choisi le modèle BKS, couramment utilisé dans les études s'intéressant au diabète, et reconnu pour son fort retard de cicatrisation (environ 21 jours pour un ulcère excisionnel contre 14 pour un contrôle C57BL6, données avec attelle anti-contraction). Certaines évolutions ont été apportées à ce modèle comparé au modèle uPAR$^{-/-}$ précédemment décrit. Tout d'abord, nous avons réalisé deux ulcères excisionnels ou ischémiques sur l'arrière train des animaux épilés, plus gros que dans la précédente étude. Afin d'augmenter notre force statistique et de diminuer le nombre d'animaux utilisés lors de ce protocole, nous avons traité chaque ulcère indépendamment. Deuxièmement, nous avons utilisé une attelle dite « légère ». Un anneau servant d'attelle était maintenu au niveau de la plaie non pas par des points de suture mais par une interface adhésive double face, utilisée dans les tests de réactivité vasculaire. Comparé au modèle précédent uPAR$^{-/-}$, nous avons pu adapter ce dispositif principalement parce que les animaux BKS sont moins agressifs entre eux que les uPAR$^{-/-}$. Nous nous sommes aussi intéressés au passage systémique de notre molécule en réalisant une étude de pharmacocinétique. Pour finir, nous avons réalisé une analyse de nos biospsies, d'une part en histologie et d'autre part par quantification biochimique.

Nous avons pu observer dans cette étude, une amélioration du délai de cicatrisation des ulcères, ischémiques et excisionnels, suite au traitement par iontophorèse de tréprostinil. Toutefois, cette amélioration n'a pu être expliquée par l'analyse des coupes histologiques. Nous espérons que les analyses biochimiques (certaines sont toujours en cours) nous apporterons de plus amples données afin d'en expliquer les mécanismes. Comme dans l'étude précédente, à l'inverse de ce que nous attendions au vu de la littérature, nous n'avons pas observé d'effet courant seul sur la cicatrisation.

En conclusion de ce travail, nous pouvons confirmer les résultats obtenus dans l'étude précédente, autrement dit que l'iontophorèse de tréprostinil accélère la cicatrisation, sur un modèle murin diabétique. Cet effet a aussi été démontré sur un modèle d'ulcère ischémique. Toutefois, au vu des résultats du courant seul, il serait intéressant de réfléchir à l'utilisation d'autres types de courant afin de potentialiser d'avantage l'effet pharmacologique des molécules d'intérêt et l'effet courant seul.

Vous trouverez à la suite de cette introduction, l'article issu de cette étude.

Iontophoresis of treprostinil promotes wound healing in murine models of diabetes.

Yann SAVINA[1,2], Sylvain KOTZKI[1,2], Raphael BOUVET[1], Emeline LEMARIE[1,2], Sophie BOUYON[1,2], Sandrine BRASSEUR[1,2], Hugo GIL[6], Candice TROCME[7], Françoise STANKE-LABESQUE[1,2,4], Jean-Luc CRACOWSKI[1,2,5], Matthieu ROUSTIT[1,2,5]

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

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

3 Novotec, 69007 Lyon, France ;

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

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

6. Pathology department, Grenoble-Alpes University Hospital, pôle biologie, 38043 Grenoble cedex 9, France.

7. CHU de Grenoble, institut de biologie et pathologie (IBP), CS 10217, 38043 Grenoble cedex, France.

Corresponding author:

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

Tel +33 4 76 76 92 60

Fax +33 4 76 76 92 62

E-mail: MRoustit@chu-grenoble.fr

Keywords: iontophoresis, treprostinil, microcirculation, wound healing, diabetes.

INTRODUCTION

Diabetic foot ulcers (DFUs) are a serious complication of diabetes mellitus. These chronic, non-healing wounds, thus represent a major public health concern and contribute to increase health costs[1]. Indeed, diabetes is the leading cause of non-traumatic lower-limb amputations[2], and the rise in the prevalence of type 2 diabetes worldwide increases the global burden of DFUs [3–5]. The pathophysiological context of chronic hyperglycemia causes, among others, inflammation[6], endothelial dysfunction[7,8] and neuropathy[1], and decreases immune response[9], and hampers cell proliferation, migration and organization[10].

Aside from complementary measures like pressure off-loading and infection control, current treatment of DFUs mostly rely on local care, such as debridement and dressings[11,12]. However, optimal care, complications are frequent, and approximately 25% of patients with DFU will have foot amputation[3], stressing the need for new treatments.

The microcirculation has a key role in tissue survival by maintaining perfusion, delivery of oxygen and nutrients. Blood flow is regulated by several vasodilating and vasoconstricting substances that are released by the endothelium to surrounding vascular smooth muscle cells, mediating vascular tone[13,14] . The concept of diabetic microangiopathy emerged during the first half of the twentieth century, and has since been considered as a hallmark of the disease. At the skin level, microvascular dysfunction contributes to tissue hypoxia, which in turn impairs the healing process and promotes DFU[15].

Several classical pathways explain how hyperglycemia damages the microvessels, e.g. aldose reductase and the polyol pathway, advanced glycation end products (AGEs), and protein kinase C activation (PKC)[16,17]. All of these pathways are enhanced, but also contribute to the production of reactive oxygen species (ROS) in the vascular wall. Superoxide rapidly reacts with nitric oxide (NO), a major regulator of endothelial function, which exerts a variety of deleterious effects in endothelial cells through peroxynitrite generation. Endothelial dysfunction in diabetes has almost exclusively been attributed to inflammation and impaired NO pathway. Yet, a substantial amount of experimental data now suggest a role for other mediators[18].

The prostacyclin (PGI_2) has long been known as a regulator of microvascular tone. It also has an important role in vascular homeostasis and angiogenesis, through vascular endothelial growth factor (VEGF)/NADPH Oxidase 4 (NOX4) signaling[19,20,21]. There is growing evidence that the PGI_2 pathway is dysregulated in diabetes, which contributes to microvascular dysfunction. Pioneer work showed that serum from patients with type 1

diabetes inhibited PGI2synthesis in cultured endothelial cells[22]. Experimental models of insulin resistance also show that overproduction of superoxide activates a variety of pro-inflammatory signals, and inactivates both eNOS and PGI_2 synthase[23] . Downstream glycosylation or desensitization caused by epigenetic modulation may lead to PGI_2 receptor (IP receptor) dysfunction[24]. Consistently, recent work shows that in diabetic patients, IP receptor expression on platelets inversely correlates with the severity of the disease, supporting the hypothesis of a global PGI_2-pathway dysfunction in diabetes[25].

The use of PGI_2 analogs in diabetes has been poorly explored, and to date there is no evidence to support any efficacy as a treatment of DFU[26]. Yet, recent data suggests that iloprost might improve peripheral microvascular function in humans[27]. While systemic administration of these drugs require hospitalization and expose to important, dose-limiting adverse effects, we aim at testing the effect of topical administration of PGI_2 analogs through iontophoresis, a non-invasive, current-driven drug delivery method[28]. It combines the effect of the drug to that of the current, which enhances vasodilation, cell migration and wound healing[29–31].

We have recently conducted a series of preclinical and clinical experiments to demonstrate the feasibility of delivering treprostinil into the skin of rodents and healthy humans[32–34], and showed that it induces sustained vasodilation, including on the lower limb of patients with diabetes [35]. However, whether treprostinil iontophoresis promotes wound healing in diabetes has never been shown. The aim of this study was therefore to determine whether the procedure improves wound healing in a mouse model of diabetes.

METHODS

Animals and study design

The protocol was approved by a local institutional review committee (APAFIS#8676-2017012318061452v6) and conducted in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Fourty-two twelve-week old male db/db mice (BKS(D)-Leprdb/JOrlRj), an obese genetic model of type 2 diabetes, were acquired from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). These mice were allowed to acclimate to the photoperiod (12-hour light/12-hour dark) and temperature conditions (22±1°C) for one week prior to the start of the study with food and water *ad libitum*. Blood

glucose levels were tested with a glucometer (Vario Onetouch®) to confirm that plasma glucose levels were above 300 mg/dL before getting into the study.

Ulcers were subsequently randomized into 3 sub-groups according to the treatment to be administered: sham (untreated wound), control (current + vehicle), treprostinil (current + treprostinil). At day 0, two wounds were made on the back of each animal, and a daily treatment was administrated (from day 0 for the excisional wound and from day 6 for the pressure ulcer) until complete re-epithelialized (final day of observation). Since the two sites from each animal were treated differently, there were three possible combinations (Figure 1).

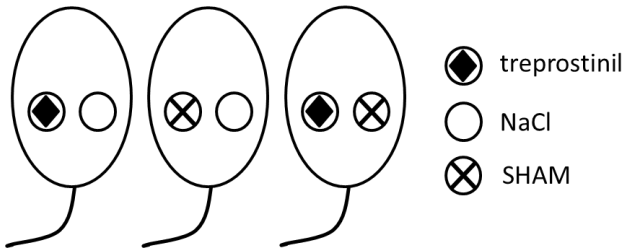


Figure 1: Three possible combinations of wounds care

Our primary endpoint was to assess whether the combination of treprostinil and current (iontophoretic administration) could accelerate wound healing delay as compared with current alone or no treatment.

Wound models

Excisional wound (EW)

Isoflurane mask was used for anaesthesia (induction 3min at 3%, and kept at 1.5% during all the procedure) and analgesia was injected before wound creation (Buprenorphin, 0.1mg/kg). Two full-thickness wounds extending through the panniculus carnosus were made on the shaved dorsum on each side of midline using an 8 mm biopsy punch and scissors. A 14 mm-diameter ring was affixed with tissue adhesive to protect ulcers as splint-function and covered with a bandage.

Pressure ulcer (PU)

Isoflurane mask was used for anaesthesia (induction 3% and kept at 15%) and analgesia was injected before wound creation (Buprenorphin 0.1mg/kg).We adapted a used PU protocol[36]. Two magnet plates (10 mm diameter, 5.5N, MAGSY, Zlín-Prštné, Czech Republic) were placed in their shaved skin of the dorsum region, pinching both the skin and the underlying panniculus carnosus. Pressure ulcers were formed after 3 ischemia–reperfusion cycles (I/R). Each cycle consisted of a 2 h period of magnetic pressure followed by a 15

minutes period of release. Mice were anesthetized only during magnet placement and removal steps.

In the 2 models, a final biopsy of the healed skin was made to assess skin quality.

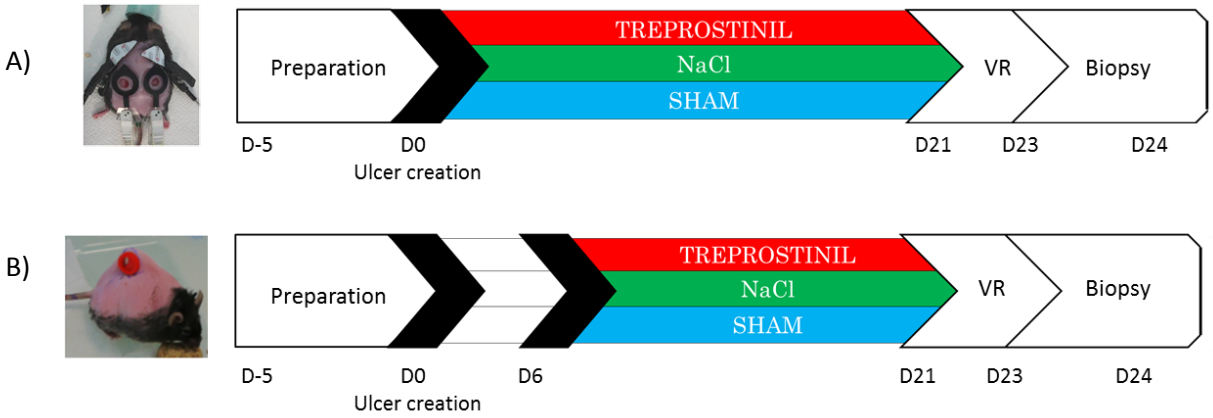


Figure 2: Study design for A) EW and B) PU.

Iontophoresis protocols

Commercial treprostinil solution at 2.5 mg /mL (6.4 mM) was used (Remodulin®, Bioprojet Pharma, Paris, France), and isotonic sodium chloride (NaCl 0.9%) (Aguettant, Lyon, France) was used as control. Treprostinil was diluted with 0.9% NaCl to a obtain 0.64 mM solution. Solutions were daily administered during 20-minutes with a 100 µA cathodal continuous current, since treprostinil is negatively charged at skin physiological pH. Active and passive electrodes were then connected to a generator (Figure 2). During each iontophoresis, animal were anesthetized.



Figure 3: BKS mouse with two excisional wounds during iontophoresis protocol.

Assessment of wound healing

Wound healing was evaluated by examining daily photographs taken with a digital camera and an 14mm²-diameter ring around ulcers to have a size reference. Analyses were made blinded to the group using ImageJ software[37], and were expressed as wound area (mm²) and its daily percent decrease from baseline (day 0 for EW, and D6 for PU) wound area. Areas under the curve (AUC) of wound healing over time were subsequently calculated.

Assessment of microvascular reactivity

Mice were anesthetized with inhaled isoflurane (induction 3min at 3%, and kept at 1.5%), and the dorsal surface of the mouse was shaved with an electric shaver, followed by treatment with a hair-removal cream (Veet)[38–40]

Before and after wound healing process, endothelial (Ach) and non-endothelial (SNP) dependent tests were performed. Skin blood flow was continuously recorded, using a laser Doppler Imaging (PIM3; Perimed, Järfälla, Sweden) during transcutaneous iontophoresis on the hairless back of the animals with an 1.2cm² electrode. Endothelium-dependent function was assessed using iontophoresis of acetylcholine (ACh) at 20 mg/mL (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) with a 100 µA anodal current during 10 min. Endothelium-independent function was assessed using iontophoresis sodium nitroprusside (SNP) at 20 mg/mL (Nitriate; SERB, Paris, France) with a 100 µA cathodal current during 10 min. Data were digitized, stored on a computer, and analysed offline with signal processing software (PimSoft v1.5.4.8078, Perimed, Järfälla, Sweden). Baselines were expressed as arbitrary perfusion units (APUs) and vasodilatory responses as percent increase of respective baseline (%BL). Iontophoretic dose is defined as current multiplied by time of application Dose (µA/second)=current (µA) x time (seconds[41].

Pharmacokinetics

Treprostinil pharmacokinetics was performed at 3 different times: on healthy skin (i.e. before wounding), when the ulcer size was maximal (D0 or D6), and on a re-epithelialized skin (last day of observation). Plasma samples were collected at time point: 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 and half hour and 3 hours after the beginning of iontophoresis. One millimeter of the tip of the tail was cut after disinfection with scissors. 75µl of blood were sampled using hematocrit tube, centrifuged at 5000rpm during 10min. Plasma was collected and frozen at -80°c.

Treprostinil was quantified by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), as previously described[34]. Briefly, 10 µL of sample were treated with 60 µL of a precipitation reagent ($ZnSO_4$ 60 mM/methanol 30/70 *v/v*) containing the isotope labeled internal standard (6 keto PGF1α-d_4). After vortex-mixing and centrifugation at 21 000 g for 10 min, the supernatant was collected and put in an autosampler vial ready for injection.

A two dimensional liquid chromatography was performed. First, an online sample clean-up step was performed on a Perfusion column POROS R1/10 micron 4.6 × 50 mm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with an aqueous mobile phase containing 30% methanol and 0.07% formic acid delivered at 3 mL/min for 1.5 min. After valve switching the compounds of interest trapped on the perfusion column were eluted through the analytical column Vydac Denali C_{18} 2 × 150 mm (Grace, Hesperia, CA, USA) housed in the column oven maintained at 60°C. An elution gradient was performed with a mixture of 0.3% acetic acid in water (eluent A) and acetonitrile (eluent B) with a starting composition of 30% B, increasing to 75% B in 3 min, and with a subsequent clean-up step at 100% for 5 min and a re-equilibration step of 30%B for 1.5 min. Six min after the beginning of the run, the valve was switched back to its initial position in order to re-equilibrate the perfusion column for the next injection. The complete two dimensional chromatographic run lasted 11 min per sample.

Measurements were performed on an API 4000 tandem mass spectrometer (ABSciex, Toronto, Canada) equipped with a turbo V® ion source. Quantification was achieved in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring two ion transitions for treprostinil (m/z 389.2/331.2 for quantization, m/z 389.2/143.1 for confirmation) and one ion transition for 6 keto PGF1α-d_4 (m/z 373.3/167.1) (Figure S3). The ion source was operated in negative mode with an ESI potential of -4500 V and the following parameters: turbo heater and nebulizer gas respectively set at 40 and 55 psi, ion source temperature at 600°C and curtain gas setting at 10 psi.

Calibration curves were calculated by least-square regression with a 1/x weighting with linear regression. The lower limit of quantification was fixed at the level of the concentration corresponding to the first point of the calibration curve (7.2 pg/mL). The intra-day and inter-day coefficients of variation were <12 %. Results were expressed as logarithm of the plasmatic treprostinil concentration, in pg/ml, and AUC were calculated.

Histology

Skin tissue samples from wounded areas were harvested and fixed in 4% formalin during 24hours. After imbedding in a paraffin block, five-micrometer thickness sections were cut and an hematoxylin, eosin and safran staining (Leica Autostainer XL, LeicaBiosystems®) was carried out to evaluate morphological characteristics of the epidermis, dermis and hypodermis regions.

A full blinded study was performed by a dermatopathology consultant using an optical microscope (OLYMPUS BX51). Microvessel density was determined quantitatively by counting the number of microvessels per high power field (400 x magnification, diameter of field of view= 0,62mm) with differentiating new blood vessels which are tufted and have turgescent endothelial lining from pre-existing vessels. Two different regions were observed: the edge of the wound (EW) and the center of the wound area (WA) (Figure 3).

Collagen deposition and its distribution were evaluated using a microscope with polarised light, and classified into four groups as follows: A, well organized collagen bundles; B, disorganized and organized bundles; C, disorganized fine fibres; and D, no refringence.

The density of the inflammatory infiltrate was graded semi-quantitatively, and classified into the four following groups: A, no inflammation; B, discreet inflammation; C, moderate inflammation; D, intense inflammation.

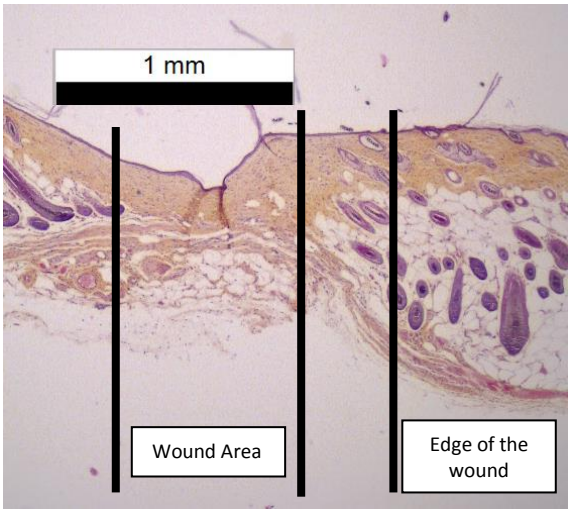


Figure 4: Histological regions of EW model

Multiplex-immunoassay procedure

Skin concentration of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-3, MMP-8 and pro-MMP-9; interleukines (IL)-1a, IL-1b, IL-4, IL-10; tumor necrosis factor alpha (TNFα); transforming growth factors beta (TGFβ)-1, TGFβ-2, and TGFβ-3; and vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, were realized on skin biopsies collected at D0, D3, D5, D9 and re-epithelialized skin (last day of observation).

All samples were mixed and grinded (Precelys®). Then, skin samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatants were collected and analyzed by multiplex immunoassay using Magpix® (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA) with three multiplex kits (all from Merck Millipore®, Darmstadt, Germany): MMMP3MAG-79K (for MMP2-3-8 and proMMP9), TGFBMAG-64K-03 (for TGFβ1-2-3) and MCYTOMAG-70K (for IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, and VEGF). Concentrations of all markers were determined by extrapolation from standard ranges, which were measured simultaneously. Each sample was duplicated and expressed as pg/mL. The multiplex assays were performed following the manufacter's instructions.

These analyses are still ongoing, and the results are not yet available.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SD, or as median [1st-3rd quartiles] when not normally distributed. Wound healing was analysed using general linear models. The effect of treprostinil iontophoresis was assessed by including the treatment effect as a fixed factor, and the mouse as a random factor. The Bonferroni method was used to account for multiple comparisons. In order to take into consideration wound area at baseline, the latter was introduced as a covariate in all models. Pharmacokinetic data, vascular reactivity, histological and biochemical analyses were evaluated using non-parametric tests. A p-value of 0.05 or less was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS 21.0 for Windows (IBM, SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Treprostinil iontophoresis enhances healing in BKS model

In both ulcer models, treprostinil iontophoresis improved wound healing delay compared with others groups (EW: p=0.001; PU: p=0.001) (Figure 4.A and 4.C). In the EW model, paired analyses showed that treprostinil was significantly different from the sham group (AUC were 1139.3±121 vs 864.7±195 %D0, respectively; p=0.001) but not from NaCl (AUC 953.2±124 %D0; p=0.332) (Figure 4.B). The difference between NaCl and sham was not significant either (p=0.59). There was no significant influence of the animal on wound healing.

In the PU model, treprostinil was significantly different from NaCl and sham groups (AUC was 839.1±106 %D6 for treprostinil vs 796.2±157 %D6 for NaCl, p=0.018; and: 802.6±129 in the sham group, p=0.002 vs treprostinil). Contrary to the EW model, here we observed a significant effect of the animal (p=0.001) and of the size of the wound at the beginning of the treatment (p=0.005). Moreover, there was a significant different between animals for the ulcer-size at D6 (p=0.0006) (Figure 4.D).

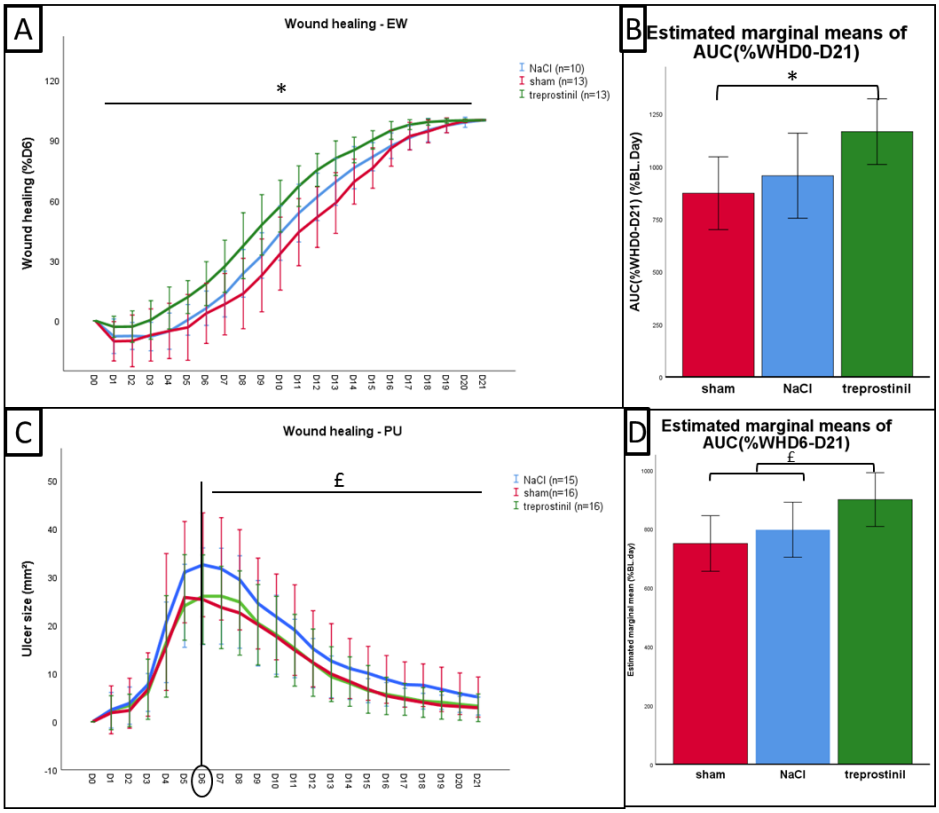


*Figure 5: A) Wound healing percentage of EW model in function of treatment groups C) Wound size of PU in function of treatment groups. Estimated marginal mean of B) AUC of %WHD0-D21 for the EW model and D) AUC of %WHD6-D21 for the PU model.*p=0.001 for sham vs treprostinil and £p=0.001 for treprostinil vs sham and NaCl.*

Pharmacokinetic of treprostinil iontophoresis

In the excisional wound model, treprostinil plasma concentration was significantly higher after iontophoresis on wounded skin than on healthy skin (9.6 ± 1.0 vs 11.6 ± 1.0 log([treprostinil]p), respectively; p=0.006). Plasma concentration tended to reach baseline levels after treatment on re-epithelialized skin (10.7 ± 0.8 log([treprostinil]p) ; p=0.078 vs healthy skin, and p=0.150 vs wounded skin) (Figure 5A).

In the pressure wound model however, we observed no significant difference in treprostinil plasma concentration between the three conditions (9.87 ± 0.6 units for healthy; 10.2 ± 1.3 for wounded skin; 9.8 ± 1.4 for re-epithelialized skin, log([treprostinil]p) ; p=0.840) (Figure 5B).

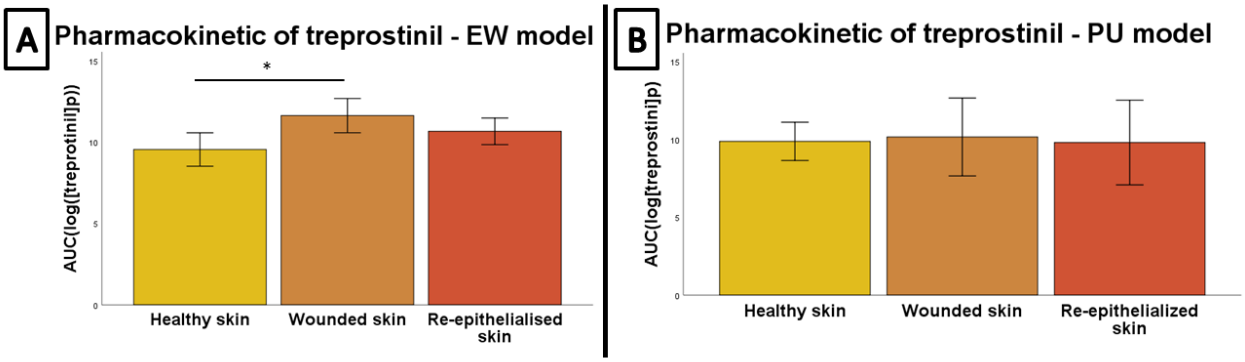


*Figure 6: Pharmacokinetic of treprostinil at Healthy skin, Wounded skin and Re-epithelialized skin on A) the EW model, B) the PU model. *p=0.006 for Healthy skin vs Wounded skin.*

Assessing local vs systemic effect of treprostinil

Since treprostinil was able to reach the systemic circulation, although in small amounts, we aimed at assessing the systemic vs local effect of treprostinil, by comparing untreated ulcers (NaCl and sham sites) from mice not exposed to treprostinil (combination 2 on Figure 1, "no systemic treprostinil") with untreated ulcers from mice exposed to treprostinil (combinations 1 and 3 on Figure 1, "systemic treprostinil").

For both ulcer models, there were no significant difference between wound healing of "T+(S/N)" and "No T" (EW: T+(N/S): 897.4 ± 176, No T: 900.0 ± 179, p=0.968 ; PU: T+(S/N): 735.3 ± 127, No T: 859.7 ± 129, p=0.846) (Figure 6).

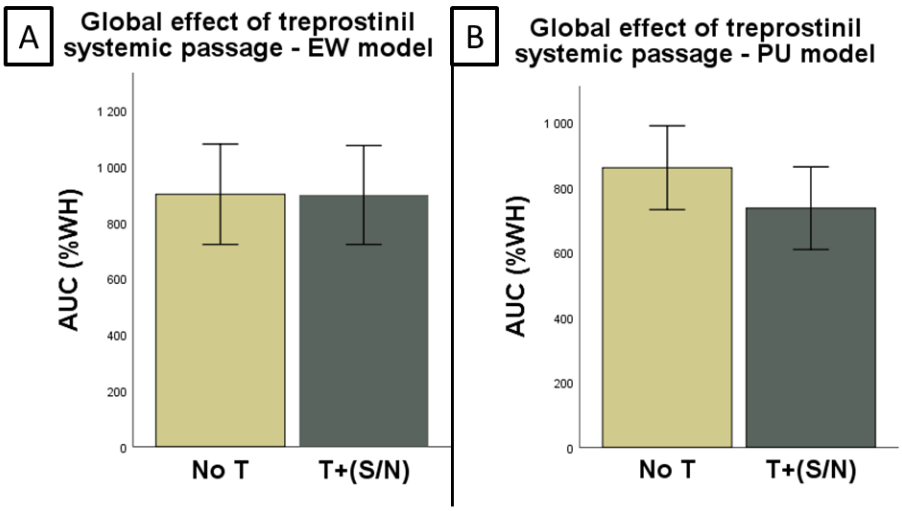


Figure 7: Comparison of untreated ulcers from T+(S/N) group with No T group in: A) EW model, B) PU model.

Histological analyses

The comparison of the number of vessels and neovessels showed no difference between groups at any time point (Table 1 in annex 1). We observed the same results for semi-quantification of inflammation and collagen structure.

Effect on microvascular reactivity

Microvascular reactivity tests (iontophoresis of Ach and SNP) on the EW model showed no difference in the functionality of microvessels (Figure 5A and 5.B). We observed only a significant difference for acetylcholine vascular reactivity test in the PU model, but with negatives data (NaCl: -14.0 ± 19, SHAM: 19.1 ± 7, treprostinil: 17.0 ± 22, p=0.03) and more specifically between NaCl and sham groups (p=0.011) (Figure 5.C ad 5.D)

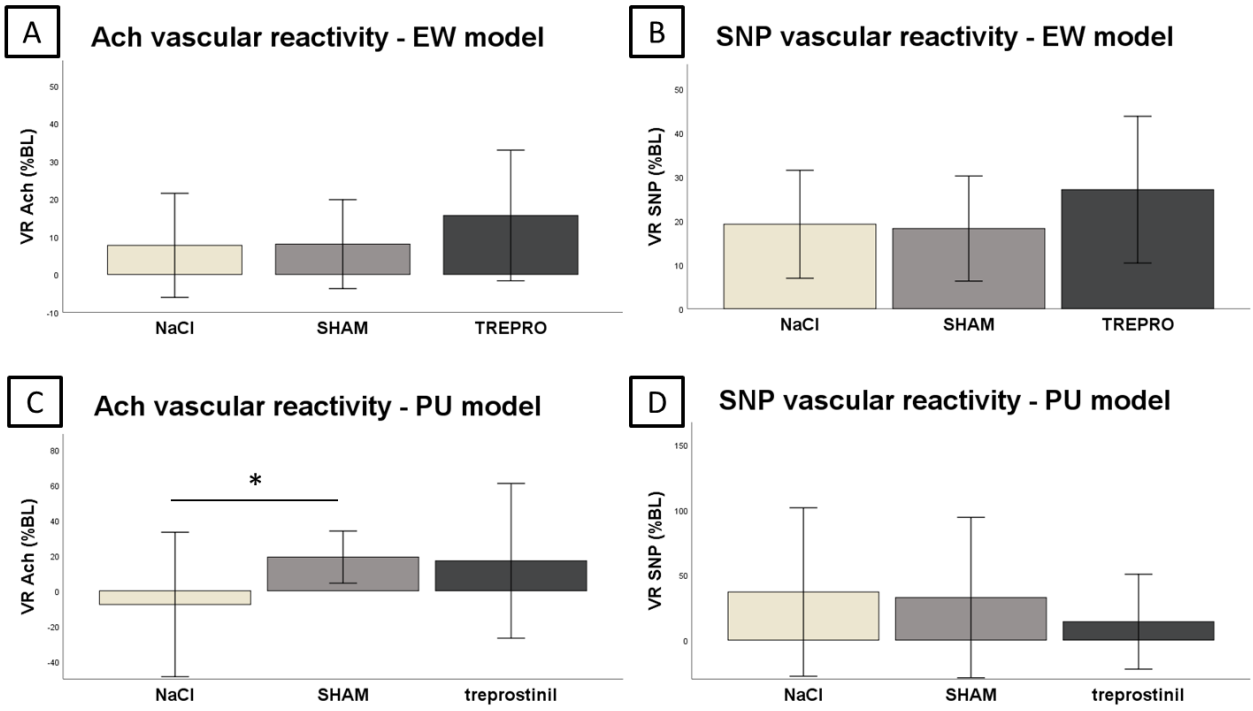


Figure 8: Ach and SNP vascular reactivity test at D21on: A)B) EW model, C)D) PU model.
**p=0.011 for NaCl vs SHAM.*

DISCUSSION

The main objective of this study was to explore the iontophoresis of treprostinil on two different wound models in diabetic mice. Our results show that the treatment consistently improves wound healing, which is line with the result obtained in another model of skin ulcer associated with microvascular dysfunction, i.e. the uPAR$^{-/-}$ murine model of systemic sclerosis. These results of microvascular vasodilatation has been already demonstrated, as well as on human[32,34,35] or murine models[33,42],

In this study, we didn't confirm the angiogenesis effect of current and PGI_2. We hypothesized that treprostinil iontophoresis improve wound healing delay in part by increasing neoangiogenesis and angiogenesis. Unfortunately, histological data didn't show a significant effect of our treatment on number of vessels, neovessels, inflammation and collagen structures, and whatever groups or intermediary days. Histological analysis of 5µm biopsies thickness represents only a little part of the interest area. So it's difficult to generalized only one observation for all the wound healed skin area. To remedy this, the 3D

reconstruction from multiple histological biopsies could give interesting and more precise information. Biological analysis could also brought explanations of mechanisms involved. Unfortunately, we actually are waiting for results that we can't present in this document. To evaluated treprostinil iontophoresis effect, we will quantified some angiogenic factors (such as VEGF), inflammation factors (such as IL1α and β, IL6, IL10, TGFβ1,2,3 and TNFα), and remodeling factor (such as MMP 2, 3, 8 and 9).

The first limit of this study was the current protocol. We used a cathodal direct current. Recent meta-analysis[29] showed that the high voltage pulsed current (HVPC) seems to have the best effect on wound healing. Indeed, by example, some hypothesis proposed that HVPC could improve electroporation whereas direct current seems to permit more electromigration. However, there are only few data about the use of the type of current on the iontophoresis of treprostinil. Kotzki et al showed that pulsed iontophoresis could optimize treprostinil iontophoresis[42]. Indeed, they compared direct versus pulsed current with different intensity. They observed an increase of the iontophoretic efficacy with a pulsed current at 600µA..

Another limitation of this work concerns the systemic iontophoretic passage of our molecule. This method of administration has advantages in the wound healing topic but it's complicated to evaluate precisely the quantity of administrated molecule. The pharmacokinetic evaluation showed different profile depending of the ulcer. Indeed, we observed no difference in plasma concentration between different skin conditions for the PU ulcer, while in the EW we observed a significant difference between iontophoresis on healthy skin and wounded skin. This could be explained by the direct passage of the molecule at D0 on an EW, in which all layers of the skin are removed; on the other hand, even in the presence of a pressure ulcer, the skin might maintain some barrier function, preventing the drug from diffusing too much. The absence of significant difference in wound healing between non-treated ulcers from mice treated or not with treprostinil on the contralateral ulcer suggests that the systemic concentration of treprostinil is too limited to have an impact on wound healing.

Another limitation is that we did not measure blood pressure continuously during iontophoresis. Indeed, systemic treprostinil might have decreased blood pressure, which could be used as a surrogate of systemic diffusion of the drug. Another potential impact of modifications of blood pressure is interfering with microvascular assessments. Indeed, we observed large variability in microvascular reactivity tests. We observed trends toward

improvement of reactivity in treprostinil group compared with two others but nothing significant. This could be due to weaknesses of this test. Using a Laser Doppler Imaging, results depend on environmental parameters such as temperature and movement. Moreover, mice were anesthetized, leading to two others bias. On one hand, during anesthesia, mice breathe slowly but this movement altered the reflected ray of Doppler. On a second hand, microcirculation in decreased with anesthesia, altering drug delivery with iontophoresis and its local effect. We saw that NaCl results are negatives for Ach test. Usually, Ach and current induce vasodilation. In this case, a vasoconstriction could be observed due to this environmental bias.

To conclude, this study shows that iontophoresis of treprostinil improves wound healing in diabetic mice, both on ischemic and excisional ulcers. However, further data are needed to understand the mechanisms involved in this effect and to assess the best current protocol for this administration to cumulate current and pharmacological effects. Indeed, direct current used in this study showed a positive effect, but the HVPC would have greater iontophoretic efficacy.

REFERENCES

1. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet* **366**, 1736–1743 (2005).
2. Moxey, P. W. *et al.* Epidemiological study of lower limb amputation in England between 2003 and 2008. *Br. J. Surg.* **97**, 1348–1353 (2010).
3. Boulton, A. J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G. & Apelqvist, J. The global burden of diabetic foot disease. *The Lancet* **366**, 1719–1724 (2005).
4. *Global report on diabetes*. (World Health Organization, 2016).
5. Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782–787 (2001).
6. Assar, M. E., Angulo, J. & Rodríguez-Mañas, L. Diabetes and ageing-induced vascular inflammation. *J. Physiol.* **594**, 2125–2146 (2016).

7. Rask-Madsen, C. & King, G. L. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* **17**, 20–33 (2013).
8. Shi Y. & Vanhoutte P. M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J. Diabetes* **9**, 434–449 (2017).
9. Geerlings, S. E. & Hoepelman, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 7
10. Berlanga-Acosta, J. *et al.* Glucose Toxic Effects on Granulation Tissue Productive Cells: The Diabetics' Impaired Healing. *BioMed Res. Int.* **2013**, (2013).
11. Baltzis, D., Eleftheriadou, I. & Veves, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv. Ther.* **31**, 817–836 (2014).
12. Dreifke, M. B., Jayasuriya, A. A. & Jayasuriya, A. C. Current wound healing procedures and potential care. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **48**, 651–662 (2015).
13. Hellsten, Y., Nyberg, M., Jensen, L. G. & Mortensen, S. P. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *J. Physiol.* **590**, 6297–6305 (2012).
14. Gutiérrez, E. *et al.* Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *Eur. Heart J.* **34**, 3175–3181 (2013).
15. Roustit, M., Loader, J., Baltzis, D., Zhao, W. & Veves, A. Microvascular Changes in the Diabetic Foot. in *The Diabetic Foot* 173–188 (Springer, 2018).
16. Rask-Madsen, C. & King, G. L. Vascular Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Protective Factors. *Cell Metab.* **17**, 20–33 (2013).
17. Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res.* **107**, 1058–1070 (2010).
18. Shi, Y. & Vanhoutte, P. M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J. Diabetes* n/a-n/a (2017). doi:10.1111/1753-0407.12521
19. He, T. *et al.* Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells. *Circ. Res.* **103**, 80–88 (2008).

20. Peshavariya, H. M. *et al.* Prostacyclin Signaling Boosts NADPH Oxidase 4 in the Endothelium Promoting Cytoprotection and Angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2710–2725 (2014).
21. Baretella, O. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-Dependent Contractions. in *Advances in Pharmacology* **77**, 177–208 (Elsevier, 2016).
22. Aanderud, S., Krane, H. & Nordøy, A. Influence of glucose, insulin and sera from diabetic patients on the prostacyclin synthesis in vitro in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* **28**, 641–644 (1985).
23. Du, X. *et al.* Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J. Clin. Invest.* **116**, 1071–1080 (2006).
24. Baretella, O. & Vanhoutte, P. M. Chapter Six - Endothelium-Dependent Contractions: Prostacyclin and Endothelin-1, Partners in Crime? in *Advances in Pharmacology* (ed. Khalil, R. A.) **77**, 177–208 (Academic Press, 2016).
25. Knebel, S. M., Sprague, R. S. & Stephenson, A. H. Prostacyclin receptor expression on platelets of humans with type 2 diabetes is inversely correlated with hemoglobin A1c levels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **116–117**, 131–135 (2015).
26. O'Meara, S., Cullum, N., Majid, M. & Sheldon, T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* **4**, 1–237 (2000).
27. Emanuel, A. L. *et al.* Iloprost infusion prevents the insulin-induced reduction in skeletal muscle microvascular blood volume but does not enhance peripheral glucose uptake in type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes. Metab.* **20**, 2523–2531 (2018).
28. Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J. & Guy, R. H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 619–658 (2004).
29. Khouri, C. *et al.* Hierarchical evaluation of electrical stimulation protocols for chronic wound healing: An effect size meta-analysis: Electrical stimulation for wound healing. *Wound Repair Regen.* **25**, 883–891 (2017).

30. Zhao, M. *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-γ and PTEN. *Nature* **442**, 457–460 (2006).
31. Gohin, S. *et al.* What Can Current Stimulation Tell Us about the Vascular Function of Endogenous Prostacyclin in Healthy Rat Skin In Vivo? *J. Invest. Dermatol.* **131**, 237–244 (2011).
32. Blaise, S., Roustit, M., Hellmann, M., Millet, C. & Cracowski, J.-L. Cathodal Iontophoresis of Treprostinil Induces a Sustained Increase in Cutaneous Blood Flux in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **53**, 58–66 (2013).
33. Blaise, S. *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 557–565 (2011).
34. Roustit, M. *et al.* Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 439–445 (2014).
35. Hellmann, M., Roustit, M., Gaillard-Bigot, F. & Cracowski, J.-L. Cutaneous iontophoresis of treprostinil, a prostacyclin analog, increases microvascular blood flux in diabetic malleolus area. *Eur. J. Pharmacol.* **758**, 123–128 (2015).
36. Stadler, I., Zhang, R.-Y., Oskoui, P., Whittaker, M. B. S. & Lanzafame, R. J. Development of a Simple, Noninvasive, Clinically Relevant Model of Pressure Ulcers in the Mouse. *J. Invest. Surg.* **17**, 221–227 (2004).
37. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
38. Kotzki, S. *et al.* Anodal Iontophoresis of a Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Induces a Sustained Increase in Skin Blood Flow in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **346**, 424–431 (2013).
39. Blaise, S. *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br J Pharmacol* **162**, 557–565 (2011).
40. Roustit, M. *et al.* Iontophoresis of Endothelin Receptor Antagonists in Rats and Men. *PLoS ONE* **7**, e40792 (2012).

41. Turner, J., Belch, J. J. F. & Khan, F. Current Concepts in Assessment of Microvascular Endothelial Function Using Laser Doppler Imaging and Iontophoresis. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 109–116 (2008).

42. Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Godin-Ribuot, D. & Cracowski, J.-L. Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *Eur. J. Pharm. Sci.* **72**, 21–26 (2015).

Annex 1

Table 1: Histological data of edge of the wound and wound area in function of treatment group. Data are expressed as median [1st-3rdquartiles].

			NaCl		sham		treprostinil		p-value
			Median (IQ)	n	Median (IQ)	n	Median (IQ)	n	
D0	Edge of the wound	Vessels	9,0 [4,75/10,5]	n=6	6,0 [2,0/6,75]	n=10	6,0 [6,0/9,5]	n=5	0.147
		Neovessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Inflammation	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
		Collagen	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
D3	Edge of the wound	Vessels	2,0 [1,5/5,0]	n=5	1,0 [1,0/1,0]	n=3	2,0 [1,0/-]	n=3	0.129
		Neovessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Inflammation	2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		1.000
		Collagen	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
	Wound area	Vessels	0,0 [0,0/2,0]		0 [0/0]		0 [0/0]		0.267
		Neovessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Inflammation	3,0 [3,0/3,0]		3,0 [2,0/-]		3,0 [3,0/3,0]		0.264
		Collagen	3,0/ [3,0/3,0]		3,0 [3,0/3,0]		3,0 [3,0/3,0]		1.000
D5	Edge of the wound	Vessels	3,5 [2,0/-]	n=2	3,0 [2,0/-]	n=3	5,0 [5,0/-]	n=3	0.121
		Neovessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Inflammation	2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		2,0 [1,0/-]		0.435
		Collagen	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
	Wound area	Vessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Neovessels	3,5 [0,0/-]		0 [0/0]		7,0 [0,0/-]		0.457
		Inflammation	4,0 [4,0/4,0]		3,0 [3,0/-]		4,0 [3,0/-]		0.364
		Collagen	3,0 [3,0/3,0]		2,0 [2,0/2,0]		3,0 [3,0/3,0]		1.000
D9	Edge of the wound	Vessels	2,0 [1,25/2,0]	n=4	20 [2,0/2,0]	n=3	2,0 [2,0/-]	n=3	0.269
		Neovessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Inflammation	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		0.311
		Collagen	1,0 (1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
	Wound area	Vessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		1.000
		Neovessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0 [0/0]		0.311
		Inflammation	4,0 [4,0/4,0]		4,0 [4,0/4,0]		3,0 [3,0/-]		0.193
		Collagen	3,0 [3,0/3,0]		3,0 [3,0/3,0)		3,0 [3,0/3,0]		1.000
FD	Edge of the wound	Vessels	4,0 [1,5/5,75]	n=4	6,0 [4,0/-]	n=3	4,0 [3,5/6,5]	n=5	0.376
		Neovessels	0 [0/0]		0 (0/0]		0 [0/0]		1.000
		Inflammation	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
		Collagen	1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1,0 [1,0/1,0]		1.000
	Wound area	Vessels	0 [0/0]		0 [0/0]		0,0 [0,0/1,0]		0.832
		Neovessels	13,0 [9,5/21,0]		18,0 [12,0/-]		17,0 [13,5/23,5]		0.429
		Inflammation	2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		0.223
		Collagen	2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		2,0 [2,0/2,0]		1.000

Conclusion

L'hypothèse principale de ce travail de thèse était qu'une administration locale d'un analogue de la prostacycline, le tréprostinil, améliore le délai de cicatrisation d'ulcères cutanés liés à une dysfonction microvasculaire. Pour y répondre nous avons utilisés deux modèles murins mimant des pathologies très différentes à savoir la sclérodermie systémique (modèle uPAR$^{-/-}$) et le diabète (BKS).

Dans ces 2 modèles, nous avons observé une accélération de la ré-épithélialisation avec l'iontophorèse de tréprostinil, alors que le courant seul n'a pas eu d'effet significatif. La potentialisation entre l'effet pharmacologique de la molécule et l'effet du courant était pourtant attendue, le courant ayant lui-même un effet sur différents mécanismes mise en jeu dans le processus de cicatrisation[1–4]. Il est possible que les propriétés du courant utilisé dans nos travaux ne soient pas optimales en termes cicatrisation. En effet, chez l'Homme, une méta-analyse récente menée par notre équipe a montré que l'utilisation d'un courant continu pulsé à haut voltage semble être le plus efficace[5]. Toutefois, nous avons montré que chez l'animal, le courant continu était plus adapté que le courant pulsé pour l'iontophorèse de tréprostinil[6], raison pour laquelle nous l'avons retenu. Néanmoins, compte-tenu des différences inter-espèces, il est possible que chez l'Homme le courant pulsé à haut voltage soit également approprié pour l'iontophorèse de tréprostinil, ce qui est une piste intéressante à développer pour les travaux futurs.

Nous en déduisons donc que l'effet de l'intervention est bien liée à la molécule de *tréprostinil*, et non au courant. Toutefois, l'étude de pharmacocinétique réalisée dans le modèle BKS, nous a permis de démontrer que, malgré un passage systémique de la molécule plus important le jour de l'ulcération, la concentration systémique semble trop faible pour avoir un impact sur la cicatrisation des plaies non traitées par tréprostinil, y compris celles sur lesquelles un courant électrique sans médicament (NaCl) était appliqué. Cela valide donc l'idée d'une approche locale pour le traitement des ulcères. Bien que nous n'ayons pas pu quantifier le tréprostinil dans la peau des animaux, ces résultats sont cohérents avec une étude pharmacocinétique que nous avons précédemment réalisée chez l'Homme, montrant une concentration intradermique élevée et prolongée après iontophorèse de tréprostinil sur peau saine, alors que la concentration systémique était très faible, voire indétectable[7].

Il est intéressant de noter que l'intervention s'est avérée avoir un effet sur deux types d'ulcères différents, excisionnels (pour uPAR$^{-/-}$ et BKS) et ischémiques (BKS). Toutefois, nous n'avons pas à ce stade suffisamment d'éléments pour comprendre les mécanismes sous-jacents. Les données de fonctionnalités microvasculaire ne montrent aucun effet significatif de l'intervention, ce qui est possiblement lié à des faiblesses méthodologiques discutées ci-dessous. Par ailleurs, les résultats d'histologie sont discordants entre les deux modèles animaux. En effet, l'analyse histologique des

biopsies des animaux BKS à D21 n'a pas mis en évidence de différence entre les groupes. En revanche, sur le modèle uPAR$^{-/-}$, nous avons pu observer un effet pro-angiogénique de l'iontophorèse de tréprostinil, avec une augmentation de la quantité de vaisseaux dans la partie remodelée de la plaie. Cela peut être expliqué par la possible activation des voies angiogéniques IP dépendantes. En effet, la PGI_2 régule l'angiogénèse par stimulation de la voie VEGF dépendante. La quantification de VEGF (actuellement en cours) dans la peau des animaux avant et après traitement, devrait apporter plus d'information sur les mécanismes en jeu.

Un point important à précis est la tolérance de l'approche iontophorétique par les animaux. Malgré une application iontophorétique quotidienne (BKS) durant 21 jours, ou 5jours/7 durant deux semaines (uPAR), nous n'avons pas observé de brûlures sur la peau de nos animaux au niveau des zones exposées au courant. Cela suggère que la quantité de courant administrée reste dans des proportions suffisamment basses pour éviter l'apparition d'effets indésirables lié au courant.

Limites

Tout d'abord, il existe de nombreuses limites inhérentes aux études pré-cliniques sur modèles animaux, aucun n'étant un modèle parfaitement représentatif de la physiopathologie humaine. Partant de cette réalité, il est important de connaitre et prendre en compte certains aspects de ces modèles pouvant impacter les résultats de nos études.

L'utilisation de modèles murins a de nombreux avantages. Ils permettent notamment l'utilisation de modèles génétiquement modifiés, qui permettent d'induire des phénotypes particuliers ou de tester certaines hypothèses mécanistiques, tout en gardant l'avantage d'un modèle *in vivo*. Dans le domaine de la cicatrisation cutanée, il est en effet essentiel de prendre en compte la microcirculation et l'innervation cutanées. Bien que l'utilisation de modèles *in vitro* permette aujourd'hui d'approcher la physiologie de la peau, notamment par des techniques de culture ou de bio-impression 3D, il n'est pas encore possible de recréer des peaux parfaitement vascularisées et innervées. Toutefois, ces outils présentent l'avantage de pouvoir utiliser des cellules provenant de patients, et donc de mimer des phénotypes pathologiques qui permettront de mieux explorer la physiopathologie des ulcères. Il faut donc envisager les modèles 3D comme des compléments, et non des alternatives, aux modèles animaux. Enfin d'autres modèles animaux (non murins) existent pour étudier la cicatrisation, comme par exemple l'oreille de lapin, ou la peau de porc, plus proches de la peau humaine[7,8]; toutefois ces modèles sont aujourd'hui beaucoup moins accessibles et plus coûteux. Enfin, la pathologie sous-jacente est plus difficile à mimer.

Les modèles murins que nous avons retenus nous ont permis d'induire des phénotypes pathologiques pour les deux pathologies d'intérêt. Ces modèles animaux pathologiques peuvent être

induits principalement de deux manières : chimiquement ou génétiquement. Dans le premier cas, une substance toxique va générer des modifications pathologiques ciblant un organe ; c'est le cas par exemple de l'injection intradermique d'HOCl pour entraîner une inflammation puis une fibrose cutanée mimant la sclérodermie, ou de streptozotocine (STZ) pour détruire le pancréas et induire un diabète. La seconde approche consiste à générer une modification génétique qui sera à l'origine du phénotype pathologique.

Ces deux approches possèdent des avantages et des inconvénients propres. Par exemple, les modèles génétiques ne requièrent pas de manipulation expérimentale afin d'induire la toxicité, mais la modification du génome peut avoir plus d'impact physiologique que souhaité. Les caractéristiques des modèles chimiquement induits sont opposées. En effet ils nécessitent la manipulation des animaux, et donc du stress, mais peuvent être réalisés sur différentes souches animales. Autrement dit, il est aussi possible de coupler les avantages de ces deux modèles par l'induction chimique d'une pathologie sur une souche animale génétiquement modifié.

Toutefois, comme nous l'avons souligné précédemment, les modèles animaux ne reflètent pas exactement la physiopathologie humaine. A l'exemple des études sur le diabète, il est couramment admis que le modèle BKS (génétiquement induit) est plus spécifique d'un diabète de type 2 (DT2) tandis que le modèle STZ (chimiquement induit) serait plus représentatif d'un diabète de type 1 (DT1). Aux vues des différences physiologiques entre rongeurs et humain, mais aussi de la difficulté de la mise au point de modèles animaux pathologiques, il me semble important de nuancer ce point. Il est évident que l'une ou l'autre de ces inductions n'aura pas le même impact sur l'organisme des rongeurs et que ces impacts seront plus représentatifs d'une altération proche d'un DT1 ou d'un DT2. Toutefois, dans le cas des altérations de la cicatrisation, il me semble difficile de déduire de nos études des impacts ciblant de manière aussi catégorique un aspect de la pathologie. Il apparait donc important de multiplier les modèles expérimentaux.

Dans les études de cicatrisation cutanée, la question du modèle de plaie est centrale. Comme pour le modèle animal, la pertinence du modèle d'ulcération doit être en lien avec les problématiques de la physiopathologie humaine.

Le modèle excisionnel est le plus couramment utilisé dans notre domaine. Cela peut être expliqué par la facilité technique de réalisation et le contrôle de la taille des ulcères. Toutefois, il semble très éloigné de la physiopathologie des plaies humaines, et tout particulièrement des plaies chroniques. En effet il existe chez les rongeurs un mécanisme de contraction permettant une fermeture précoce des plaies. Ce mécanisme est particulièrement impliqué lors des ulcères excisionnels. Il est donc important de considérer aussi d'autres modèles d'ulcération. Nous nous sommes intéressés aux ulcères ischémiques générés par une pression, plus proches de la

physiopathologie humaine. Afin de mettre au point un modèle d'ulcère suffisamment important pour réaliser une étude de traitement pharmacologique, il s'est avéré qu'il existe un grand nombre de protocoles d'induction d'ulcères ischémiques. En effet, la durée d'ischémie (2H, 3H, 6H, 8H ou encore 12H selon les études), la durée de reperfusion ainsi que le nombre de cycles d'ischémie-reperfusion, varient en fonction des études. Suivant les conseils du Pr Dominique Sigaudo-Roussel, nous avons choisi d'adapter un modèle développé par l'équipe du Dr.Stadler, caractérisé par 3 cycles de 2 heures d'ischémie, avec 15 minutes de reperfusion[9,10]. Dans ce modèle, la taille de l'ulcère obtenu sera dépendante de la force et du type de pression appliquée. Comme pour le modèle excisionnel, il est possible d'adapter les caractéristiques des ulcères en variant ces 2 paramètres. Toutefois cette variation reste relativement longue à maitriser.

La question de l'utilisation d'une attelle est un autre élément essentiel à considérer pour les modèles murins de plaies. En effet, les rongeurs possèdent un processus de fermeture mécanique de leurs plaies. Afin d'évaluer des mécanismes de cicatrisation de façon transposable à ce qui est observé chez l'Homme, il est donc primordial d'utiliser un dispositif d'attelle anti-contraction. Le modèle le plus utilisé dans la littérature est constitué d'un anneau de caoutchouc maintenu autour de la plaie par des points de suture. Toutefois ceci génère des biais expérimentaux (inflammation au niveau des points de suture, stress supplémentaire pour l'animal). Différents modèles d'attelles peuvent être utilisés afin de limiter ces biais. Dans la première étude de ce travail (souche uPAR$^{-/-}$), nous avons développé un modèle d'attelle avec points de suture afin de consolider le dispositif. Dans l'étude n°2 de ce document (souche BKS) nous avons maintenu un anneau anti-contraction au moyen d'un adhésif sans ajout de points. Il est important de noter que ce type d'adaptation peut être réalisé en fonction de la souche animale choisie. Dans notre étude, la souche BKS étant relativement calme, ce modèle d'attelle « légère » a donc pu être mise en place. De plus, une contraction diminuée semble être présente chez cette souche animale, permettant de diminuer la force nécessaire à l'attelle. Lors de tests préliminaires, nous avons observés une faiblesse cutanée chez ces animaux engendrant des fusions de lésions entre les points de sutures et l'ulcère excisionnel, obligeant la sortie de l'animal de l'étude. Pour finir, la mise en place de cette attelle légère est bien plus rapide, permettant de diminuer la durée d'anesthésie lors de la création de l'ulcère à J0. Ce nouveau dispositif d'attelle permet de meilleures conditions expérimentales autant d'un point de vue éthique animale qu'en termes de diminution de possibles biais.

La dernière limite relative au modèle animal concerne la réalisation d'anesthésies répétées. Afin de réaliser nos sessions d'iontophorèse de tréprostinil, nos animaux ont été anesthésiés quotidiennement. Durant une anesthésie, la perfusion cutanée est fortement diminuée, pouvant engendrer une diminution du passage de la molécule. Des tests préliminaires encourageants nous

ont permis de valider l'utilisation de l'iontophorèse sur des souris vigiles maintenues dans un dispositif de contention rigide. En effet, utilisant le même protocole que lors des études de cicatrisation (un courant cathodal de 100 µA durant 20 min), les animaux n'ont pas montré de signe de douleur. Toutefois, d'autres études seront nécessaires à la mise au point d'un dispositif adapté au traitement des ulcères cutanés par iontophorèse.

Deuxièmement, il faut aborder les limites de notre approche thérapeutique. Tout d'abord le choix de la molécule. Comme décrit en introduction de ce travail, le choix du tréprostinil a été réalisé suite à des études de screening. Ces résultats préliminaires ont permis de sélectionner une molécule possédant un effet vasodilatateur important autant sur un modèle murin que dans des études cliniques chez des sujets sains[11,12]. De plus, des études réalisées chez des patients atteints de sclérodermie systémique ou de diabète ont permis de confirmer l'effet pharmacodynamique de cette molécule sur le flux sanguin cutané[13–15]. L'inconvénient principal de l'utilisation du tréprostinil est son coût. La finalité de toutes ces études restant une application clinique de l'utilisation en thérapeutique de l'iontophorèse de tréprostinil sur la cicatrisation des ulcères cutanés en contexte pathologiques, le prix final de la molécule utilisée devient un point important à prendre en considération.

D'autre part, l'utilisation de l'iontophorèse dans le traitement des ulcères cutanés. Comme décrit précédemment, il existe de nombreux protocoles de courant électrique applicables à ce domaine. En effet, plusieurs caractéristiques sont à prendre en compte. Tout d'abord le type de courant utilisé (pulsé, continu, alternatif) pouvant faciliter le passage des molécules dans ou à travers la peau (électromigration, électroporation). La polarité du courant, l'alternance des protocoles sur plusieurs jours ainsi que l'intensité du courant étant aussi des facteurs à prendre en compte, tout comme le temps d'application[16].

Enfin, certaines limites concernent les critères de jugement (et méthodes d'évaluation) utilisées dans ce travail. Lorsque l'on s'intéresse à la cicatrisation, il est courant d'utiliser le pourcentage de ré-épithélialisation de la plaie comme critère de jugement. Or la cicatrisation des plaies ne se fait pas exclusivement par les berges. Une ré-épithélialisation progressive du fond de la plaie de l'ulcère existe. Pouvoir suivre et étudier ce « remplissage » permettrait de mieux comprendre certains mécanismes cicatriciels. En effet, des outils spécifiques de quantification 3D du volume des plaies ont récemment été développés. Il serait intéressant de voir si la quantification du volume, et non de la surface de la plaie, permet une estimation plus précise et plus fiable de la cicatrisation.

Sur le plan statistique, il faut aussi prendre en compte certains paramètres importants. Tout d'abord, le pourcentage de ré-épithélialisation est lié à la taille de l'ulcère. Il est donc essentiel d'utiliser la surface initiale de la plaie cette valeur comme co-variable. Par ailleurs, lorsque l'on réalise plusieurs ulcères chez un même animal, l'unité statistique est l'ulcère (et non l'animal). Bien qu'il ne soit pas usuel de prendre en compte ce facteur dans les études animales, nos résultats montrent que cela a une importance. En effet, bien que génétiquement contrôlés, les animaux restent uniques et une variabilité significative est parfois observée ; dans nos travaux, ce fut le cas pour le modèle d'ulcère ischémique chez les souris BKS. Afin de prendre en compte les différences inter-animaux, nous avons utilisé des modèles à effets mixtes, utilisant comme facteur aléatoire l'animal. Ne pas prendre en compte ce facteur dans l'analyse statistique peut biaiser nos résultats, comme le montre la différence observée entre les groupes chez les souris BKS ayant un ulcère ischémiques.

Toutefois, toute la variabilité ne peut pas être expliquée par les modèles statistiques. Par exemple, celle-ci était considérable concernant l'évaluation du flux microvasculaire. Probablement à cause d'une grande variabilité de la technique elle-même, les données recueillies montrent au mieux une tendance, mais ces résultats sont fragiles et ne nous permettent pas de conclure sur l'impact de l'intervention sur la réactivité microvasculaire. En effet, celle-ci est extrêmement sensible à des facteurs environnementaux tels que la température mais aussi l'anesthésie. En effet, la modification de la température corporelle et de la pression artérielle au cours de l'anesthésie ont une influence majeure sur la microcirculation cutanée. Il apparaît donc essentiel d'évaluer la fonction microvasculaire cutanée chez des souris vigiles.

Il faut aussi porter un regard critique sur les analyses histologiques. Ces explorations se basent en effet sur une coupe de 5 µm d'épaisseur à un endroit de la zone d'intérêt, ce qui n'est pas nécessairement représentatif de la globalité de la plaie. Afin d'optimiser ces résultats, la création de représentation spatiale 3D issue de l'analyses de plusieurs coupes parallèles au sein du même échantillon permettrait peut-être d'augmenter la pertinence de ces résultats. Toutefois cette approche est très chronophage, pour un résultat incertain.

Perspectives

L'objectif de ce travail était d'établir la preuve de concept d'un effet du traitement iontophorétique par tréprostinil sur la cicatrisation, avec comme perspectives la réalisation d'essais cliniques. Toutefois, il n'avait pas pour objectif premier de comprendre les mécanismes sous-jacents.

Que ce soit sur modèle murin diabétique ou sclérodermique, notre approche thérapeutique permet d'améliorer le délai de cicatrisation, mais l'implication de la PGI_2 dans la physiopathologie de

ces plaies demeure relativement peu explorée. Comme présenté en introduction, le tréprostinil n'est pas, à l'instar du selexipag, sélectif uniquement du récepteur IP. Par l'intermédiaire des récepteur IP, EP4, EP2 et DP1, le tréprostinil aura une action de vasorelaxation tandis que la stimulation des récepteurs EP1 et EP3 engendreront une action opposée[17]. Par conséquent nous ne pouvons affirmer aujourd'hui avec certitude, que seul le récepteur IP, et plus spécifiquement les mécanismes PPAR dépendant, sont impliqués dans cette amélioration.

Pour mieux évaluer l'implication de la voie de la PGI_2 dans les plaies diabétiques, nous allons dans un futur projet explorer l'impact d'un blocage pharmacologique des différentes étapes de cette voie, lors d'une stimulation. Nous allons également vérifier ces hypothèses chez des animaux génétiquement modifiés, et notamment compléter les expériences sur les animaux IP KO, afin de mieux comprendre l'implication de la voir IP-dépendante. Des modèles PTGS1 et PTGS2 KO seront aussi utilisés.

Par ailleurs, dans la continuité de ces travaux, des essais cliniques visant à évaluer l'iontophorèse de tréprostinil chez des patients ont démarré ou vont démarrer très prochainement. Une étude de phase I actuellement conduite chez des patients sclérodermiques (clinicaltrials.gov NCT03120533) évalue la sécurité d'utilisation du dispositif chez des patients ayant des ulcères digitaux. Une étude similaire, de phase I d'escalade de dose, devrait commencer dans les prochains mois pour évaluer le dispositif chez des patients diabétiques ayant un ulcère au niveau du pied (clinicaltrials.gov NCT03654989). Ces deux études de phase I seront suivies d'études de preuve de concept visant à avoir des données préliminaires quant à une possible efficacité clinique sur la cicatrisation.

Il est important de garder à l'esprit que la voie de la PGI_2 n'est pas l'unique voie impliquée dans la vasodilatation endothélium-dépendante microvasculaire, qui pourrait être une cible thérapeutique pour l'amélioration de la cicatrisation cutanée. La voie du NO a déjà été bien explorée, mais les résultats n'ont pas été pour l'instant satisfaisants. Par exemple, Chung et al ont proposés une administration topique de nitrate dans le phénomène de Raynaud mais ils n'ont pas observé d'effet sur la cicatrisation d'ulcères digitaux[18]. L'étude SEDUCE, conduite par Hachulla et al, sur l'utilisation du Sildénafil sur le traitement des ulcères sclérodermiques, n'a pas montré plus d'efficacité[19].

Dans le cadre du diabète de type 2, des données de plus en plus nombreuses laissent penser que l'altération de la voie des EETs est impliquée dans la dysfonction endothéliale. En effet, les EETs, issus de la synthèse de l'acide arachidonique par le cytochrome P 450 (CYP), sont reconnus pour leur puissant effet vasodilatateur, anti-inflammatoire et angiogénique[20,21]. *In vivo*, les EETs sont

rapidement dégradés par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) sous une forme moins active, l'acide dihydroxy-eicosatétraénoïque (DHET). Des études ont montré que l'effet combiné d'une administration de EETs et d'inhibiteur de sEH accélérait la ré-épithélialisation et la néovascularisation sur modèle murins[22,23]. Toutefois, aucune étude n'a encore été réalisée sur son impact sur la fonction microvasculaire. De plus, l'administration systémique d'inhibiteurs de sEH a aussi montré son effet sur l'amélioration de la fonction endothéliale au niveau aortique et coronarienne[24,25].

Nous avons donc émis l'hypothèse, que l'administration cutanée locale d'un inhibiteur de sEH pourrait améliorer la réactivité microvasculaire endothélium-dépendante, dans un contexte diabétique. Cette étude vous est présentée en annexe 1 et a conduit, tout comme l'iontophorèse de tréprostinil, au dépôt d'un brevet

Succinctement, pour répondre à cette hypothèse, nous avons tout d'abord choisi un modèle murin diabétique (BKS) pour les raisons décrites précédemment. L'administration pharmacologique a été réalisée au moyen d'un gel contenant un inhibiteur de sEH (t-AUCB) appliqué pendant 2 heures sur la peau épilée du dos des souris. Afin d'étudier l'effet de cet inhibiteur sur la fonction microvasculaire endothéliale-dépendante, nous avons réalisé un test d'hyperémie thermique (LTH), et comparé les résultats à l'application d'un gel contrôle ne contenant pas de médicament. Suite à plusieurs tests préliminaires de reproductibilité et de faisabilité, nous avons choisi de réaliser ce test de LTH par chauffage de la zone exposée au moyen d'une électrode thermostatée ayant une température cible de 41°c ± 0.5 durant 20 min. Un suivi laser doppler a été réalisé avant (baseline) et après le test. Des prélèvements cutanés et sanguins ont été réalisés à la suite de ce suivi.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence deux principaux résultats. Premièrement, nous observons une diminution du flux cutané microvasculaire dans ce modèle murin diabétique BKS ainsi qu'une altération de sa réponse à un test de LTH. Cela confirme le profil pathologique de ce modèle murin et son utilisation spécifique dans les études liées aux dysfonctions microvasculaires dans le domaine du diabète. Deuxièmement, la quantification dermique de t-AUCB dans les biopsies révèle un passage dermique significatif de la molécule à +2H associé à une augmentation du flux microvasculaire et une amélioration de la réaction au LTH.

En conclusion, nos résultats montrent que l'application topique d'un inhibiteur de sEH améliore la réactivité microvasculaire cutanée sur un modèle murin diabétique. L'absence de toxicité, la diffusion systémique limitée et le passage progressif de notre molécule dans la peau renforce l'idée d'une possible utilisation d'inhibiteur de sEH dans l'approche thérapeutique du traitement des ulcères de patients diabétiques. La prochaine étape va maintenant consister à valider l'utilisation d'un inhibiteur de sEH sur nos modèles murins de plaies diabétique et/ou sclérodermique.

Outre l'aspect pharmacologique, nous nous sommes également intéressés à l'impact de l'hypoxie intermittente associée à la dysfonction microvasculaire sur l'hypoxie tissulaire et la cicatrisation. Pour cela nous nous sommes intéressés à l'effet combiné du diabète et de l'une de ses comorbidités, le syndrome d'apnée du sommeil (SAS). Nous avons développé un modèle original couplant les ulcères cutanés sur modèle murin diabétique BKS (précédemment décrit) à une exposition à une hypoxie intermittente mimant le SAS. L'article issu de cette étude vous est présenté en annexe 2.

Succinctement, dans le diabète de type 2, la fréquence du SAS est très élevée, estimée entre 58 et 86%. Il est bien connu que l'hypoxie altère la fonction microvasculaire et la cicatrisation. Toutefois, le lien entre SAS, cicatrisation et diabète n'a pas encore été démontré. Afin de répondre à cela, nous avons utilisé des souris BKS sur le dos desquelles nous avons réalisés des ulcères ischémiques ou excisionnels. Nous les avons parallèlement exposées à un environnement appauvri en oxygène et suivi la cicatrisation de leurs ulcères.

Le résultat principal de cette étude fut l'observation d'une altération du délai de cicatrisation des ulcères ischémiques des animaux exposés à l'hypoxie. Ces résultats suggèrent que l'effet combiné du SAS et du diabète pourrait altérer les mécanismes cicatriciels des patients, suggérant une potentialisation de la dysfonction microvasculaire et de l'hypoxie intermittente due aux apnées dans la survenue d'ulcères.

Bilan

Ce travail de thèse aura permis, dans un premier temps, de valider en pré-clinique, l'utilisation de l'iontophorèse d'un analogue de la PGI_2 dans le traitement de ulcères cutanés sclérodermiques et diabétiques. De plus, nous avons mis en évidence l'effet combiné d'une comorbidité diabétique sur la cicatrisation de ces plaies. Pour finir, à l'image de la voie de l'EDHF, d'autres voies prometteuses restent à explorer afin de comprendre plus en détails l'implication de chacune d'entre elles dans ce contexte physiopathologique.

La cicatrisation est un processus complexe nécessitant l'action de nombreux acteurs. Outre l'approche pharmacologique décrite dans ce travail, d'autres aspects sont important à prendre en compte. Par exemple, le développement de pansements « intelligents » ou la prise en compte globale du patient sont des points non négligeables pouvant améliorer leur cicatrisation mais surtout leur qualité de vie.

Annexes

Annexe 1

Etude n°3 : Impact d'une inhibition locale de l'époxyde hydrolase soluble sur la dysfonction microvasculaire cutanée diabétique - sEHDerme

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Jérémy BELLIEN de l'université de Rouen et fait l'objet d'une demande de brevet.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, la plaie du pied diabétique est une complication sévère du diabète et représente la première cause d'amputation non-traumatique du membre inférieur *(1)*. Nous savons aussi que la microcirculation a un rôle primordial dans les processus de cicatrisation et que sa dysfonction contribue au développement des ulcères chroniques *(2-4)*. Afin d'améliorer la cicatrisation de ces ulcères, il apparait donc primordial de cibler cette dysfonction microvasculaire dans le traitement de ces plaies.

Des données de plus en plus nombreuses donnent à penser que l'altération de la voie des EETs serait impliquée dans la dysfonction endothéliale du diabète de type 2 *(6,7)*. En effet, les EETs, issus de la synthèse de l'acide arachidonique par le cytochrome P 450 (CYP), sont reconnu pour leur puissant effet vasodilatateur, anti-inflammatoire et angiogénique *(6,7)*. *In vivo*, les EETs sont rapidement dégradés par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) sous une forme moins active, l'acide dihydroxy-eicosatétraénoïque (DHET). Des études ont montré que l'effet combiné d'une administration de EETs et d'inhibiteur de sEH accélérait la ré-épithélialisation et la néovascularisation sur modèle murins *(8-10)*. Toutefois, aucune étude n'a encore été réalisée sur son impact sur la fonction microvasculaire. De plus, l'administration systémique d'inhibiteurs de sEH a aussi montré son effet sur l'amélioration de la fonction endothéliale au niveau aortique et coronarienne *(11,12)*. Nous avons donc émis l'hypothèse dans cette étude, que l'administration cutanée locale d'un inhibiteur de sEH

pourrait améliorer la réactivité microvasculaire endothéliale-dépendante dans un contexte diabétique.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons tout d'abord choisi un modèle murin diabétique (BKS) pour les raisons décrites dans l'introduction de l'étude n°2. L'administration pharmacologique a été réalisée au moyen d'un gel dopé à l'inhibiteur de sEH (t-AUCB) et appliqué pendant 2 heures sur la peau épilé du dos des souris. Un gel non dopé a servis de contrôle. Afin d'étudier l'effet de cet inhibiteur sur la fonction microvasculaire endothéliale-dépendante, nous avons réalisé un test d'hyperémie thermique (LTH) à 2 temps : avant l'application du gel et avant le prélèvement de la peau exposée, soit à +2H ou +24H selon le groupe. Suite à plusieurs tests préliminaires de reproductibilité et de faisabilité, nous avons choisi de réaliser ce test de LTH par chauffage de la zone exposée au moyen d'une électrode thermostatée ayant une température cible de 41°c ± 0.5 durant 20 min. Un suivi laser doppler a été réalisé avant (baseline) et après le test. Des prélèvements cutanés et sanguins ont été réalisés à la suite de ce suivi.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence deux principaux résultats.

Premièrement, nous observons une diminution du flux cutané microvasculaire dans ce modèle murin diabétique BKS ainsi qu'une altération de sa réponse à un test de LTH. Cela confirme le profil pathologique de ce modèle murin et son utilisation spécifique dans les études liées aux dysfonctions microvasculaires dans le domaine du diabète.

Deuxièmement, la quantification dermique de t-AUCB dans les biopsies révèle un passage dermique significatif de la molécule à +2H associé à une augmentation du flux microvasculaire et une amélioration de la réaction au LTH.

En conclusion, nos résultats montrent que l'application topique d'un inhibiteur de sEH améliore la réactivité microvasculaire cutanée sur un modèle murin diabétique. L'absence de toxicité, la diffusion systémique limitée et le passage progressif de notre molécule dans la peau renforce l'idée d'une possible utilisation d'inhibiteur de sEH dans l'approche thérapeutique du traitement des ulcères de patients diabétiques.

Impact of the local inhibition of soluble epoxide hydrolase on diabetic skin microcirculatory dysfunction

Article accepted in Diabetes and Vascular Disease Research Journal..

Short title: sEH inhibition and skin arteriolar dysfunction

Authors: Yann Savina[1,2], Thomas Duflot[3,4,5], Sylvain Kotzki[1,2], Frederic Bounoure[6,7], Pierre-Alain Thiebaut[8], Pierre-Alex Serreau[3,6], Mohamed Skiba[6,7], Jean-Michel Picquenot[8], Marie Cornic[8], Christophe Morisseau[9], Laurent Imbert[3,4], Jean-Luc Cracowski[1,2], Vincent Richard[3,5], Matthieu Roustit[1,2], Jeremy Bellien[3,5]

[1]Université Grenoble-Alpes, HP2 UMR INSERM 1042, F-38000, Grenoble, France.

[2]CHU Grenoble-Alpes, Pôle Recherche, INSERM CIC1406, F-38000, Grenoble, France

[3]Department of Pharmacology, Rouen University Hospital, F-76000 Rouen, France

[4]Laboratory of Pharmacokinetics, Toxicology and Pharmacogenetics, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France

[5]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU REMOD-VHF, F-76000 Rouen, France

[6]Department of Galenic, Normandy University, UNIROUEN, F-76000 Rouen, France

[7]INSERM U1239 Normandy University, UNIROUEN, F-76000 Rouen, France

[8]Department of Pathology, Henri Becquerel Center, F-76000 Rouen, France

[9]Department of Entomology and Cancer Center, University of California, Davis, CA

Correspondence: Dr. Jeremy Bellien, Department of Pharmacology, Rouen University Hospital, 76031 Rouen cedex

Tel: +33 2 32 88 90 30, Fax: +33 2 32 88 91 16, Email: jeremy.bellien@chu-rouen.fr

ABSTRACT

Skin microvascular dysfunction contributes to the development of poor wound healing and foot complications in diabetic individuals. We assessed the impact of the local inhibition of soluble epoxide hydrolase (sEH), which metabolizes vasodilator and anti-inflammatory epoxyeicosanoids, on the diabetic skin microvascular dysfunction.

We compared dorsal skin blood flow at baseline and during thermal hyperemia between diabetic db/db and control mice, using laser Doppler imaging, and assessed the impact of the topical administration of an aqueous gel containing the sEH inhibitor *trans*-4-(4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy)-benzoic acid (*t*-AUCB: 400 mg/L).

Basal skin blood flow was similar but thermal hyperemia was markedly reduced in diabetic compared to control mice (37.9±5.7 *vs.* 80.5±9.9 U.A., $P<0.001$). We detected a maximal concentration of *t*-AUCB in the skin of diabetic mice 2 hours after gel application and this concentration quickly decreased thereafter. Accordingly, *t*-AUCB increased thermal hyperemia 2 hours after application compared to a control gel (22.3±11.6 *vs.* -0.8±10.4%, $P<0.05$). Plasma quantification of *t*-AUCB in treated animals 2 to 24 hour after administration showed no or low limited systemic diffusion. Furthermore, HES histological staining of skin biopsies demonstrated that skin integrity was preserved in *t*-AUCB-treated mice. Finally, using Franz diffusion cells, we observed on pig ear skin, a surrogate for human skin, a continuous diffusion of *t*-AUCB from 2 hours after application to over a period of 24h.

The topical administration of a sEH inhibitor improves the skin microcirculatory function in db/db mice and represents a new therapeutic approach to prevent the development of skin complications in diabetic patients.

Keywords: diabetes, skin microvascular dysfunction, soluble epoxide hydrolase, topical form

INTRODUCTION

Diabetic foot ulcers (DFUs) are a common and serious complication of diabetes mellitus, and associated with major morbidity. Indeed, diabetes is the primary cause of non-traumatic lower-limb amputation (1). The skin microcirculation, by maintaining perfusion and delivering oxygen and nutrients, has a key role in tissue survival. Skin microvascular dysfunction occurs early in the pathophysiology of diabetes and contributes to the development of poor wound healing and foot complications in diabetic patients (2-4). Endothelial dysfunction, as well as sensory and autonomic neuropathies, are proposed to contribute to a reduction in functional capacity of the microvasculature (2-4), and topical treatments targeting skin microvascular dysfunction may help to improve wound healing while minimizing potential systemic side effects (5).

Increasing evidence suggests that alterations of endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids (EETs) pathway is involved in the pathophysiology of the endothelial dysfunction associated with type 2 diabetes (6,7). One interesting approach would thus to increase the bioavailability of EETs, which are formed by the action of cytochrome P450 (CYP) epoxygenases and display powerful vasodilating, anti-inflammatory and angiogenic properties (6,7). *In vivo*, EETs are rapidly converted to the less active dihydroxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase (sEH), which is the target of a new class of pharmacological inhibitors (8,9). Interestingly, exogenous EETs administration as well as genetic or pharmacological inhibition of sEH was shown to accelerate wound epithelialization and neovascularization in ob/ob mice, and in the hairless mouse ear wound model (8-10). But to date, no study has evaluated their impact on skin microcirculatory function. Since in animals, systemic administration of sEH inhibitors has also been successfully used to improve

endothelial function of aortas and coronary arteries (11,12), we hypothesize that local cutaneous sEH inhibition may improve endothelium-dependent microvascular reactivity.

In this context, the aim of the present study was to assess the effect of a topical formulation containing a sEH inhibitor on the skin microcirculation in diabetic mice.

METHODS

Animals and treatments

The protocol was approved by a local institutional review committee (agreement number C 38 516 10 006, n°2017011312598602-V5#8531) and conducted in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Nine-week-old male wild-type C57BL/6J and db/db (BKS(D)-Leprdb/JOrlRj) mice, a genetic model of type 2 diabetes, were acquired from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). These mice were allowed to acclimate to the photoperiod (12-hour light/12-hour dark) and temperature conditions (22±1°C) for one week prior to the start of the study. A 2-hour topical administration (20 µL) of a newly developed gel-like, aqueous pharmaceutical preparation containing the sEH inhibitor *trans*-4-(4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy)-benzoic acid (*t*-AUCB: 400 mg/L) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or a vehicle control gel was performed on the dorsal skin of db/db mice, depilated two days before experiments. Assessment of microvascular function, skin biopsies (50 mm^2) and intra-cardiac blood sampling were performed 2 and 24 hours after gel application. Animals were anaesthetized with isoflurane (induction at 3% during 3 minutes, and then maintained at 2%) and placed over a heating carpet to maintain stable core temperature (37.5±0.5°C).

Local and systemic quantification of *t*-AUCB

Plasma and skin levels of *t*-AUCB were quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (13). Briefly, skin tissues were mixed with 1 mL of methanol-water (50:50 v/v) and ultrasonicated for 10 min, or 100 µL of plasma were mixed with 300 µL of methanol, allowing protein precipitation. Then, skin and plasma samples were thoroughly vortexed for 10 sec and centrifuged at 16,100 g for 5 min. The resulting supernatants were collected and analyzed by LC-MS/MS. Chromatographic separation was

performed on a Kinetex C18 column (2.6-μm particle size, 50-mm length × 3-mm inner diameter). The autosampler temperature was set at 8 °C, the column oven at 30 °C, the injected volume was 20 μL and the flow rate was 400 μL/min. The mobile phase was 0.2% formic acid in methanol (solvent A) and 2 mM ammonium formate with 0.2% formic acid in water (solvent B). The elution started with 95% B (0-2 min), 95-5% B (2-5 min), 5% B (5-10 min), 5-95% B (10-11 min), 95% B (11-12 min). The following multiple reaction monitoring (MRM) transitions m/z 412.9 to m/z 135.1 and m/z 412.9 to m/z 93.0 in positive ion mode were used to detect *t*-AUCB (quantification and confirmation transitions respectively). Skin levels were normalized to tissue weight.

Assessment of skin microvascular function

Skin microvascular reactivity to local heating was used as an index of endothelium-dependent function (14). Dorsal skin blood flow was measured by laser Doppler imaging (LDI; PeriScan PIM, Perimed, Järfälla, Sweden) over 10 minutes before heating (baseline flow). The skin was subsequently heated at 41°C during 20 minutes using a 0.5 cm^2 heating probe regulated with an internal thermometer. Skin blood flow was then recorded during the following 15 minutes. Data were digitized, stored on a computer, and analysed offline with signal processing software (PimSoft v1.5.4.8078, Perimed, Järfälla, Sweden). Baseline and peak hyperaemia were expressed as arbitrary perfusion units (APUs), averaged over 3 minutes immediately before, and 1 minute immediately after heating, respectively. Thermal hyperemia was subsequently calculated as the difference between peak hyperaemia and baseline skin blood flow.

Skin integrity

Skin biopsies were carefully sampled and immediately fixed in a 4% formalin solution for 24 hours. After proper fixation, tissue samples were embedded in paraffin and stored at room temperature until analysis. 4µm sections were deparaffinized and stained with standard Hematoxylin-Eosin (H&E) staining. Slides were analyzed by an experienced pathologist (JMP).

Transdermal passage of *t*-AUCB across pig ear skin

The transdermal passage of *t*-AUCB across pig ear skin, which is structurally closer to human skin than mouse skin, was assessed using Frantz diffusion cells as previously described (15).

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SEM. The Shapiro-Wilk test was used to assess normality. Analyses of the differences between diabetic and control mice for basal skin blood flow and thermal hyperemia were performed by unpaired t-test or nonparametric Mann-Whitney rank-sum test. Analyses of the variation in basal skin blood flow and thermal hyperemia induced by the *t*-AUCB-containing gel were performed using mixed effects models with time as fixed effect and mouse as a random effect followed in case of significance by Bonferroni post-hoc tests to compare the value obtained before application to other time points after application. Analyses of the differences between the impact of the t-AUCB-containing gel and the vehicle gel on basal skin blood flow and thermal hyperemia were performed by repeated-measures ANOVA, and we assessed the effect of the group, of time and the time*group interaction. Statistical analysis was performed with NCSS software (version 07.1.14). A two-sided $P<0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

At untreated skin sites, cutaneous blood flow was slightly but significantly lower in db/db mice compared to control mice (Figure 1A). In contrast, there was a marked reduction in thermal hyperemia in db/db mice compared to controls (Figure 1B), demonstrating the presence of diabetic skin microcirculatory dysfunction.

We carefully compared the impact of the *t*-AUCB-containing gel to a vehicle control gel in db/db mice. Both gels were applied on the same animal, with a minimal distance of 1 cm between the two application sites. Both gels increased basal skin blood flow after a 2-hour application, with no significant difference between groups (Figure 2A). However, the *t*-AUCB-containing gel significantly increased thermal hyperemia compared to the vehicle control gel (Figure 2B).

After the 2-hour gel application, *t*-AUCB was detectable in skin biopsies and skin levels drastically decreased 24 hours after application, demonstrating transdermal permeation of *t*-AUCB across db/db mouse skin (Figure 3A). Consistently, thermal hyperemia returned to baseline values 24 hours after application (Figure 3B).

Plasma quantification showed no systemic diffusion of *t*-AUCB, assessed 2 and 24 hours after application of the *t*-AUCB-containing gel, except for one animal (Table 1). In addition, no significant inflammatory infiltrate was observed in mouse skin 2 and 24 hours after gel application (Figure 4).

Finally, we observed a continuous diffusion of *t*-AUCB across pig ear skin from 2 hours after application to over a period of 24h (Figure 5).

DISCUSSION

The major finding of the present study is that sEH inhibition through a topical formulation increases thermal hyperemia, an index of endothelium-dependent microvascular reactivity, in a murine model of diabetes. Because microvascular endothelial dysfunction is a hallmark of the disease, and considering the involvement of impaired cutaneous microcirculation in poor wound healing in diabetes, such strategy could be a relevant therapeutic approach for DFUs.

EETs are endothelium-derived vasodilating factors with powerful anti-inflammatory and pro-angiogenic properties that could be useful in the treatment of the cardiovascular complications of type 2 diabetes (6,7). Despite increasing evidence suggesting a possible role for EETs in diabetes-related endothelial dysfunction, no study had previously focused on diabetic skin microvascular dysfunction. The use of thermal hyperemia as a reactivity test in the present work was motivated by the involvement of EETs together with NO in the response to local heating in humans (16).

We observed a reduction in basal skin blood flow in diabetic db/db mice compared to wild-type mice that is probably mainly related to decreased vascular density (17). In addition, although no data were available in animal models of diabetes when we designed the study, we demonstrated an altered microvascular reactivity to thermal hyperemia in diabetic mice. Thus, as shown in humans (18), measuring blood flow response to a standardized local heat stimulus represents an adequate model to study the skin microvascular dysfunction associated with diabetes in mice.

In this context, we tested the impact of a topical formulation containing *t*-AUCB, an inhibitor of EET degradation by sEH (11,13), on the skin microvascular dysfunction of db/db mice. Quantification of *t*-AUCB in skin biopsies revealed a significant transdermal permeation of the drug 2 hours after gel application, associated with increased basal skin blood flow and thermal hyperemia. Yet, when comparing the vehicle control gel, we noticed that in fact both

formulations similarly increased basal skin blood flow. This result supports previous data showing a direct vasodilating effect of the vehicle DMSO (19). In fact, topical administration of DMSO was even proposed in humans to treat the skin complications of systemic scleroderma, which is also characterized by microvascular dysfunction and a risk of ulcer, but the results from randomized controlled trials were disappointing (20,21). However, DMSO had no effect on reactivity. In contrast, the *t*-AUCB-containing gel improved thermal hyperemia compared to the vehicle control gel, demonstrating the improvement in skin microvascular reactivity. This result shows that, as previously demonstrated in coronary and peripheral arteries (11,12), sEH plays a major role in the vascular dysfunction associated with type 2 diabetes at the level of the skin. Although our objective in this preliminary study was not to assess the effect of sEH inhibition on wound healing, it provides a first proof-of-principle in an animal model with delayed wound healing (22).

Importantly for potential human use, histological analysis revealed no signs of skin toxicity with the *t*-AUCB-containing gel. In addition, plasma quantification of *t*-AUCB in exposed animals showed a limited systemic diffusion of the drug, in only one animal. This may be important because, although first results obtained in the first phases of clinical development suggest that sEH inhibitors were safe (23,24), some data show that increasing EET bioavailability may be associated with adverse effects and in particular may potentiate tumor development (6,7,25,26). Moreover, because mouse skin is thin and shaving of the animals for the experiments lead to an underestimation of the time needed for the transdermal passage of *t*-AUCB compared to humans, we performed a pharmacokinetic study on isolated human pig ear skin. We observed a progressive and continuous diffusion of *t*-AUCB that could be particularly useful to prevent and/or treat the skin complications of patients with type 2 diabetes.

In conclusion, our results show that the topical administration of a sEH inhibitor improves

skin microvascular reactivity in a model of type 2 diabetes. The absence of skin toxicity, the limited systemic diffusion and the demonstration of a progressive passage of the sEH inhibitor across a skin closed to human support the use of this therapeutic strategy in patients with type 2 diabetes with the expected results of preventing skin complications and in particular DFUs development.

REFERENCES

1. Moxey PW, Hofman D, Hinchliffe RJ, Jones K, Thompson MM, Holt PJE. Epidemiological study of lower limb amputation in England between 2003 and 2008. Br J Surg. 2010;97:1348–1353.
2. Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, Doupis J, Gnardellis C, Leal E, Tellechea A, Pradhan L, Lyons TE, Giurini JM, Veves A. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. Diabetes. 2012;61:2937-2947.
3. Chao CY, Cheing GL. Microvascular dysfunction in diabetic foot disease and ulceration. Diabetes Metab Res Rev. 2009;25:604-614.
4. Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. J Tissue Viability. 2016;25:229-236.
5. Valacchi G, Zanardi I, Sticozzi C, Bocci V, Travagli V. Emerging topics in cutaneous wound repair. Ann N Y Acad Sci. 2012;1259:136-144.
6. Lorthioir A, Guerrot D, Joannides R, Bellien J. Diabetic cardiovascular disease - Soluble epoxide hydrolase as a target. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2012;10:212-222.
7. Bellien J, Joannides R, Richard V, Thuillez C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? Pharmacol Ther. 2011;131:1-17.
8. Zhao H, Chen J, Chai J, Zhang Y, Yu C, Pan Z, Gao P, Zong C, Guan Q, Fu Y, Liu Y. Cytochrome P450 (CYP) epoxygenases as potential targets in the management of impaired diabetic wound healing. Lab Invest. 2017 Jul;97:782-791.
9. Sander AL, Jakob H, Sommer K, Sadler C, Fleming I, Marzi I, Frank J. Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids accelerate wound epithelialization and neovascularization in the hairless mouse ear wound model. Langenbecks Arch Surg. 2011;396:1245-1253.

10. Sander AL, Sommer K, Neumayer T, Fleming I, Marzi I, Barker JH, Frank J, Jakob H. Soluble epoxide hydrolase disruption as therapeutic target for wound healing. J Surg Res. 2013;182:362-367.
11. Roche C, Besnier M, Cassel R, Harouki N, Coquerel D, Guerrot D, Nicol L, Loizon E, Morisseau C, Remy-Jouet I, Mulder P, Ouvrard-Pascaud A, Madec AM, Richard V, Bellien J. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015;308:H1020-H1029.
12. Zhang LN, Vincelette J, Chen D, Gless RD, Anandan SK, Rubanyi GM, Webb HK, MacIntyre DE, Wang YX. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. Eur J Pharmacol. 2011;654:68-74.
13. Liu JY, Tsai HJ, Hwang SH, Jones PD, Morisseau C, Hammock BD. Pharmacokinetic optimization of four soluble epoxide hydrolase inhibitors for use in a murine model of inflammation. Br J Pharmacol. 2009;156:284-296.
14. Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. Trends Pharmacol Sci. 2013;34:373-384.
15. Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. Pharm Res. 2006;23:1850-1856.
16. Brunt VE, Minson CT. KCa channels and epoxyeicosatrienoic acids: major contributors to thermal hyperaemia in human skin. J Physiol. 2012;590:3523-3534.
17. Schaefer C, Biermann T, Schroeder M, Fuhrhop I, Niemeier A, Rüther W, Algenstaedt P, Hansen-Algenstaedt N. Early microvascular complications of prediabetes in mice with impaired glucose tolerance and dyslipidemia. Acta Diabetol. 2010;47:19-27.
18. Fuchs D, Dupon PP, Schaap LA, Draijer R. The association between diabetes and dermal

microvascular dysfunction non-invasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: a systematic review with meta-analysis. Cardiovasc Diabetol. 2017;16:11.

19. Kaneda T, Sasaki N, Urakawa N, Shimizu K. Endothelium-dependent and -independent vasodilator effects of dimethyl sulfoxide in rat aorta. Pharmacology. 2016;97:171-176.
20. Scherbel AL. The effect of percutaneous dimethyl sulfoxide on cutaneous manifestations of systemic sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 1983;411:120-30.
21. Williams HJ, Furst DE, Dahl SL, Steen VD, Marks C, Alpert EJ, Henderson AM, Samuelson CO Jr, Dreyfus JN, Weinstein A, et al. Double-blind, multicenter controlled trial comparing topical dimethyl sulfoxide and normal saline for treatment of hand ulcers in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 1985;28:308-314.
22. Sullivan SR, Underwood RA, Gibran NS, Sigle RO, Usui ML, Carter WG, Olerud JE. Validation of a model for the study of multiple wounds in the diabetic mouse (db/db). Plast Reconstr Surg. 2004;113:953-960.
23. Chen D, Whitcomb R, MacIntyre E, Tran V, Do ZN, Sabry J, Patel DV, Anandan SK, Gless R, Webb HK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of AR9281, an inhibitor of soluble epoxide hydrolase, in single- and multiple-dose studies in healthy human subjects. J Clin Pharmacol. 2012;52:319-328.
24. Lazaar AL, Yang L, Boardley RL, Goyal NS, Robertson J, Baldwin SJ, Newby DE, Wilkinson IB, Tal-Singer R, Mayer RJ, Cheriyan J. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse event profile of GSK2256294, a novel soluble epoxide hydrolase inhibitor. Br J Clin Pharmacol. 2016;81:971-979.
25. Panigrahy D, Edin ML, Lee CR, Huang S, Bielenberg DR, Butterfield CE, Barnés CM, Mammoto A, Mammoto T, Luria A, Benny O, Chaponis DM, Dudley AC, Greene ER, Vergilio JA, Pietramaggiori G, Scherer-Pietramaggiori SS, Short SM, Seth M, Lih FB, Tomer KB, Yang J, Schwendener RA, Hammock BD, Falck JR, Manthati VL, Ingber DE,

Kaipainen A, D'Amore PA, Kieran MW, Zeldin DC. Epoxyeicosanoids stimulate multiorgan metastasis and tumor dormancy escape in mice. J Clin Invest. 2012;122:178-191.

26. Sausville LN, Gangadhariah M, Chiusa M, Mei S, Wei S, Zent R, Luther JM, Shuey MM, Capdevila JH, Falck JR, Guengerich FP, Williams SM, Pozzi A. The cytochrome P450 slow metabolizers CYP2C9*2 and CYP2C9*3 directly regulate tumorigenesis via reduced epoxyeicosatrienoic acid production. Cancer Res. 2018 Jul 16. pii: canres.3977.2017.

Table 1. Plasma quantification of *t*-AUCB

	2 hours	**24 hours**
Below LOQ (2.4 nM)	5 (83%)	4 (100%)
Above LOQ (2.4 nM)	1 (17%)	0 (0%)

Data are n (%). LOQ: limit of quantification.

FIGURE LEGENDS

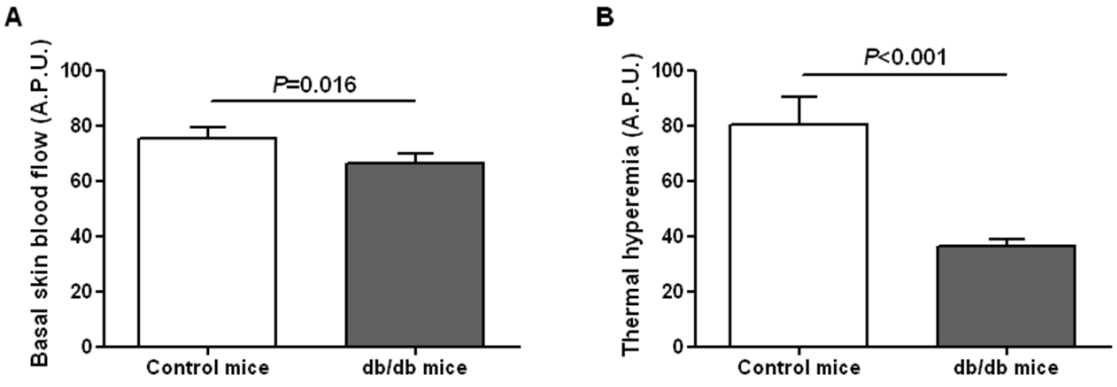


Figure 1. *Basal skin blood flow (A) and thermal hyperemia (B) measured by laser Doppler imaging in control (n=7) and db/db mice (n=32). A.P.U.: arbitrary perfusion unit.*

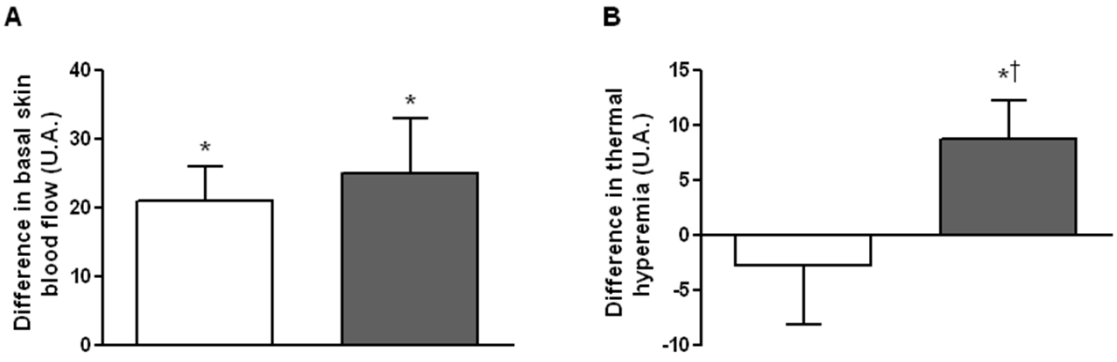


Figure 2. *Evolution of basal skin blood flow (A) and thermal hyperemia (B) measured by laser Doppler imaging after a 2-hour topical application of the t-AUCB-containing gel and the vehicle control gel on the dorsal skin of db/db mice (n=13). *P<0.05 vs. before topical application, †P<0.05 vs. vehicle control gel. A.P.U.: arbitrary perfusion unit.*

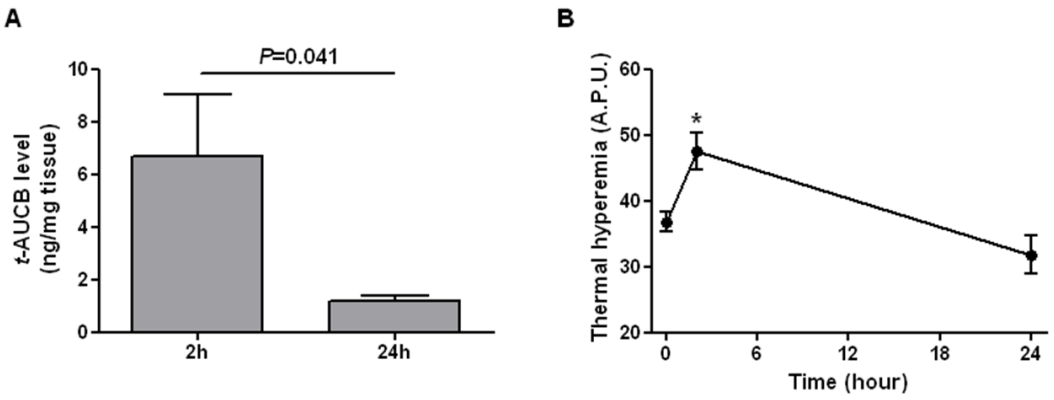


Figure 3. *A, Skin levels of t-AUCB, quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, 2 and 24 hours after the topical application of the t-AUCB-containing gel on the dorsal skin of db/db mice (n=6 per time point). B, Thermal hyperemia measured by laser Doppler imaging before, 2 and 24 hours after the topical application of the t-AUCB-containing gel on the dorsal skin of db/db mice (n=6-26 per time point). *P<0.05 vs. before topical application. A.P.U.: arbitrary perfusion unit.*

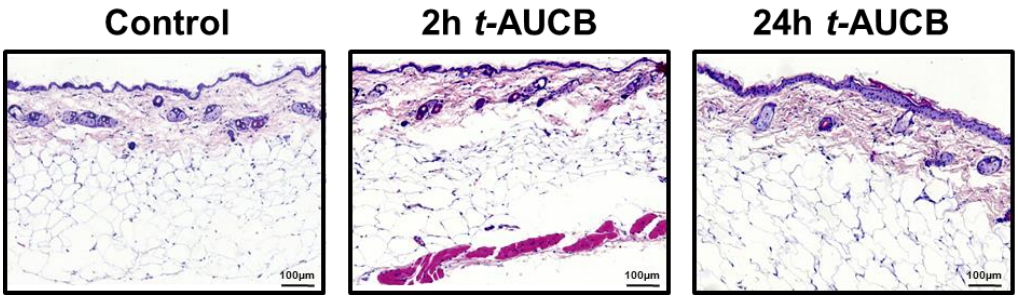


Figure 4. *Hematoxylin & eosin staining of mouse skin 8 and 24 hours after topical application of t-AUCB-containing gel on the dorsal skin of db/db mice (n=6).*

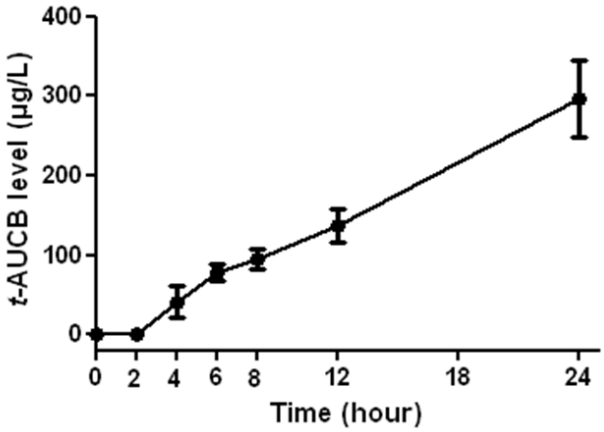


Figure 5. *Evolution of t-AUCB level, quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, in the receptor compartment of Frantz cells from 0 to 24 hours after gel application on pig ear skin (n=3 per time point).*

Annexe 2

Etude n°4 : Impact de l'hypoxie intermittente sur la cicatrisation d'ulcères cutanés ischémiques et excisionels sur un modèle murin diabétique – SASFOOT

La cicatrisation des plaies diabétiques met en jeu des mécanismes complexes faisant intervenir la migration et la prolifération de différents types cellulaires, notamment les kératinocytes, les fibroblastes ou les macrophages[1]. L'oxygénation tissulaire, marqueur de la perfusion microvasculaire locale, joue également un rôle clé dans la cicatrisation[2,3]. La régulation de la microcirculation cutanée est médiée par des interactions neurovasculaires complexes[4], avec chez les patients diabétiques des altérations de la vasodilatation axone-réflexe[5] et endothélium dépendante[6,7]. Plus spécifiquement, la réponse endothéliale dépendante du monoxyde d'azote (NO) semble altérée par l'hypoxie via un mécanisme impliquant SDF-1α[8].

Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est une pathologie multifactorielle caractérisée par la présence d'épisodes d'hypoxie intermittente (HI) nocturne. Le SAS est associé à de nombreuses pathologies cardiovasculaires, telles que l'hypertension artérielle systémique, l'insuffisance coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux, mais aussi à des troubles métaboliques, notamment une insulino-résistance et un diabète de type 2[9]. L'atteinte microcirculatoire et le défaut de perfusion tissulaire qui en découle pourrait être un facteurs aggravants certaines complications diabétiques[10].

Dans le diabète de type 2, la fréquence du SAS est très élevée, estimée entre 58 et 86%[11,12]. Une étude récente a montré sur une large cohorte une causalité entre SAS et cas incidents de diabète, avec une corrélation entre la sévérité du SAS et l'incidence du diabète[13]. Il existe au cours du SAS une dysfonction endothéliale, une inflammation systémique, et un stress oxydant marqué, qui pourraient augmenter le risque de survenue de plaies de pied diabétique. Il existe indépendamment un lien entre SAS et neuropathie diabétique[14], susceptible de renforcer cette hypothèse. Bien que SAS et diabète soient des pathologies fréquemment associées, les données évaluant le lien entre apnées du sommeil et plaies de pied diabétique sont extrêmement limitées. Tahrani et al[14] ont rapporté une augmentation du nombre d'ulcères chez des patients diabétiques apnéiques par rapport à des sujets non

apnéiques, mais avec un nombre limité de cas (n=8) dans leur cohorte. A l'inverse, une étude rétrospective n'avait pas montré d'impact du SAS sur la cicatrisation des plaies du pied diabétique chez des patients déjà partiellement amputés[15].

Afin d'évaluer l'effet de l'apnée du sommeil et de son traitement par PPC sur la $TcPO_2$ nocturne chez des patients diabétiques présentant un risque élevé de plaie de pied, une étude clinique est menée par notre équipe (investigateur principal : Dr Anne-Laure Borel, diabétologue au CHU de Grenoble ; ClinicalTrials.gov Identifier : NCT01573897).

Dans une démarche de recherche translationnelle, l'objectif de ce projet a été de réaliser le pendant expérimental de cette étude clinique. Des données récentes ont montré qu'un environnement appauvri en oxygène ralentissait la cicatrisation, en affectant la néoangiogenèse et la formation de tissu de granulation chez la souris diabétique[16]. Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que des souris diabétiques exposées à l'hypoxie intermittente (HI) (modèle animal du SAS), présentent également un retard de cicatrisation.

Pour répondre à cette hypothèse nous avons utilisé un modèle murin diabétique (BKS, précédemment décrit). Se basant sur notre expertise acquise durant l'étude n°2 de ce manuscrit, nous avons utilisé deux modèles d'ulcères (excisionnels – EW- avec attelle et ischémiques- PU). Chaque souris possédant en tout deux ulcères du même modèle.

Afin de mimer un SAS, les animaux ont été placés dans un dispositif à hypoxie couramment utilisé par notre équipe (Figure 1) et précédemment décrit[17]. Succinctement, un système d'électrovannes distribue de l'air et de l'azote. Les animaux exposés à l'HI sont soumis lors de leur sommeil à des variations cycliques de la composition de l'air qu'ils respirent. Les cycles durent une minute avec 30 secondes d'un mélange d'air et d'azote, correspondant à une fraction inspirée en oxygène (FiO2) de 5%, suivies de 30 secondes d'air avec une FiO2 de 21%. Cette variation de FiO2 entraine des variations cycliques de la saturation artérielle en oxygène (SaO2), avec des saturations minimales à environ 60%, soit un SAS très sévère[18]. Ces cycles sont répétés 8 heures par jour pendant 21 jours mimant un SAS.

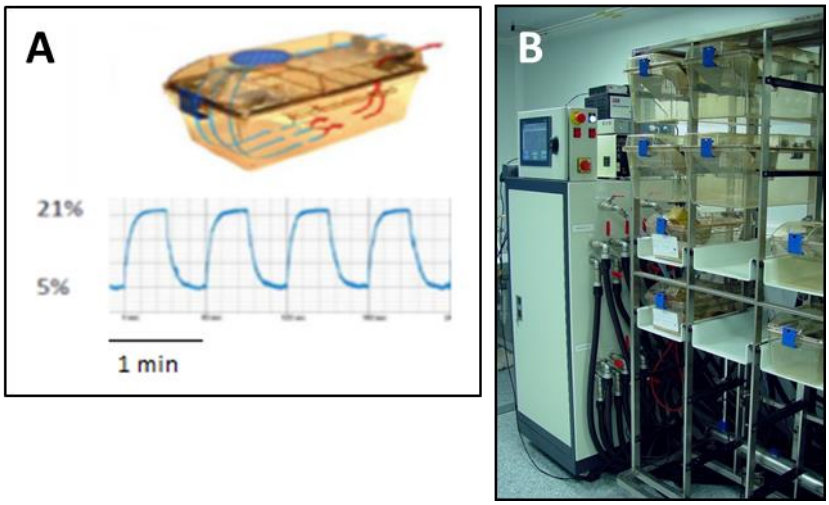


Figure 1. Représentation schématique (A) et photographique (B) du dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente.

Les animaux ont été divisés en trois groupes en fonction du type d'exposition choisi. L'objectif de cette étude étant de pouvoir estimer l'intérêt de l'utilisation de la PPC chez des patients diabétiques atteints d'un ulcère, nous avons évalué l'impact de l'hypoxie et/ou d'un retour en normoxie sur cette cicatrisation (vous trouverez le schéma de répartition des groupes au sein de l'article dans la partie « Material and methods »).

Groupe 1 : les souris BKS seront exposées 21 jours en normoxie puis mantenues en normoxie après induction de la lésion (N).

Groupe 2 : les souris BKS seront exposées à 21 jours d'Hypoxie Intermittente (HI) puis maintenues en HI après induction de la lésion (HI).

Groupe 3 : les souris BKS seront exposées à 21 jours d'HI puis remises en normoxie après induction de la lésion (HI-N)

L'objectif principal de cette étude était d'observer l'évolution et la cicatrisation des ulcères en fonction du type d'exposition. Concernant le groupe des EW, nous avons dû sortir les souris du protocole pour des raisons éthiques et de bien-être animal. En effet, il semblerait que le stress engendré par l'EW conjugué à l'exposition à hypoxie soit trop important pour la survie des animaux. Une hypoxie à 5% représente probablement un HI trop sévère pour ce modèle.

Les résultats principaux concernant le groupe des PU sont nettement plus encourageant. En effet, l'exposition à une HI de 5% augmente significativement le délai de cicatrisation de ces ulcères. De plus, nous observons les animaux exposés à une HI avant ulcération, que l'on a replacés en normoxie durant la phase de cicatrisation, possède un profil de cicatrisation identique aux animaux non exposés à l'HI.

Suite à l'arrêt de l'étude du groupe des EW, nous avons souhaité évaluer si la sévérité de l'HI pouvait avoir un impact sur la cicatrisation des PU. Nous observons que pour une FiO_2 de 10%, les animaux exposés ou non possèdent un profil de cicatrisation similaire.

Les résultats de cette étude nous permettent d'avancer l'idée qu'un traitement par PPC de patients diabétiques souffrant d'ulcères chroniques, pourrait améliorer le délai de cicatrisation de leurs plaies et ainsi diminuer les risques de complications liées au retard de cicatrisation.

Impact of Intermittent Hypoxia on Wound Healing in Excisional and Ischemic Diabetic Wound Models.

Natalie Khanafer[1], Yann Savina[1], Raphael Bouvet[1], Jean-Luc Cracowski[1,2], Diane Godin-Ribuot[1], Matthieu Roustit[1,2#]

[1] Univ. Grenoble Alpes, Inserm, Laboratoire HP2, U1042, 38000 Grenoble, France

[2] Grenoble Alpes University Hospital, Clinical Pharmacology, Inserm CIC1406, 38000 Grenoble, France

[#] Corresponding Author

Dr Matthieu Roustit, Unité de Pharmacologie Clinique, Centre d'Investigation Clinique de Grenoble - Inserm CIC1406, CHU Grenoble Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 09, France.

MRoustit@chu-grenoble.fr

Tel +33 4 76 76 92 60

Fax +33 4 76 76 92 62

Abbreviations:

Abbreviations	**Acronyms**
OSA	Obstructive Sleep Apnea
IH	Intermittent Hypoxia
CIH	Chronic Intermittent Hypoxia
FiO2	Fraction of inspired oxygen
DN	Diabetic neuropathy
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
PU	Pressure ulcer
EU	Excisional ulcer
N	Normoxia
H	Hypoxia
LDI	Laser doppler imaging
I/R	Ischemic-Reperfusion
Ach	Acetylcholine
SNP	Sodium Nitroprusside
FBG	Fasting Blood Glucose
AUC	Area under the curve
BL	Baseline

Abstract:

Background and aim: Diabetes Mellitus is a group of chronic metabolic conditions associated with microvascular, macrovascular and neuropathic complications including diabetic foot ulcers which are very highly prevalent in diabetic patients. Obstructive sleep apnea (OSA) is a chronic treatable sleep is a highly prevalent disease resulting in chronic Intermittent Hypoxia (IH) and transient respiratory arrest. It is associated with endothelial dysfunction, systemic inflammation, and marked oxidative stress which makes it a frequent comorbidity in patients with type 2 diabetes. However, whether IH potentiates the risk of wound healing impairment remains unknown. In this study, we investigated the effect of IH on wound healing in a model of ischemic ulcer in diabetic mice.

Methods: BKS male mice were exposed to IH (1min cycle, FiO2 21-5%, 8h/day), or normoxia for a duration of 2 weeks. Then two ischemic ulcers were induced on the back of each mouse by applying magnets, and mice were exposed to hypoxia or normoxia. Mice were randomly divided into three groups: a control group where mice were exposed to normoxia (NN); a treated group were mice were exposed to hypoxia and then normoxia (HN); and a group exposed to hypoxia throughout (HH). Wound size was assessed daily with photometric follow-up and analyzed using ImageJ. Microvascular function was investigated using Laser Doppler Imaging coupled with iontophoresis of acetylcholine (Ach) or Sodium Nitroprusside (SNP).

Results: Wound healing was significantly impaired in the HH group in comparison with control group NN (644.1 ± 177 vs 834.2 ± 68 %BL.day; p=0.003) but not with the HN group (644.1 ± 177 vs 752.4 ± 100 %BL.day, p=0.129).Moreover, the difference between NN and HN groups was significant (p=0.045). Vascular Reactivity tests at the end of the exposure show that there were no differences in the vasodilation responses of Ach and SNP between the three groups.

Conclusion: Exposure to IH in diabetic mice impaired wound healing. These results suggest that OSA may potentiate the risk of DFU in diabetic patients. Further work is needed to understand the mechanisms involved.

Keywords: Sleep Apnea Syndrome; diabetes; ischemic ulcer; intermittent hypoxia; wound healing; iontophoresis

INTRODUCTION

Sleep apnea syndrome is an underdiagnosed condition characterized by recurrent episodes of upper airway obstruction leading to sleep fragmentation and Intermittent Hypoxia (IH)[19]. It represents a significant public health problem as it affects at least 10% of the general population and is a pivotal risk factor of cardiovascular, neurocognitive and metabolic disorders[20], including insulin resistance and type 2 diabetes. Studies have shown that intermittent hypoxia and fragmented sleep resulted in increased insulin resistance without an adequate compensatory insulin response, leading to glucose intolerance[21]. Furthermore, it has been shown that obstructive sleep apnea (OSA) can exert adverse effects on diabetes-related complication.

.

Diabetes Mellitus is a metabolic disorder of various etiology characterized by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolism resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both[22]. Worsening of the diabetic status can lead to several complications including microangiopathic, macroangiopathic and neuropathic ones, the later which is involved in delayed wound healing. Poor wound healing remains a significant health issue for a large number of diabetic patients. It is mainly manifested through Diabetic foot ulcer which is one of the long-term complications of diabetes with a life time risk up to 25%, due to its high frequency and impairment of wound healing[11].

In type 2 diabetes the frequency of OSA may be up to 23%[23], and cross-sectional estimates from clinic populations and population studies suggest that up to 40% of patients with OSA have diabetes8. During OSA, there is endothelial dysfunction, systemic inflammation, and marked oxidative stress[24], which may increase the risk of diabetic foot ulcers. Microcirculatory involvement and the resulting lack of tissue perfusion could also be an aggravating factor in some diabetic complications[25].

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is an important oxygen hemostasis determinant of healing. Its role in wound healing is already known[14], as it contributes to all stages of wound healing through its role in cell migration, cell survival under hypoxic conditions, cell division, growth factor release, and matrix synthesis throughout the healing process[17]. Yet, prolonged exposure to hypoxia may delay wound healing.

Although an association and mechanistic links between Diabetic Neuropathy and Obstructive Sleep Apnea in patients with T2DM have been identified[26], yet the relationship between OSA and the delay of wound healing in diabetic patients has been poorly investigated.

Thus, the aims of the present study were to investigate the effects of chronic exposure to intermittent hypoxia on the duration of healing of diabetic mice and its impact on endothelial microvascular activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The protocol was approved by a local institutional review committee (agreement number on hold) and conducted in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighteen thirty-weeks-old male db/db (BKS(D)-Leprdb/JOrlRj) mice, an obese genetic model of type 2 diabetes, were acquired from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). These mice were allowed to acclimate to the photoperiod (12-hour light/12-hour dark) and temperature conditions (22±1°C) for one week prior to the start of the study with food and water ad libitum. Their blood glucose levels were tested with a glucometer (Vario Onetouch®) to confirm that plasma glucose levels were above 250mg/dL to confirm the diabetic state of mice before getting into the study.

Experimental Design

The diabetic BKS mouse model was divided randomly into three groups of 6 animals each (Figure 1). The first group was the control group where the mice were exposed to Normoxia for two weeks and maintained in Normoxia after ulcer formation until compete re-epithelization. It represents non-apneic diabetic patients with ulcer. The second group represented patients with diabetic foot ulcer experiencing OSA where the mice were exposed to two weeks of 5% or 10% IH and were kept in hypoxia after wound induction. The mice of the last group were exposed to 5% or 10% IH for two weeks then were put in Normoxia after ulcer formation. Thus, this group mimicked apneic diabetic patients with ulcer followed by a treatment for OSA.

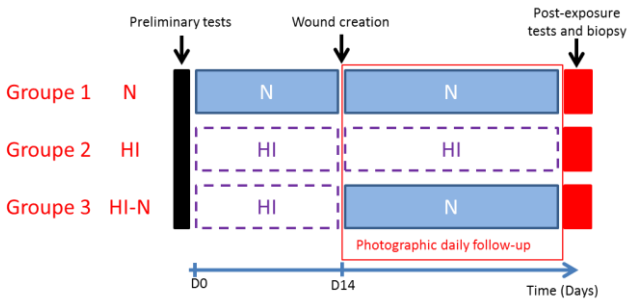


Figure 1: Schema showing the study design of the three groups.

Metabolic parameters

After 6 hours of fasting, the glycemia and weight were measured for all animals one day before exposure, to ensure that the animals were diabetic. The glycemia was measured with a glucometer (Vario onetouch) after tail-tip amputation and was expressed in mg/dl. Hematocrit was analyzed at the end of the experiment in order to verify the hypoxic state of the animals exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH). Blood was collected in a heparinized capillary and centrifuged at 130rpm for 7 minutes at room temperature (Hettich, Haematokrit 210)

Intermittent Hypoxia Protocol

Intermittent Hypoxia is obtained by subjecting animals to a special device (Annex 1) of alternate cyclic variations of air composed of nitrogen and oxygen, which is directly distributed into the cages of animals, hence inducing arterial oxygen desaturation levels similar which mimics severe OSA patients[27].

Before H/N exposure, the animals were left one week in the stabilization area. CIH was achieved in experimental cages as previously described[28]. Briefly, the animals were exposed in their housing cages to 60-s IH cycles during 8 hours per day for a duration of six weeks. Each cycle lasts one minute with 30 seconds of a mixture of air and nitrogen, corresponding to a FiO2 of 5% or 10%, followed by 30 seconds of air with a FiO2 of 21%. In similar experimental cages located in the same animal facility, the control animals were exposed to air stimulus (21% Fi02) at similar flows to ensure similar levels of noise and turbulence related to gas circulation. FiO2 was monitored throughout the experiment with a gas analyzer (ML206, ADInstruments, Oxford, United Kingdom). The ambient temperature was maintained at 20-22°C.

Ulcer Model

Pressure Ulcer model (PU): Isoflurane mask was used for anesthesia (induction 3% and kept at 1.5%) and analgesia was injected before wound creation (Buprenorphine 0.1mg/kg). We adapted a used PU protocol[29] (Figure 2). Two magnet plates (10 mm diameter, 5.5N, MAGSY, Zlín-Prštné, Czech Republic) were positioned on the shaved skin of the dorsum region of the mouse, pinching both the skin and the underlying panniculus carnosus. Pressure ulcers were formed after 3 ischemia–reperfusion cycles (I/R). Each I/R cycle consisted of a 2-h period of magnetic pressure followed by a 15 minutes period of release. Mice were anesthetized only during magnet placement and removal steps. The mice tolerated the procedure and returned to their normal activity few minutes after the magnet placement.



Figure 2 Pressure Ulcer Protocol demonstrated by 3 I/R cycles.

Excisional Wound model (EU): Isoflurane mask was used for anesthesia (induction 3min at 3%, and kept at 1.5% during all the procedure) and analgesia was injected before wound creation (Buprenorphine, 0.1mg/kg). Two full-thickness wounds extending through the panniculus carnosus were made on the shaved dorsum on each side of midline using an 8mm biopsy punch and iris scissors. A 14mm²-diameter ring was affixed with tissue adhesive to protect the ulcers without a splint-function and then covered with a bandage.

Assessment of Endothelium-dependent and -independent microvascular reactivity

Mice were anesthetized with inhaled isoflurane (induction 3min at 3%, and kept at 1.5%), and the dorsal surface of the mouse was shaved with an electric shaver, followed by treatment with a hair-removal cream (Veet)[30].

Before and after wound healing process, endothelial (Ach) and non-endothelial (SNP) dependent tests were performed as previously described[31]. Briefly, skin blood flow was continuously recorded, using a laser Doppler Imaging (PIM3; Perimed, Järfälla, Sweden) during transcutaneous iontophoresis on the hairless back of the animals with a 1.2cm² electrode. Endothelium-dependent tests were assessed by iontophoresis of a 2% Ach solution (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) with an anodal current application of 100 µA for 10min. Endothelium-independent test was assessed by iontophoresis of a 2% Sodium Nitroprusside solution (Nitriate; SERB, Paris, France) with a cathodal current application of 100 µA for 10min. Data were digitized, stored on a computer, and analysed offline with signal processing software (PimSoft v1.5.4.8078, Perimed, Järfälla, Sweden). Baselines were expressed as arbitrary perfusion units (APUs) and vasodilatory responses as percent increase of respective baseline (%BL). Iontophoretic dose is defined as current multiplied by time of application Dose (µA/second) =current (µA) x time (seconds), and the amount of drug delivered is directly proportional to the iontophoretic dose applied{Citation}.

Wound area assessment

The healed ulcer was evaluated by daily examinations of photos taken with a digital camera with 14mm²-diameter ring placed around the ulcer to have a size reference. Analyses were made with ImageJ and were expressed as wound area (mm²) and percentage of wound healing with reference on the first day of treatment (at Day 0 for EW and depending of the maximal size ulcer for PU, around D19±2d).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 13.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL). The data are expressed as the mean ± SD. We used a general linear model for the wound healing analysis for 10% hypoxia, with D19-ulcer-size as covariate, and a non-parametric test, Kruskal-Wallis, for wound healing analysis for 5% hypoxia (non-normal distribution) and vascular reactivity test. A p-value of 0.05 or less was considered statistically significant.

RESULTS

Chronic intermittent hypoxia impairs wound healing in PU model

To investigate if hypoxia has an impact on wound healing, we assessed the wound healing percentage that is the wound area with respect to the maximum ulcer area from the day of ulcer formation until the day of complete re-epithelialization. In the PU model, wound healing percentage curve is divided into two phases, wound formation phase (from day 14 until day 19) and wound healing phase (day 19 until complete day 32) (Figure 3). There was no differences= in wound formation between groups (p=0.085). We observed that chronic intermittent hypoxia impairs wound healing delay (p=0.006). Wound healing was significantly impaired in the HH group in comparison with control group NN (644.1 ± 177 vs 834.2 ± 68%BL.day; p=0.003) but not with the treated group HN (752.4 ± 100%BL.day, p=0.129). There was a significant difference between the treated group HN and the control group NN (p=0.045). After 32 days of Hypoxia or Normoxia exposure (Figure 3), wound healing reached about 78 ±13 % (n=10) in the HH group, whereas the %WH reached approximately 87 ± 4 % (n=12) in HN group and 92 ±3 % (n=14) in the control group.

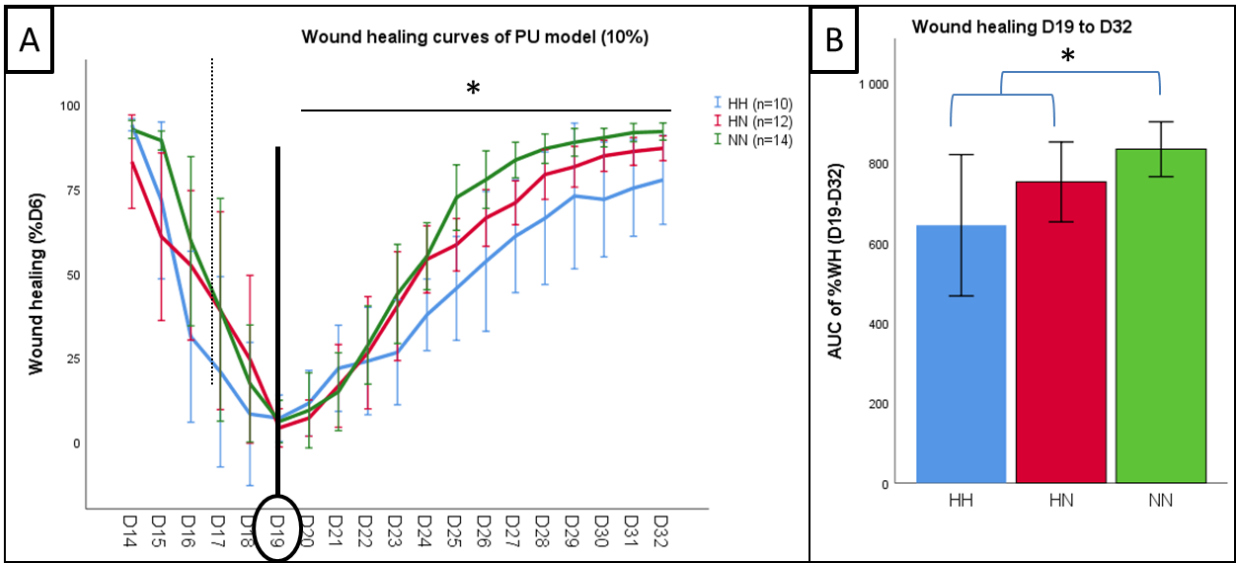


*Figure 3. On the left, wound healing percentage in BKS mice exposed to Hypoxia (HH) in comparison with the treated (HN) and the control group (NN) from the day of ulcer formation until re-epithelialization. On the right, AUC of wound healing percentage of groups from day 19 until day 32. *p=0.006*

Furthermore, we have noticed at the beginning of the experiment that CIH (5% Fi02, 21 Fi02) aggravated the ulcers in comparison with those treated with Normoxia and the control group, and it was demonstrated by the fusion of the ulcers (Figure 4). But the statistical analyses of the AUC of the ulcer size during the wound formation phase did not support our results (p=0.119).

Concerning EW model, mice were removed early from the study due to signs of distress and suffering. We can only hypothesize that ulceration of the mice and the hypoxia/normoxia exposure had an effect on the survival of the mice. Indeed, a 5% intermittent hypoxia is probably an excessive hypoxic stress for this ulcer model.

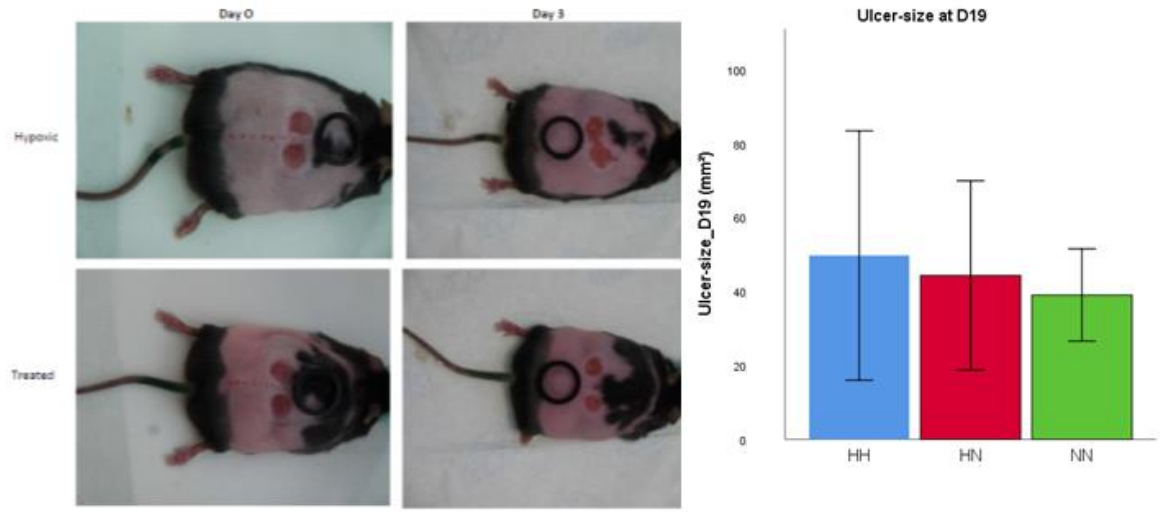


Figure 4: On the left, BKS Mouse of HH group showing ulcer fusion 3 days after ulcer formation, whereas BKS HN mouse showing normal ones. On the right, AUC of ulcer area of the 3 groups from day 14 until day 18

CIH seems to not affect the endothelial function of the diabetic mice

To assess if CIH has any effects on endothelial-dependent and independent function in the BKS mice, we studied the vascular reactivity function of the healthy skin after complete re-epithelization of the three groups. At the end of the experiments, the results show that there were no significant differences of the vasodilation responses of Ach and SNP between the three groups (Ach: p=0,43 and SNP : p=0.64, respectively) (Figure 5).

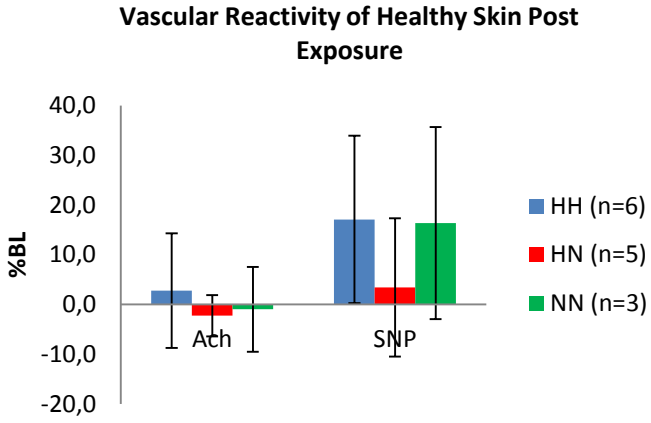


Figure 5 : Vascular reactivity response of Ach and SNP of the healthy skin after hypoxia exposure. Data are expressed as the percentage of the Baseline.

Hypoxia intensity impact wound healing delay

After the interruption of the EW protocol, we tested if the hypoxia severity could have an impact on wound healing delay. We expose mice with a PU model to a 10% hypoxia following the same study design. Analysis of variance of AUC of wound healing phase, showed no difference between groups (HH: 762.5 ± 107; HN: 786.2 ± 51; NN: 834.2 ± 68; p=0.155) (Figure 6).

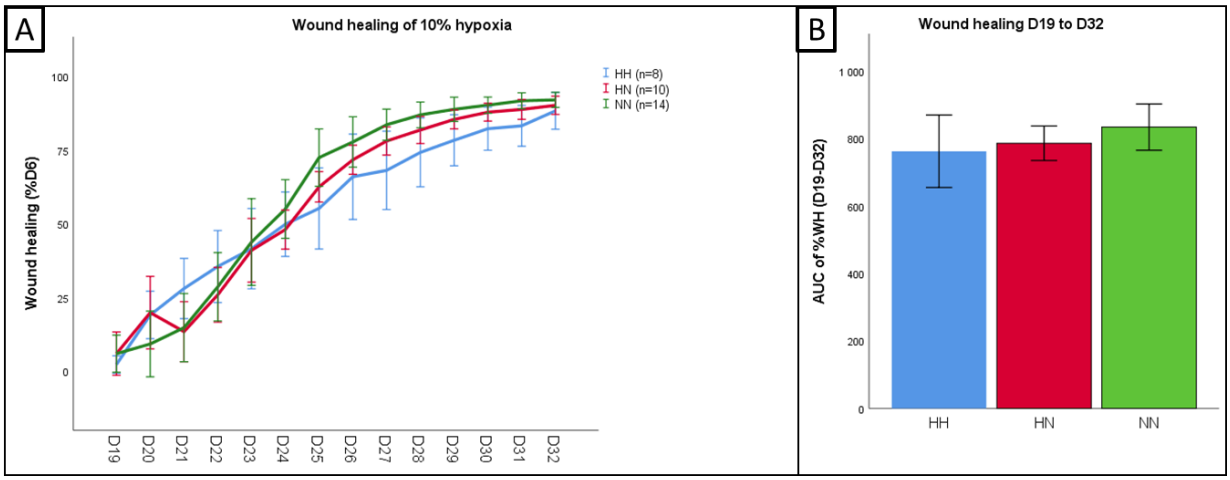


Figure 6: Wound healing percentage from D19 to D32 during n 10% hypoxia exposure.
A) Curves of wound healing, B) AUC of D19-D32 wound healing percentage.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report identifying a novel association between OSA and wound healing in patients with T2DM which was done on an animal model. In the present study, we demonstrate that CIH impairs wound healing in diabetic mice. Although it was clear by the fusion of ulcers that CIH aggravates the occurrence of the ulcer, our statistical analyses did not support this hypothesis. Moreover, come back to normoxie after ulcer creation doesn't improve statistically the wound healing delay. However, it's interesting thought that HN wound healing curve tend to the NN curve.

There are several possible explanations for the wound healing impairment in patients with obstructive sleep apnea. Oxygen supply is important for cell metabolism and energy production. Poor tissue perfusion and oxygen supply due to microvascular and macrovascular diseases, such as Diabetes, create a hypoxic wound and impair the healing process[22], and this hence may further be worsened due to intermittent hypoxia. In normal cutaneous wounds,

HIF-1; which is considered to be the master regulator oxygen hemostasis; is important for enhancement of appropriate inflammatory and angiogenic responses[25], leading to a proper healing process. Studies suggest that impaired healing in chronic ischemic wounds is partly caused by defective HIF-1 signaling and a reduced ability to respond to local tissue hypoxia[24]. Furthermore, there is considerable evidence that HIF-1 signaling is impaired in diseases that have wound healing impairment such as diabetes, and aging[31]. However, the role of HIF-1a remains controversial in OSA studies[32,33]. IH induced an increase in HIFa protein levels as an adaptive response to OSA[31]. On the other hand, some studies showed no change in HIF1a levels in response to OSA[34]. Thus, in order to further understand the underlying mechanism between wound healing, diabetes and OSA, we plan to quantify HIF1a from the biopsies that were taken from our three groups.

The best model for wound healing is the human model. Although mice are widely used for wound healing studies and they represent an economical animal model that can be genetically manipulated for mechanistic investigation[35], they heal differently to human's, primarily due to the process of contraction caused by the panniculus carnosus that is largely absent in humans[36], making this model a limitation for our study. Another limitation of the study was the number of animals used in the control group. Because of the high levels of stress, frequent vigorous fighting and ulcer-biting occurred between the male mice, which transformed the wounds from PU into EW, thus, they were excluded from the study. Although both OSA and diabetes affect the endothelial function, our results do not support this alteration for this type of study as LDI depends on several parameters which can lead to variations in the results[37].

In summary, in this study we have developed a new model that showed that OSA impaired wound healing in diabetic mice. Even though, it was clear by the fusion of the ulcers that CIH aggravated wounds in diabetes, our statistical analyses of the days of ulcer formation did not support our hypothesis. Hence, further studies are required to see the exact less hypoxia stress effect and to evaluated mechanisms involved in the modulation.

GRANTS

This work was funded by a grant from the Fonds de dotation « Agir pour les Maladies Chroniques » (2017).

DISCLOSURES

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NK, YS, and RB conducted the experiments and collected the data. NK, YS, and MR analyzed the data. MR, JLC, and DGR designed the study. All authors critically reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr. Dominique Sigaudo-roussel from LBTi laboratory of Lyon for technical and scientific advice.

We thank Ms Sandrine Brasseur for technical assistance, and Ms Audrey Pfrimmer for administrative assistance.

REFERENCES

1. Brem, H. & Tomic-Canic, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J. Clin. Invest.* **117**, 1219–1222 (2007).
2. McNeely, M. J. *et al.* The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration. How great are the risks? *Diabetes Care* **18**, 216–219 (1995).
3. Kalani, M., Brismar, K., Fagrell, B., Ostergren, J. & Jörneskog, G. Transcutaneous oxygen tension and toe blood pressure as predictors for outcome of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* **22**, 147–151 (1999).
4. Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 373–384 (2013).

5. Caselli, A., Rich, J., Hanane, T., Uccioli, L. & Veves, A. Role of C-nociceptive fibers in the nerve axon reflex-related vasodilation in diabetes. *Neurology* **60**, 297–300 (2003).
6. Veves, A. *et al.* Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes* **47**, 457–463 (1998).
7. Roustit, M., Loader, J., Baltzis, D., Zhao, W. & Veves, A. Microvascular changes in the diabetic foot. in *The Diabetic Foot* (Springer, in press.).
8. Gallagher, K. A. *et al.* Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1α. *J. Clin. Invest.* **117**, 1249–1259 (2007).
9. Drager, L. F., Togeiro, S. M., Polotsky, V. Y. & Lorenzi-Filho, G. Obstructive Sleep Apnea: A Cardiometabolic Risk in Obesity and the Metabolic Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 569–576 (2013).
10. Levy, B. I. *et al.* Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* **118**, 968–76 (2008).
11. West, S. D., Nicoll, D. J. & Stradling, J. R. Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes. *Thorax* **61**, 945–950 (2006).
12. Foster, G. D. *et al.* Obstructive Sleep Apnea Among Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **32**, 1017–1019 (2009).
13. Kendzerska, T., Gershon, A. S., Hawker, G., Tomlinson, G. & Leung, R. S. Obstructive Sleep Apnea and Incident Diabetes. A Historical Cohort Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 218–225 (2014).
14. Tahrani, A. A. *et al.* Obstructive Sleep Apnea and Diabetic Neuropathy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 434–441 (2012).
15. Andrews, K. L. *et al.* The effect of obstructive sleep apnea on amputation site healing. *J. Vasc. Nurs.* **30**, 61–63 (2012).

16. Sano, H. & Ichioka, S. Influence of oxygen on wound healing dynamics in healing-impaired diabetic mice. *J. Plast. Surg. Hand Surg.* 1–6 (2014). doi:10.3109/2000656X.2014.964723
17. Dematteis, M. *et al.* Cardiovascular Consequences of Sleep-Disordered Breathing: Contribution of Animal Models to Understanding of the Human Disease. *ILAR J.* **50**, 262–281 (2009).
18. Dematteis, M. *et al.* Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 227–235 (2008).
19. Meslier, N. *et al.* Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur. Respir. J.* **22**, 156–160 (2003).
20. Heinzer, R. *et al.* Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir. Med.* **3**, 310–318 (2015).
21. Louis, M. & Punjabi, N. M. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **106**, 1538–1544 (2009).
22. Baltzis, D., Eleftheriadou, I. & Veves, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv. Ther.* 1–20 (2014). doi:10.1007/s12325-014-0140-x
23. Budhiraja, R., Tuder, R. M. & Hassoun, P. M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* **109**, 159–65 (2004).
24. Botusan, I. R. *et al.* Stabilization of HIF-1α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19426–19431 (2008).
25. Hong, W. X. *et al.* The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv. Wound Care* **3**, 390–399 (2014).
26. Arnaud, C. *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 724–731 (2011).
27. Stadler, I., Zhang, R.-Y., Oskoui, P., Whittaker, M. B. S. & Lanzafame, R. J. Development of a Simple, Noninvasive, Clinically Relevant Model of Pressure Ulcers in the Mouse. *J. Invest. Surg.* **17**, 221–227 (2004).

28. Roustit, M., Hellmann, M., Cracowski, C., Blaise, S. & Cracowski, J. L. Sildenafil increases digital skin blood flow during all phases of local cooling in primary Raynaud's phenomenon. *Clin. Pharmacol. Ther.* **91**, 813–819 (2012).
29. Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Godin-Ribuot, D. & Cracowski, J.-L. Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *Eur. J. Pharm. Sci.* **72**, 21–26 (2015).
30. Turner, J., Belch, J. J. F. & Khan, F. Current Concepts in Assessment of Microvascular Endothelial Function Using Laser Doppler Imaging and Iontophoresis. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 109–116 (2008).
31. Thangarajah, H. *et al.* The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13505–13510 (2009).
32. Toffoli, S. *et al.* Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis* **12**, 47–67 (2009).
33. Testelmans, D. *et al.* Profile of circulating cytokines: impact of OSA, obesity and acute cardiovascular events. *Cytokine* **62**, 210–216 (2013).
34. Ryan, S., Taylor, C. T. & McNicholas, W. T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* **112**, 2660–2667 (2005).
35. Grose, R. & Werner, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol. Biotechnol.* **28**, 147–166 (2004).
36. Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T. & Gurtner, G. C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 969618 (2011).
37. Greco, A. *et al.* Repeatability, reproducibility and standardisation of a laser Doppler imaging technique for the evaluation of normal mouse hindlimb perfusion. *Sensors* **13**, 500–515 (2012).

Références

1. Eckert, R. L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* **69**, 1316–1346 (1989).
2. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol. EJD* **12**, 390–399; quiz 400–401 (2002).
3. Encyclopédie Larousse en ligne - Structure de la peau. Available at: https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Structure_de_la_peau/1001996. (Accessed: 6th December 2018)
4. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J.-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063–1072 (2008).
5. Elias, P. M. The skin barrier as an innate immune element. *Semin. Immunopathol.* **29**, 3–14 (2007).
6. Bangert, C., Brunner, P. M. & Stingl, G. Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.* **29**, 360–376 (2011).
7. Chéry-Croze, S. Painful sensation induced by a thermal cutaneous stimulus: *Pain* **17**, 109–137 (1983).
8. Delmas, P., Hao, J. & Rodat-Despoix, L. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 139–153 (2011).
9. Voets, T. *et al.* The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748–754 (2004).
10. Downey, J. A., Huckaba, C. E. & Darling, R. C. The effect of skin and central cooling on human thermoregulation. *Int. J. Biometeorol.* **15**, 171–175 (1971).
11. Avram, A. S., Avram, M. M. & James, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 671–683 (2005).
12. Holick, M. F. Vitamin D: A millenium perspective. *J. Cell. Biochem.* **88**, 296–307 (2003).
13. Westerhof, W. Evolutionary, Biologic, and Social Aspects of Skin Color. *Dermatol. Clin.* **25**, 293–302 (2007).

14. Lavker, R. Hair follicle stem cells.

15. Gurdip S. Sidhu, Nicholas D. Cassai. Composite Keratohyaline Granules in Striate Keratoderma. *Ultrastruct. Pathol.* **24**, 391–397 (2000).

16. Norlén, L. Stratum corneum keratin structure, function and formation - a comprehensive review: A review of stratum corneum keratin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **28**, 397–425 (2006).

17. Ferraq, Y. Développement d'un modèle de cicatrisation épidermique après une désépidermisation laser. (Toulouse 3, 2007).

18. Duplan-Perrat, F. *et al.* Keratinocytes Influence the Maturation and Organization of the Elastin Network in a Skin Equivalent11The authors declared in writing to have no conflict of interest. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 365–370 (2000).

19. Coulomb, B., Lebreton, C. & Dubertret, L. Influence of Human Dermal Fibroblasts on Epidermalization. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 122–125 (1989).

20. Panse, R. L., Bouchard, B., Lebreton, C. & Coulomb, B. Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. *Exp. Dermatol.* **5**, 108–114 (1996).

21. Smith, L. T., Holbrook, K. A. & Madri, J. A. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am. J. Anat.* **175**, 507–521 (1986).

22. Hern & Mortimer. Visualization of dermal blood vessels - capillaroscopy. *Clin. Exp. Dermatol.* **24**, 473–478 (1999).

23. Lochner, K. *et al.* Expression of decorin and collagens I and III in different layers of human skin in vivo: a laser capture microdissection study. *Biogerontology* **8**, 269–282 (2007).

24. Silver, F. H., Freeman, J. W. & DeVore, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. *Skin Res. Technol.* **7**, 18–23 (2001).

25. Prigent, F. [The hypodermis belongs to the skin]. *Ann. Dermatol. Venereol.* **129**, 1053 (2002).

26. Misery, L. *et al.* Neuropathic pruritus. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 408–416 (2014).

27. Munger, B. L. & Idez, C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch. Histol. Cytol.* **51**, 1–34 (1988).

28. Begey, A. Rôle du tissu adipeux dermique dans l'apparition de lésions cutanées dans l'obésité. (2018).

29. Nakatani, M., Maksimovic, S., Baba, Y. & Lumpkin, E. A. Mechanotransduction in epidermal Merkel cells. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **467**, 101–108 (2015).

30. Nolano, M. *et al.* Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. *Ann. Neurol.* **54**, 197–205 (2003).

31. Universalis, E. PEAU. *Encyclopædia Universalis* Available at: http://www.universalis.fr/encyclopedie/peau/. (Accessed: 11th October 2018)

32. Braverman, I. M. The Cutaneous Microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **5**, 3–9 (2000).

33. Minson, C. T. Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *J. Appl. Physiol.* **109**, 1239–1246 (2010).

34. Bandini, A. *et al.* Effect of local blood flow in thermal regulation in diabetic patient. *Microvasc. Res.* **88**, 42–47 (2013).

35. Fromy, B., Lingueglia, E., Sigaudo-Roussel, D., Saumet, J. L. & Lazdunski, M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat. Med.* **18**, 1205–1207 (2012).

36. Cracowski, J.-L. & Roustit, M. Current Methods to Assess Human Cutaneous Blood Flow: An Updated Focus on Laser-Based-Techniques. *Microcirculation* **23**, 337–344 (2016).

37. Thijssen, D. H. J. *et al.* Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **300**, H2–H12 (2011).

38. Démarchez, M. Biologie de la peau. *https://biologiedelapeau.fr* (2018). Available at: http://biologiedelapeau.fr/spip.php?page=forum&id_article=29&id_forum=219. (Accessed: 26th November 2018)

39. Sakai, T. & Hosoyamada, Y. Are the precapillary sphincters and metarterioles universal components of the microcirculation? An historical review. *J. Physiol. Sci.* **63**, 319–331 (2013).

40. Sangiorgi, S. *et al.* The Cutaneous Microvascular Architecture of Human Diabetic Toe Studied by Corrosion Casting and Scanning Electron Microscopy Analysis. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **293**, 1639–1645 (2010).

41. Mulvany, M. J. & Aalkjaer, C. Structure and function of small arteries. *Physiol. Rev.* **70**, 921–961 (1990).

42. Oaklander, A. L. & Siegel, S. M. Cutaneous innervation: Form and function. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 1027–1037 (2005).

43. Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 373–384 (2013).

44. Elliott, M. B. & Gerecht, S. Three-dimensional culture of small-diameter vascular grafts. *J. Mater. Chem. B* **4**, 3443–3453 (2016).

45. Dulmovits, B. M. & Herman, I. M. Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1800–1812 (2012).

46. Paquet-Fifield, S. *et al.* A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J. Clin. Invest.* (2009). doi:10.1172/JCI38535

47. Hill, M. A., Meininger, G. A., Davis, M. J. & Laher, I. Therapeutic potential of pharmacologically targeting arteriolar myogenic tone. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 363–374 (2009).

48. Caterina, M. J. & Julius, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487–517 (2001).

49. Caterina, M. J. & Schumacher, M. A. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **389**, 9 (1997).

50. Garry, A. *et al.* Cellular mechanisms underlying cutaneous pressure-induced vasodilation: in vivo involvement of potassium channels. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **289**, H174–H180 (2005).

51. Hellsten, Y., Nyberg, M., Jensen, L. G. & Mortensen, S. P. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *J. Physiol.* **590**, 6297–6305 (2012).

52. Fleming, I. & Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**, R1-12 (2003).

53. Félétou, M., Huang, Y. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products: COX-1, COX-2 and endothelial dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 894–912 (2011).

54. Bellien, J., Joannides, R., Richard, V. & Thuillez, C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: A promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol. Ther.* **131**, 1–17 (2011).

55. Vanhoutte, P. M., Rubanyi, G. M., Miller, V. M. & Houston, D. S. Modulation of Vascular Smooth Muscle Contraction by the Endothelium. 18

56. Clark, M. G. Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E732-750 (2008).

57. de Jongh, R. T., Serné, E. H., IJzerman, R. G., de Vries, G. & Stehouwer, C. D. A. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation* **109**, 2529–2535 (2004).

58. Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).

59. Baron, A. D. Hemodynamic actions of insulin. *Am. J. Physiol.* **267**, E187-202 (1994).

60. Baron, A. D. Cardiovascular actions of insulin in humans. Implications for insulin sensitivity and vascular tone. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **7**, 961–987 (1993).

61. Campia, U., Tesauro, M. & Cardillo, C. Human obesity and endothelium-dependent responsiveness: Obesity and endothelium. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 561–573 (2012).

62. Huang, P. L. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 295–302 (2009).

63. Laakso, M., Edelman, S. V., Brechtel, G. & Baron, A. D. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **85**, 1844–1852 (1990).

64. Kim, J., Montagnani, M., Koh, K. K. & Quon, M. J. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Molecular and Pathophysiological Mechanisms. *Circulation* **113**, 1888–1904 (2006).

65. De Boer, M. P. *et al.* Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Microcirc. N. Y. N 1994* **19**, 5–18 (2012).

66. Singer, G. & Granger, D. N. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirc. N. Y. N 1994* **14**, 375–387 (2007).

67. Stapleton, P. A., James, M. E., Goodwill, A. G. & Frisbee, J. C. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* **15**, 79–89 (2008).

68. Levy, B. I. *et al.* Impaired Tissue Perfusion: A Pathology Common to Hypertension, Obesity, and Diabetes Mellitus. *Circulation* **118**, 968–976 (2008).

69. Allen, J. & Howell, K. Microvascular imaging: techniques and opportunities for clinical physiological measurements. *Physiol. Meas.* **35**, R91–R141 (2014).

70. Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Non-invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight Into Methods: Methods to Assess Skin Microvascular Function. *Microcirculation* **19**, 47–64 (2012).

71. Herrick, A. L. & Cutolo, M. Clinical implications from capillaroscopic analysis in patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2595–2604 (2010).

72. Dinsdale, G. *et al.* Nailfold capillaroscopy—how many fingers should be examined to detect abnormality? 5

73. Roustit, M. & Cracowski, L. La microcirculation cutanée : Exploration et perspectives thérapeutiques. 33

74. Stern, M. D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* **254**, 56–8 (1975).

75. Roustit, M., Millet, C., Blaise, S., Dufournet, B. & Cracowski, J. L. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvasc. Res.* **80**, 505–511 (2010).

76. Laser Doppler Monitoring - Perimed AB. Available at: https://www.perimed-instruments.com/laser-doppler-monitoring. (Accessed: 18th October 2018)

77. Daly, S. M. & Leahy, M. J. ' *Go with the flow* ': A review of methods and advancements in blood flow imaging. *J. Biophotonics* **6**, 217–255 (2013).

78. O'Doherty, J., McNamara, P., Clancy, N. T., Enfield, J. G. & Leahy, M. J. Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J Biomed Opt* **14**, 034025 (2009).

79. Cutolo, M. *et al.* Is laser speckle contrast analysis (LASCA) the new kid on the block in systemic sclerosis? A systematic literature review and pilot study to evaluate reliability of LASCA to measure peripheral blood perfusion in scleroderma patients. *Autoimmun. Rev.* **17**, 775–780 (2018).

80. Yip, W. L. Evaluation of the clinimetrics of transcutaneous oxygen measurement and its application in wound care: Evaluation of the clinimetrics of transcutaneous oxygen measurement. *Int. Wound J.* **12**, 625–629 (2015).

81. Oxymétrie transcutanée - tcpO2 - Perimed France S.A.R.L. Available at: http://www.perimed-instruments.com/fr/oxymetrie-transcutanee-tcpo2. (Accessed: 18th October 2018)

82. Cracowski, J.-L., Minson, C. T., Salvat-Melis, M. & Halliwill, J. R. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 503–508 (2006).

83. Cheng, C., Daskalakis, C. & Falkner, B. Non-invasive Assessment of Microvascular and Endothelial Function. *J. Vis. Exp.* (2013). doi:10.3791/50008

84. Medow, M. S., Taneja, I. & Stewart, J. M. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase dependence of cutaneous reactive hyperemia in humans. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **293**, H425–H432 (2007).

85. Larkin, S. W. & Williams, T. J. Evidence for sensory nerve involvement in cutaneous reactive hyperemia in humans. *Circ Res* **73**, 147–54 (1993).

86. Lorenzo, S. & Minson, C. T. Human cutaneous reactive hyperaemia: role of BK_{Ca} channels and sensory nerves: Mechanisms of reactive hyperaemia in skin. *J. Physiol.* **585**, 295–303 (2007).

87. Cracowski, J.-L. *et al.* Involvement of cytochrome epoxygenase metabolites in cutaneous postocclusive hyperemia in humans. *J. Appl. Physiol.* **114**, 245–251 (2013).

88. Cracowski, J.-L., Lorenzo, S. & Minson, C. T. Effects of local anaesthesia on subdermal needle insertion pain and subsequent tests of microvascular function in human. *Eur. J. Pharmacol.* **559**, 150–154 (2007).

89. Wong, B. J., Wilkins, B. W., Holowatz, L. A. & Minson, C. T. Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation. *J. Appl. Physiol.* **95**, 504–510 (2003).

90. Zhao, J. L., Pergola, P. E., Roman, L. J. & Kellogg, D. L. Bioactive nitric oxide concentration does not increase during reactive hyperemia in human skin. *J Appl Physiol* **96**, 628–32 (2004).

91. Fromy, B. *et al.* Aging-Associated Sensory Neuropathy Alters Pressure-Induced Vasodilation in Humans. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 849–855 (2010).

92. Pasche, A., Heim, A., Liaudet, L., Waeber, B. & Feihl, F. No Implication of Thromboxane Prostanoid Receptors in Reactive Hyperemia of Skin and Skeletal Muscle in Human Forearm: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **61**, 127–132 (2013).

93. Wong, B. J. & Fieger, S. M. Transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV-1) channels contribute to cutaneous thermal hyperaemia in humans: TRPV-1 channels and local skin heating. *J. Physiol.* **588**, 4317–4326 (2010).

94. Johnson, J. M. & Kellogg, D. L. Local thermal control of the human cutaneous circulation. *J. Appl. Physiol.* **109**, 1229–1238 (2010).

95. Arildsson, M., Asker, C. L., Salerud, E. G. & Strömberg, T. Skin Capillary Appearance and Skin Microvascular Perfusion Due to Topical Application of Analgesia Cream. *Microvasc. Res.* **59**, 14–23 (2000).

96. Minson, C. T., Berry, L. T. & Joyner, M. J. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J. Appl. Physiol.* **91**, 1619–1626 (2001).

97. Brunt, V. E. & Minson, C. T. Cutaneous thermal hyperemia: more than skin deep. *J. Appl. Physiol.* **111**, 5–7 (2011).

98. Minson, C. T., Holowatz, L. A., Wong, B. J., Kenney, W. L. & Wilkins, B. W. Decreased nitric oxide- and axon reflex-mediated cutaneous vasodilation with age during local heating. *J. Appl. Physiol.* **93**, 1644–1649 (2002).

99. Kellogg, D. L., Liu, Y., Kosiba, I. F. & O'Donnell, D. Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J. Appl. Physiol.* **86**, 1185–1190 (1999).

100. Brunt, V. E. & Minson, C. T. KCa channels and epoxyeicosatrienoic acids: major contributors to thermal hyperaemia in human skin: KCa channels and EETs in cutaneous local heating. *J. Physiol.* **590**, 3523–3534 (2012).

101. McCord, G. R., Cracowski, J.-L. & Minson, C. T. Prostanoids contribute to cutaneous active vasodilation in humans. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R596–R602 (2006).

102. Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J. & Guy, R. H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 619–658 (2004).

103. Tesselaar, E. & Sjöberg, F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvasc. Res.* **81**, 88–96 (2011).

104. Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J. Clin. Invest.* **107**, 23–25 (2001).

105. Fromy, B., Abraham, P. & Saumet, J.-L. Non-nociceptive capsaicin-sensitive nerve terminal stimulation allows for an original vasodilatory reflex in the human skin. *Brain Res.* **811**, 166–168 (1998).

106. Fromy, B., Merzeau, S., Abraham, P. & Saumet, J.-L. Mechanisms of the cutaneous vasodilator response to local external pressure application in rats: involvement of CGRP, neurokinins, prostaglandins and NO. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1161–1171 (2000).

107. Sigaudo-Roussel, D. *et al.* Early Endothelial Dysfunction Severely Impairs Skin Blood Flow Response to Local Pressure Application in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Diabetes* **53**, 1564–1569 (2004).

108. Koitka, A. *et al.* Impaired Pressure-Induced Vasodilation at the Foot in Young Adults With Type 1 Diabetes. *Diabetes* **53**, 721–725 (2004).

109. Begey, A.-L. *et al.* Cutaneous and renal vasodilatory response to local pressure application: A comparative study in mice. *Microvasc. Res.* **115**, 44–51 (2018).

110. Withrington, P. G. The actions of two sensory neuropeptides, substance P and calcitonin gene-related peptide, on the canine hepatic arterial and portal vascular beds. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 296–302 (1992).

111. Gaubert, M. L. *et al.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J. Physiol.* **585**, 617–626 (2007).

112. Gosain, A. & DiPietro, L. A. Aging and Wound Healing. *World J. Surg.* **28**, 321–326 (2004).

113. Enoch, S. & Leaper, D. J. Basic science of wound healing. 6 (2005).

114. Zucker, M. B. Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats. *Am. J. Physiol.* **148**, 275–288 (1947).

115. Brass, L. F., Zhu, L. & Stalker, T. J. Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *J. Clin. Invest.* **115**, 3385–3392 (2005).

116. Furie, B. & Furie, B. C. In vivo thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 12–17

117. Young, A. & McNaught, C.-E. The physiology of wound healing. *Surg. Oxf.* **29**, 475–479 (2011).

118. Beldon, P. Basic science of wound healing. *Surg. Oxf.* **28**, 409–412 (2010).

119. Wolberg, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* **21**, 131–142 (2007).

120. Thompson, W. D., Stirk, C. M., Melvin, W. T. & Smith, E. B. Plasmin, fibrin degradation and angiogenesis. *Nat. Med.* **2**, 493 (1996).

121. Kooistra, T., Schrauwen, Y., Arts, J. & Emeis, J. J. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int. J. Hematol.* **59**, 233–255 (1994).

122. Myohanen, H. & Vaheri, A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2840–2858 (2004).

123. Nagase, H. & Woessner, J. F. Matrix Metalloproteinases. *Matrix Met.* 5

124. de Boer, J. P. *et al.* Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect. Immun.* **61**, 5035–5043 (1993).

125. Carpenter, S. L. & Mathew, P. α2-Antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance: REVIEW OF α2-ANTIPLASMIN DEFICIENCY. *Haemophilia* **14**, 1250–1254 (2008).

126. Saksela, O., Hovi, T. & Vaheri, A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *J. Cell. Physiol.* **122**, 125–132 (1985).

127. Li, W.-Y., Chong, S. S. N., Huang, E. Y. & Tuan, T.-L. Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing? *Wound Repair Regen.* **11**, 239–247 (2003).

128. Sallé, A. Le pied du diabétique, un pied à risque élevé de plaies. (2010).

129. Hart, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *J. Wound Care* **11**, 205–209 (2002).

130. Werner, S. & Grose, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol. Rev.* **83**, 835–870 (2003).

131. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).

132. Singer, A. J. Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* 9 (1999).

133. Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M. & Bayat, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **72**, 206–217 (2013).

134. Lobmann, R. *et al.* Differential effects of PDGF-BB on matrix metalloproteases and cytokine release in fibroblasts of Type 2 diabetic patients and normal controls in vitro. *J. Diabetes Complications* **20**, 105–112 (2006).

135. Hinz, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 526–537 (2007).

136. Lobmann, R., Schultz, G. & Lehnert, H. Proteases and the Diabetic Foot Syndrome: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Diabetes Care* **28**, 461–471 (2005).

137. Lucas, T. *et al.* Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J. Immunol.* **184**, 3964–3977 (2010).

138. Berry, D. P., Harding, K. G., Stanton, M. R., Jasani, B. & Ehrlich, P. H. Human Wound Contraction: Collagen Organization, Fibroblasts, and Myofibroblasts: *Plast. Reconstr. Surg.* **102**, 132–134 (1998).

139. Krawczyk, W. S. A PATTERN OF EPIDERMAL CELL MIGRATION DURING WOUND HEALING. *J. Cell Biol.* **49**, 247–263 (1971).

140. Pang, S. C., Daniels, W. H. & Buck, R. C. Epidermal migration during the healing of suction blisters in rat skin: A scanning and transmission electron microscopic study. *Am. J. Anat.* **153**, 177–191 (1978).

141. Usui, M. L. *et al.* Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound Repair Regen.* **13**, 468–479 (2005).

142. Buck, R. C. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **18**, 767–784 (1979).

143. Laplante, A. F., Germain, L., Auger, F. A. & Moulin, V. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 2377–2389 (2001).

144. Ortonne, J. P., Löning, T., Schmitt, D. & Thivolet, J. Immunomorphological and ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **392**, 217–230 (1981).

145. Winter, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* **193**, 293–294 (1962).

146. Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev. Cell* **14**, 818–829 (2008).

147. Mirza, R., DiPietro, L. A. & Koh, T. J. Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice. *Am. J. Pathol.* **175**, 2454–2462 (2009).

148. Diegelmann, R., F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* **9**, 283 (2004).

149. Hoffman, M. *et al.* Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood* **108**, 3053–3060 (2006).

150. Hachulla, E. & Mouthon, L. PNDS 2017 - Sclérodermie systémique. (2017).

151. Meyer, A. *et al.* Brief Report: Spatial Heterogeneity of Systemic Sclerosis in France: High Prevalence in the Northeast Region. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1731–1737 (2016).

152. Chifflot, H., Fautrel, B., Sordet, C., Chatelus, E. & Sibilia, J. Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review. *Semin. Arthritis Rheum.* **37**, 223–235 (2008).

153. Asano, Y. & Sato, S. Vasculopathy in scleroderma. *Semin. Immunopathol.* **37**, 489–500 (2015).

154. Stern, E. P. & Denton, C. P. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **41**, 367–382 (2015).

155. McFarlane, I. M. *et al.* Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. *Rheumatol. Sunnyvale Calif* **8**, (2018).

156. Elhai, M., Avouac, J., Kahan, A. & Allanore, Y. Systemic sclerosis: Recent insights. *Joint Bone Spine* **82**, 148–153 (2015).

157. van den Hoogen, F. *et al.* Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An ACR-EULAR Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum.* **65**, 2737–2747 (2013).

158. Walker, U. A. *et al.* Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 754–763 (2007).

159. Amanzi, L. *et al.* Digital ulcers in scleroderma: staging, characteristics and sub-setting through observation of 1614 digital lesions. *Rheumatology* **49**, 1374–1382 (2010).

160. Hachulla, E. *et al.* Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J. Rheumatol.* **34**, 2423–2430 (2007).

161. Steen, V., Denton, C. P., Pope, J. E. & Matucci-Cerinic, M. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology* **48**, iii19–iii24 (2009).

162. Francès, C. *et al.* Prise en charge des ulcères digitaux de la sclérodermie systémique. *Presse Médicale* **37**, 271–285 (2008).

163. Allanore, Y. Physiopathologie de la sclérodermie systémique. *médecine/sciences* **32**, 183–191 (2016).

164. Christmann, R. B. *et al.* Association of Interferon- and Transforming Growth Factor β–Regulated Genes and Macrophage Activation With Systemic Sclerosis–Related Progressive Lung Fibrosis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 714–725 (2014).

165. Fuschiotti, P., Larregina, A. T., Ho, J., Feghali-Bostwick, C. & Medsger, T. A. IL-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **65**, 236–246 (2013).

166. Matucci-Cerinic, M., Kahaleh, B. & Wigley, F. M. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis Rheum.* **65**, 1953–1962 (2013).

167. Elhai, M. *et al.* A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 163–169 (2016).

168. Gabrielli, A., Avvedimento, E. V. & Krieg, T. Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1989–2003 (2009).

169. Rabquer, B. J. *et al.* The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **48**, 734–740 (2009).

170. Yamane, K. *et al.* Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **19**, 1566–1571 (1992).

171. Marvi, U. & Chung, L. Digital Ischemic Loss in Systemic Sclerosis. *Int. J. Rheumatol.* **2010**, (2010).

172. Liu, S., Parapuram, S. K. & Leask, A. Brief Report: Fibrosis Caused by Loss of PTEN Expression in Mouse Fibroblasts Is Crucially Dependent on CCN2. *Arthritis Rheum.* **65**, 2940–2944 (2013).

173. Marangoni, R. G. *et al.* Myofibroblasts in Murine Cutaneous Fibrosis Originate From Adiponectin-Positive Intradermal Progenitors. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**, 1062–1073 (2015).

174. Dong, C. *et al.* Deficient Smad7 expression: A putative molecular defect in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3908–3913 (2002).

175. Allanore, Y. *et al.* Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 15002 (2015). doi:10.1038/nrdp.2015.2

176. *Global report on diabetes*. (World Health Organization, 2016).

177. International Diabetes Federation. IDF - Diabetes atlas 2017. (2017).

178. Martini, J. & Senneville, E. MCED - Le pied diabétique. (2018).

179. Rizzoni, D. *et al.* Structural Alterations in Subcutaneous Small Arteries of Normotensive and Hypertensive Patients With Non–Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation* **103**, 1238–1244 (2001).

180. MArin, P., Andersson, B., Krotkiewski, M. & Bjorntorp, P. Muscle Fiber Composition and Capillary Density in Women and Men With NIDDM. *Diabetes Care* **17**, 382–386 (1994).

181. Malik, R. A. *et al.* Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia* **32**, 92–102 (1989).

182. Khodabandehlou, T., Zhao, H., Vimeux, M. & Le Dévéhat, C. The autoregulation of the skin microcirculation in healthy subjects and diabetic patients with and without vascular complications. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **17**, 357–362 (1997).

183. Raskin, P., Pietri, A. O., Unger, R. & Shannon, W. A. J. The Effect of Diabetic Control on the Width of Skeletal-Muscle Capillary Basement Membrane in Patients with Type I Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **309**, 1546–1550 (1983).

184. Kenny, G. P., Stapleton, J. M., Yardley, J. E., Boulay, P. & Sigal, R. J. Older Adults with Type 2 Diabetes Store More Heat during Exercise: *Med. Sci. Sports Exerc.* **45**, 1906–1914 (2013).

185. Carter, M. R., Mcginn, R., Barrera-Ramirez, J., Sigal, R. J. & Kenny, G. P. Impairments in Local Heat Loss in Type 1 Diabetes during Exercise in the Heat: *Med. Sci. Sports Exerc.* **46**, 2224–2233 (2014).

186. McNally, P. G. *et al.* Impaired Contraction and Endothelium-Dependent Relaxation in Isolated Resistance Vessels from Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Clin. Sci.* **87**, 31–36 (1994).

187. Makimattila, S. *et al.* Chronic Hyperglycemia Impairs Endothelial Function and Insulin Sensitivity Via Different Mechanisms in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation* **94**, 1276–1282 (1996).

188. Bouskela, E. *et al.* [Vascular dysfunction in metabolic disorders: evaluation of some therapeutic interventions]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **191**, 475–492; discussion 492-493 (2007).

189. Tibiriçá, E., Rodrigues, E., Cobas, R. & Gomes, M. B. Increased functional and structural skin capillary density in type 1 diabetes patients with vascular complications. *Diabetol. Metab. Syndr.* **1**, 24 (2009).

190. Vinik, A. I. *et al.* Dermal Neurovascular Dysfunction in Type 2 Diabetes. *DIABETES CARE* **24**, 8 (2001).

191. Johnson, J. M., Minson, C. T. & Kellogg, D. L. Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation. in *Comprehensive Physiology* (ed. Terjung, R.) 33–89 (John Wiley & Sons, Inc., 2014). doi:10.1002/cphy.c130015

192. Liao, F. & Jan, Y.-K. Nonlinear dynamics of skin blood flow response to mechanical and thermal stresses in the plantar foot of diabetics with peripheral neuropathy. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **66**, 197–210 (2017).

193. Rayman, G. *et al.* Impaired microvascular hyperaemic response to minor skin trauma in type I diabetes. **292**, 4 (1986).

194. Heimhalt-El Hamriti, M. *et al.* Impaired skin microcirculation in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc. Diabetol.* **12**, 115 (2013).

195. Khan, F., Elhadd, T. A., Greene, S. A. & Belch, J. J. Impaired skin microvascular function in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **23**, 215–220 (2000).

196. Jaap, A. J., Hammersley, M. S., Shore, A. C. & Tooke, J. E. Reduced microvascular hyperaemia in subjects at risk of developing Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **37**, 214–216 (1994).

197. Jan, Y.-K., Shen, S., Foreman, R. D. & Ennis, W. J. Skin blood flow response to locally applied mechanical and thermal stresses in the diabetic foot. *Microvasc. Res.* **89**, 40–46 (2013).

198. Gandecka, A., Araszkiewicz, A., Piłaciński, S., Wierusz-Wysocka, B. & Zozulińska-Ziółkiewicz, D. The relationship between sudomotor function and skin microvascular reactivity in individuals with type 1 diabetes of long duration. *Microvasc. Res.* **120**, 84–89 (2018).

199. Veves, A. *et al.* Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes* **47**, 457–463 (1998).

200. Arora, S. *et al.* Differences in Foot and Forearm Skin Microcirculation in Diabetic Patients With and Without Neuropathy. *Diabetes Care* **21**, 1339–1344 (1998).

201. Emanuel, A. L. *et al.* Relationships Between Type 2 Diabetes, Neuropathy, and Microvascular Dysfunction: Evidence From Patients With Cryptogenic Axonal Polyneuropathy. *Diabetes Care* **40**, 583–590 (2017).

202. Walther, G. *et al.* Metabolic syndrome individuals with and without type 2 diabetes mellitus present generalized vascular dysfunction: cross-sectional study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1022–1029 (2015).

203. de M. Matheus, A. S., Clemente, E. L. S., de Lourdes Guimarães Rodrigues, M., Torres Valença, D. C. & Gomes, M. B. Assessment of microvascular endothelial function in type 1 diabetes using laser speckle contrast imaging. *J. Diabetes Complications* **31**, 753–757 (2017).

204. Rathsman, B., Jensen-Urstad, K. & Nyström, T. Intensified insulin treatment is associated with improvement in skin microcirculation and ischaemic foot ulcer in patients with type 1 diabetes mellitus: a long-term follow-up study. *Diabetologia* **57**, 1703–1710 (2014).

205. Montero, D. *et al.* Vascular smooth muscle function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* **56**, 2122–2133 (2013).

206. Vincent, A. M., Callaghan, B. C., Smith, A. L. & Feldman, E. L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 573–583 (2011).

207. Hao, W. *et al.* Hyperglycemia Promotes Schwann Cell De-differentiation and De-myelination via Sorbitol Accumulation and Igf1 Protein Down-regulation. *J. Biol. Chem.* **290**, 17106–17115 (2015).

208. Rask-Madsen, C. & King, G. L. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* **17**, 20–33 (2013).

209. Malik, R. A. *et al.* Endoneurial localisation of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia* **36**, 454–459 (1993).

210. Østergaard, L. *et al.* The effects of capillary dysfunction on oxygen and glucose extraction in diabetic neuropathy. *Diabetologia* **58**, 666–677 (2015).

211. Sytze Van Dam, P., Cotter, M. A., Bravenboer, B. & Cameron, N. E. Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* **719**, 180–186 (2013).

212. Pop-Busui, R., Sima, A. & Stevens, M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **22**, 257–273 (2006).

213. Constantinescu, A. A., Vink, H. & Spaan, J. A. Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized LDL. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1051-1057 (2001).

214. Toth, C. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGEs) and experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* **57**, 1002–1017 (2008).

215. Kallestrup, M., Møller, H. J., Tankisi, H. & Andersen, H. Soluble CD163 levels are elevated in cerebrospinal fluid and serum in people with Type 2 diabetes mellitus and are associated with impaired peripheral nerve function. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* **32**, 54–61 (2015).

216. Chapouly, C. *et al.* Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **109**, 217–227 (2016).

217. Roustit, M., Loader, J., Baltzis, D., Zhao, W. & Veves, A. Microvascular Changes in the Diabetic Foot. in *The Diabetic Foot* 173–188 (Springer, 2018).

218. Suri, A. & Szallasi, A. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 29–36 (2008).

219. Fromy, B. *et al.* Early Decrease of Skin Blood Flow in Response to Locally Applied Pressure in Diabetic Subjects. *Diabetes* **51**, 1214–1217 (2002).

220. Szabo, C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction: Nitrosative stress and diabetic complications. *Br. J. Pharmacol.* **156**, 713–727 (2009).

221. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).

222. Du, X. *et al.* Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **112**, 1049–1057 (2003).

223. Aiello, L. P. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Retinal Permeability Is Mediated by Protein Kinase C In Vivo and Suppressed by an Orally Effective P-Isoform-Selective Inhibitor. **46**, 8 (1997).

224. Kizub, I. V., Klymenko, K. I. & Soloviev, A. I. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *Int. J. Cardiol.* **174**, 230–242 (2014).

225. Geraldes, P. *et al.* Activation of PKC-δ and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat. Med.* **15**, 1298–1306 (2009).

226. Yokota, T. *et al.* Role of Protein Kinase C on the Expression of Platelet-Derived Growth Factor and Endothelin-1 in the Retina of Diabetic Rats and Cultured Retinal Capillary Pericytes. *Diabetes* **52**, 838–845 (2003).

227. Sethi, A. S., Lees, D. M., Douthwaite, J. A., Dawnay, A. B. & Corder, R. Homocysteine-Induced Endothelin-1 Release Is Dependent on Hyperglycaemia and Reactive Oxygen Species Production in Bovine Aortic Endothelial Cells. *J. Vasc. Res.* **43**, 175–183 (2006).

228. Hempel, A. *et al.* High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ. Res.* **81**, 363–371 (1997).

229. Murakami, T., Frey, T., Lin, C. & Antonetti, D. A. Protein Kinase Cb Phosphorylates Occludin Regulating Tight Junction Trafficking in Vascular Endothelial Growth Factor–Induced Permeability In Vivo. 11

230. Thallas-Bonke, V. *et al.* Inhibition of NADPH Oxidase Prevents Advanced Glycation End Product-Mediated Damage in Diabetic Nephropathy Through a Protein Kinase C- -Dependent Pathway. *Diabetes* **57**, 460–469 (2008).

231. Menne, J. *et al.* Diminished Loss of Proteoglycans and Lack of Albuminuria in Protein Kinase C- --Deficient Diabetic Mice. *Diabetes* **53**, 2101–2109 (2004).

232. Zou, M.-H., Shi, C. & Cohen, R. A. High Glucose via Peroxynitrite Causes Tyrosine Nitration and Inactivation of Prostacyclin Synthase That Is Associated With Thromboxane/Prostaglandin H2 Receptor-Mediated Apoptosis and Adhesion Molecule Expression in Cultured Human Aortic Endothelial Cells. *Diabetes* **51**, 198–203 (2002).

233. Pricci, F. *et al.* Oxidative stress in diabetes-induced endothelial dysfunction involvement of nitric oxide and protein kinase C. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 683–694 (2003).

234. Khamaisi, M. *et al.* PKCδ inhibition normalizes the wound-healing capacity of diabetic human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **126**, 837–853 (2016).

235. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).

236. Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. & Creager, M. A. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **114**, 597–605 (2006).

237. Andriantsitohaina, R. *et al.* Systems biology of antioxidants. *Clin. Sci.* **123**, 173–192 (2012).

238. Ziegler, D. *et al.* Overexpression of cutaneous mitochondrial superoxide dismutase in recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia* **58**, 1621–1625 (2015).

239. Kimura, F. *et al.* Serum Extracellular Superoxide Dismutase in Patients With Type 2 Diabetes: Relationship to the development of micro- and macrovascular complications. *Diabetes Care* **26**, 1246–1250 (2003).

240. Al-Kateb, H. *et al.* Multiple Superoxide Dismutase 1/Splicing Factor Serine Alanine 15 Variants Are Associated With the Development and Progression of Diabetic Nephropathy: The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Genetics Study. *Diabetes* **57**, 218–228 (2008).

241. Mohammedi, K. *et al.* Manganese Superoxide Dismutase (SOD2) Polymorphisms, Plasma Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) Concentration and Risk of Kidney Complications in Subjects with Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* **9**, e96916 (2014).

242. Goldstein, S., Moerman, E. J., Soeldner, J. S., Gleason, R. E. & Barnett, D. M. Diabetes mellitus and genetic prediabetes. Decreased replicative capacity of cultured skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **63**, 358–370 (1979).

243. Hehenberger, K. & Hansson, A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. *Cell Biochem. Funct.* **15**, 197–201 (1997).

244. Spanheimer, R. G. Correlation Between Decreased Collagen Production in Diabetic Animals and in Cells Exposed to Diabetic Serum: Response to Insulin. *Matrix* **12**, 101–107 (1992).

245. Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P. & Gurtner, G. C. Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast. *Am. J. Pathol.* **162**, 303–312 (2003).

246. Chang, H. P., Cho, J. H., Lee, W. J., Roh, H. & Lee, D. W. Development of an easy-to-handle murine model for the characterization of radiation-induced gross and molecular changes in skin. *Arch. Plast. Surg.* **45**, 403–410 (2018).

247. Hunt, S. M. *et al.* Cross-cultural adaptation of health measures. European Group for Health Management and Quality of Life Assessment. *Health Policy Amst. Neth.* **19**, 33–44 (1991).

248. O'Toole, E. A. *et al.* Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue. *J. Clin. Invest.* **100**, 2881–2891 (1997).

249. Mogford, J. E. *et al.* Effect of age and hypoxia on TGF?1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: Impact on cell migration. *J. Cell. Physiol.* **190**, 259–265 (2002).

250. Nissen, N. N. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Angiogenic Activity during the Proliferative Phase of Wound Healing. **152**, 8 (1998).

251. Alikhani, Z. *et al.* Advanced Glycation End Products Enhance Expression of Pro-apoptotic Genes and Stimulate Fibroblast Apoptosis through Cytoplasmic and Mitochondrial Pathways. *J. Biol. Chem.* **280**, 12087–12095 (2005).

252. Sejersen, H. & Rattan, S. I. S. Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts. *Biogerontology* **10**, 203–211 (2009).

253. Berge, U., Behrens, J. & Rattan, S. I. S. Sugar-Induced Premature Aging and Altered Differentiation in Human Epidermal Keratinocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1100**, 524–529 (2007).

254. Giuggioli, D., Manfredi, A., Lumetti, F., Colaci, M. & Ferri, C. Scleroderma skin ulcers definition, classification and treatment strategies our experience and review of the literature. *Autoimmun. Rev.* **17**, 155–164 (2018).

255. Amin, N. & Doupis, J. Diabetic foot disease: From the evaluation of the "foot at risk" to the novel diabetic ulcer treatment modalities. *World J. Diabetes* **7**, 153 (2016).

256. Mavrogenis, A. F. *et al.* Current concepts for the evaluation and management of diabetic foot ulcers. *EFORT Open Rev.* **3**, 513–525 (2018).

257. Yazdanpanah, L. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World J. Diabetes* **6**, 37 (2015).

258. Chung, L. *et al.* MQX-503, a novel formulation of nitroglycerin, improves the severity of Raynaud's phenomenon: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* **60**, 870–7 (2009).

259. Hummers, L. K. *et al.* A multi-centre, blinded, randomised, placebo-controlled, laboratory-based study of MQX-503, a novel topical gel formulation of nitroglycerine, in patients with Raynaud phenomenon. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1962–1967 (2013).

260. Stasch, J.-P., Pacher, P. & Evgenov, O. V. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation* **123**, 2263–2273 (2011).

261. Brueckner, C. S. *et al.* Effect of sildenafil on digital ulcers in systemic sclerosis: analysis from a single centre pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1475–1478 (2010).

262. Distler, O. *et al.* RISE-SSc: Riociguat in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Respir. Med.* **122 Suppl 1**, S14–S17 (2017).

263. Hachulla, E. *et al.* Efficacy of sildenafil on ischaemic digital ulcer healing in systemic sclerosis: the placebo-controlled SEDUCE study. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1009–1015 (2016).

264. Matucci-Cerinic, M. *et al.* Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 32–38 (2011).

265. Kunugiza, Y. *et al.* Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. *Gene Ther.* **13**, 1143–1152 (2006).

266. Kowal-Bielecka, O. *et al.* EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 620–628 (2009).

267. O'Meara, S., Cullum, N., Majid, M. & Sheldon, T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* **4**, 1–237 (2000).

268. Smith, W. L., Urade, Y. & Jakobsson, P.-J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem. Rev.* **111**, 5821–5865 (2011).

269. Chiang, N. *et al.* Leukotriene B4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. *J. Clin. Invest.* **104**, 309–316 (1999).

270. Smith, W. L., Meade, E. A. & DeWitt, D. L. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **744**, 50–57 (1994).

271. Seibert, K. *et al.* Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12013–12017 (1994).

272. Korchak, H. M., Serhan, C. N. & Weissmann, G. Activation of the human neutrophil: the roles of lipid remodeling and intracellular calcium. *Monogr. Pathol.* 83–93 (1982).

273. Pannunzio, A. & Coluccia, M. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 Inhibitors in Cancer: A Review of Oncology and Medicinal Chemistry Literature. *Pharmaceuticals* **11**, 101 (2018).

274. Sugimoto, Y., Inazumi, T. & Tsuchiya, S. Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *J. Biochem. (Tokyo)* **157**, 73–80 (2015).

275. Chu, L., Liou, J.-Y. & Wu, K. K. Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **118–119**, 19–27 (2015).

276. Mubarak, K. K. A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir. Med.* **104**, 9–21 (2010).

277. Vane, J. & Corin, R. . Prostacyclin: A Vascular Mediator. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **26**, 571–578 (2003).

278. Feigen, L. P. *et al.* Peripheral vasodilator effects of prostaglandins: comparison of 6-keto-prostaglandin E1 with prostacyclin and escape from prostaglandin E2 in the mesenteric vascular bed. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 528–534 (1980).

279. Nagaya, N. Orally active prostacyclin analogue for cardiovascular disease. *Int. Angiol. J. Int. Union Angiol.* **29**, 14–18 (2010).

280. Coats, P., Johnston, F., MacDonald, J., McMurray, J. J. & Hillier, C. Endothelium-derived hyperpolarizing factor : identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation* **103**, 1702–8 (2001).

281. Hoang, K. G., Allison, S., Murray, M. & Petrovic, N. Prostanoids regulate angiogenesis acting primarily on IP and EP 4 receptors. *Microvasc. Res.* **101**, 127–134 (2015).

282. Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y. & FitzGerald, G. A. Prostanoids in health and disease. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S423-428 (2009).

283. Falcetti, E. *et al.* IP receptor-dependent activation of PPARγ by stable prostacyclin analogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 821–827 (2007).

284. Kohyama, T. *et al.* Prostacyclin analogs inhibit fibroblast migration. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, L428–L432 (2002).

285. Woodward, D. F., Jones, R. L. & Narumiya, S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. *Pharmacol. Rev.* **63**, 471–538 (2011).

286. Hirata, T. & Narumiya, S. Prostanoid Receptors. *Chem. Rev.* **111**, 6209–6230 (2011).

287. Rieg, A. D. *et al.* Levosimendan Relaxes Pulmonary Arteries and Veins in Precision-Cut Lung Slices - The Role of KATP-Channels, cAMP and cGMP. *PLoS ONE* **8**, e66195 (2013).

288. Miggin, S. M. & Kinsella, B. T. Investigation of the mechanisms of G protein: effector coupling by the human and mouse prostacyclin receptors. Identification of critical species-dependent differences. *J. Biol. Chem.* **277**, 27053–27064 (2002).

289. Katusic, Z. S., Santhanam, A. V. & He, T. Vascular effects of prostacyclin: does activation of PPARδ play a role? *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 559–564 (2012).

290. Jimenez, R. *et al.* Endothelium-Dependent Vasodilator Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists via the Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase-Akt Pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 554–561 (2010).

291. Blanquart, C. PPARα (PEROXISOME PROLIFERATOR- ACTIVATED RECEPTOR ALPHA) UN RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE IMPLIQUÉ DANS LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME DES LIPIDES ET DES LIPOPROTÉINES AINSI QUE DANS LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE. 13

292. Pluchart, H., Khouri, C., Blaise, S., Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Targeting the Prostacyclin Pathway: Beyond Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 512–523 (2017).

293. Schiffrin, E. L., Amiri, F., Benkirane, K., Iglarz, M. & Diep, Q. N. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **42**, 664–668 (2003).

294. Combs, C. K., Bates, P., Karlo, J. C. & Landreth, G. E. Regulation of b-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor a. *Neurochem. Int.* 9 (2001).

295. Manieri, N. A. *et al.* Mucosally transplanted mesenchymal stem cells stimulate intestinal healing by promoting angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **125**, 3606–3618 (2015).

296. Smadja, D. *et al.* Treprostinil indirectly regulates endothelial colony forming cell angiogenic properties by increasing VEGF-A produced by mesenchymal stem cells. *Thromb. Haemost.* **114**, 735–747 (2015).

297. Yamamoto, T., Horikawa, N., Komuro, Y. & Hara, Y. Effect of topical application of a stable prostacyclin analogue, SM-10902 on wound healing in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **302**, 53–60 (1996).

298. Pola, R. Comparative analysis of the in vivo angiogenic properties of stable prostacyclin analogs: a possible role for peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36**, 363–370 (2004).

299. Biscetti, F. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is crucial for iloprost-induced in vivo angiogenesis and vascular endothelial growth factor upregulation. *J. Vasc. Res.* **46**, 103–108 (2009).

300. Hirata, Y. *et al.* A synthetic prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity, ONO-1301, protects myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* **674**, 352–358 (2012).

301. Baretella, O. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-Dependent Contractions. in *Advances in Pharmacology* **77**, 177–208 (Elsevier, 2016).

302. Lim, H.-J. *et al.* PPAR delta agonist L-165041 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle. *Atherosclerosis* **202**, 446–454 (2009).

303. Benkirane, K., Amiri, F., Diep, Q. N., El Mabrouk, M. & Schiffrin, E. L. PPAR-gamma inhibits ANG II-induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H390-397 (2006).

304. Lee, K.-S. *et al.* Troglitazone inhibits endothelial cell proliferation through suppression of casein kinase 2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 83–88 (2006).

305. Zahradka, P. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma1 inhibits human smooth muscle cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* **246**, 105–110 (2003).

306. Piqueras, L. *et al.* Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 63–69 (2007).

307. Han, J.-K. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* **118**, 1021–1033 (2008).

308. Stratton, R. *et al.* Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J. Clin. Invest.* **108**, 10 (2001).

309. Hatane, T. *et al.* Prostaglandin I2 analog enhances the expression of urokinase-type plasminogen activator and wound healing in cultured human fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1403**, 189–198 (1998).

310. Kintscher, U. *et al.* PPARalpha inhibits TGF-beta-induced beta5 integrin transcription in vascular smooth muscle cells by interacting with Smad4. *Circ. Res.* **91**, e35-44 (2002).

311. Johnson, M., Harrison, H. E., Raftery, A. T. & Elder, J. B. VASCULAR PROSTACYCLIN MAY BE REDUCED IN DIABETES IN MAN. *The Lancet* **313**, 325–326 (1979).

312. Rustin, M. H. A., Bull, H. A., Machin, S. J., Koro, O. & Dowd, P. M. Serum From Patients With Raynaud's Phenomenon Inhibits Prostacyclin Production. *J. Invest. Dermatol.* **89**, 555–559 (1987).

313. Asano, Y. Systemic sclerosis. *J. Dermatol.* **45**, 128–138 (2018).

314. Aanderud, S., Krane, H. & Nordøy, A. Influence of glucose, insulin and sera from diabetic patients on the prostacyclin synthesis in vitro in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* **28**, 641–644 (1985).

315. Fedorowicz, A. *et al.* Comparison of Pulmonary and Systemic NO- and PGI_2 -Dependent Endothelial Function in Diabetic Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–15 (2018).

316. Movahed, M.-R., Hashemzadeh, M. & Jamal, M. M. The Prevalence of Pulmonary Embolism and Pulmonary Hypertension in Patients With Type II Diabetes Mellitus. *Chest* **128**, 3568–3571 (2005).

317. Bagi, Z., Erdei, N., Papp, Z., Édes, I. & Koller, A. Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus. *Pharmacol. Rep.* 5 (2006).

318. Peredo, H. A., Rodríguez, R., Susemihl, M. C., Villarreal, I. & Filinger, E. Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **26**, 355–360 (2006).

319. Tesfamariam, B., Brown, M. L. & Cohen, R. A. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J. Clin. Invest.* **87**, 1643–1648 (1991).

320. Grosser, T. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin. Invest.* **116**, 4–15 (2005).

321. Randriamboavonjy, V. *et al.* Calpain 1 cleaves and inactivates prostacyclin synthase in mesenteric arteries from diabetic mice. *Basic Res. Cardiol.* **112**, (2017).

322. Knebel, S. M., Sprague, R. S. & Stephenson, A. H. Prostacyclin receptor expression on platelets of humans with type 2 diabetes is inversely correlated with hemoglobin A1c levels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **116–117**, 131–135 (2015).

323. Kahn, N. N., Bauman, W. A. & Sinha, A. K. Loss of high-affinity prostacyclin receptors in platelets and the lack of prostaglandin-induced inhibition of platelet-stimulated thrombin generation in subjects with spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 245–249 (1996).

324. Kahn, N. N. Insulin-induced expression of prostacyclin receptors on platelets is mediated through ADP-ribosylation of Gi alpha protein. *Life Sci.* **63**, 2031–2038 (1998).

325. Riccardi, M. T. *et al.* [Treatment of digital ulcers in systemtic sclerosis with endothelin-1 receptor antagonist (bosentan)]. *Reumatismo* **59**, 135–139 (2007).

326. Abraham, D. & Dashwood, M. Endothelin--role in vascular disease. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **47 Suppl 5**, v23-24 (2008).

327. Walker, K. M., Pope, J., Scleroderma Clinical Trials Consortium & Canadian Scleroderma Research Group. Expert agreement on EULAR/EUSTAR recommendations for the management of systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **38**, 1326–1328 (2011).

328. Balbir-Gurman, A. *et al.* Antioxidant status after iloprost treatment in patients with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis. *Clin. Rheumatol.* **26**, 1517–1521 (2007).

329. Roche, C. *et al.* Impact of soluble epoxide hydrolase inhibition on early kidney damage in hyperglycemic overweight mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **120**, 148–154 (2015).

330. Lorthioir, A., Guerrot, D., Joannides, R. & Bellien, J. Diabetic CVD – Soluble Epoxide Hydrolase as A Target. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **10**, 212–222 (2012).

331. Torley, H. I. *et al.* A double blind, randomised, multicentre comparison of two doses of intravenous iloprost in the treatment of Raynaud's phenomenon secondary to connective tissue diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **50**, 800–804 (1991).

332. Wigley, F. M., Seibold, J. R., Wise, R. A., McCloskey, D. A. & Dole, W. P. Intravenous iloprost treatment of Raynaud's phenomenon and ischemic ulcers secondary to systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **19**, 1407–1414 (1992).

333. Sahay, S., Humbert, M. & Sitbon, O. Medical Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **38**, 686–700 (2017).

334. Pluchart, H., Khouri, C., Blaise, S., Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Targeting the Prostacyclin Pathway: Beyond Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 512–523 (2017).

335. Sitbon, O. *et al.* Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2522–2533 (2015).

336. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*. (Springer Berlin Heidelberg, 2017). doi:10.1007/978-3-662-53273-7

337. Roustit, M., Blaise, S. & Cracowski, J.-L. Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **77**, 63–71 (2014).

338. Wang, Y., Thakur, R., Fan, Q. & Michniak, B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 179–191 (2005).

339. Hirvonen, J. Transdermal iontophoresis: modulation of electroosmosis by polypeptides. *J. Controlled Release* **50**, 283–289 (1998).

340. Cullander, C. & Guy, R. Sites of iontophoretic current flow into the skin identification ans characterization with the vibrating probe electrode. (1991).

341. Gratieri, T. & Kalia, Y. N. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 315–329 (2013).

342. Schuetz, Y. B., Naik, A., Guy, R. H., Vuaridel, E. & Kalia, Y. N. Transdermal iontophoretic delivery of triptorelin in vitro. *J. Pharm. Sci.* **94**, 2175–2182 (2005).

343. Burnette, R. R. & Marrero, D. Comparison between the iontophoretic and passive transport of thyrotropin releasing hormone across excised nude mouse skin. *J. Pharm. Sci.* **75**, 738–743 (1986).

344. Kotzki, S., Roustit, M., Arnaud, C., Godin-Ribuot, D. & Cracowski, J.-L. Effect of continuous vs pulsed iontophoresis of treprostinil on skin blood flow. *Eur. J. Pharm. Sci.* **72**, 21–26 (2015).

345. Kasting, G. B. & Keister, J. C. Application of electrodiffusion theory for a homogeneous membrane to iontophoretic transport through skin. *J. Controlled Release* **8**, 195–210 (1989).

346. Piccolino, M. Luigi Galvani's path to animal electricity. *C. R. Biol.* **329**, 303–318 (2006).

347. Tai, G., Tai, M. & Zhao, M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. *Burns Trauma* **6**, (2018).

348. Hoare, J. I., Rajnicek, A. M., McCaig, C. D., Barker, R. N. & Wilson, H. M. Electric fields are novel determinants of human macrophage functions. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 1141–1151 (2016).

349. Eberhardt, A., Szczypiorski, P. & Korytowski, G. Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition of skin exudate. *Acta Physiol. Pol.* **37**, 41–46 (1986).

350. Yao, L., Shanley, L., McCaig, C. & Zhao, M. Small applied electric fields guide migration of hippocampal neurons. *J. Cell. Physiol.* **216**, 527–535 (2008).

351. Zhao, M., Bai, H., Wang, E., Forrester, J. V. & McCaig, C. D. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J. Cell Sci.* **117**, 397–405 (2004).

352. Simpson, M. J., Lo, K.-Y. & Sun, Y.-S. Quantifying the roles of random motility and directed motility using advection-diffusion theory for a 3T3 fibroblast cell migration assay stimulated with an electric field. *BMC Syst. Biol.* **11**, 39 (2017).

353. Zhao, M., Pu, J., Forrester, J. V. & Mccaig, C. D. Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB J.* **16**, 857–859 (2002).

354. Vanegas-Acosta, J. C., Garzón-Alvarado, D. A. & Zwamborn, A. P. M. Mathematical model of electrotaxis in osteoblastic cells. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* **88**, 134–143 (2012).

355. Guo, A. *et al.* Effects of physiological electric fields on migration of human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2320–2327 (2010).

356. Ud-Din, S. & Bayat, A. Electrical Stimulation and Cutaneous Wound Healing: A Review of Clinical Evidence. *Healthcare* **2**, 445–467 (2014).

357. Chang, H.-F., Lee, Y.-S., Tang, T. K. & Cheng, J.-Y. Pulsed DC Electric Field-Induced Differentiation of Cortical Neural Precursor Cells. *PloS One* **11**, e0158133 (2016).

358. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet* **366**, 1736–1743 (2005).

359. Bourguignon, G. J. & Bourguignon, L. Y. Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1**, 398–402 (1987).

360. Rouabhia, M., Park, H., Meng, S., Derbali, H. & Zhang, Z. Electrical Stimulation Promotes Wound Healing by Enhancing Dermal Fibroblast Activity and Promoting Myofibroblast Transdifferentiation. *PLoS ONE* **8**, e71660 (2013).

361. Kaur, S. *et al.* Galvanic zinc–copper microparticles produce electrical stimulation that reduces the inflammatory and immune responses in skin. *Arch. Dermatol. Res.* **303**, 551–562 (2011).

362. Gómez-Ochoa, I., Gómez-Ochoa, P., Gómez-Casal, F., Cativiela, E. & Larrad-Mur, L. Pulsed electromagnetic fields decrease proinflammatory cytokine secretion (IL-1β and TNF-α) on human fibroblast-like cell culture. *Rheumatol. Int.* **31**, 1283–1289 (2011).

363. Zhao, M. *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-γ and PTEN. *Nature* **442**, 457–460 (2006).

364. Sato, M. J. *et al.* Switching direction in electric-signal-induced cell migration by cyclic guanosine monophosphate and phosphatidylinositol signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 6667–6672 (2009).

365. Lala, D., Spaulding, S. J., Burke, S. M. & Houghton, P. E. Electrical stimulation therapy for the treatment of pressure ulcers in individuals with spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Int. Wound J.* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/iwj.12446

366. Jünger, M., Arnold, A., Zuder, D., Stahl, H.-W. & Heising, S. Local therapy and treatment costs of chronic, venous leg ulcers with electrical stimulation (Dermapulse): a prospective, placebo controlled, double blind trial. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **16**, 480–487 (2008).

367. Goldman, R. J., Brewley, B. I. & Golden, M. A. Electrotherapy reoxygenates inframalleolar ischemic wounds on diabetic patients: a case series. *Adv. Skin Wound Care* **15**, 112–120 (2002).

368. Sussman, C. & Bates-Jensen, B. M. *Wound care: a collaborative practice manual for health professionals*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012).

369. Wirsing, P. G., Habrom, A. D., Zehnder, T. M., Friedli, S. & Blatti, M. Wireless micro current stimulation--an innovative electrical stimulation method for the treatment of patients with leg and diabetic foot ulcers. *Int. Wound J.* **12**, 693–698 (2015).

370. Khouri, C. *et al.* Hierarchical evaluation of electrical stimulation protocols for chronic wound healing: An effect size meta-analysis: Electrical stimulation for wound healing. *Wound Repair Regen.* **25**, 883–891 (2017).

371. Polak, A., Franek, A. & Taradaj, J. High-Voltage Pulsed Current Electrical Stimulation in Wound Treatment. *Adv. Wound Care* **3**, 104–117 (2014).

372. Kawasaki, L. *et al.* The mechanisms and evidence of efficacy of electrical stimulation for healing of pressure ulcer: A systematic review. *Wound Repair Regen.* **22**, 161–173 (2014).

373. Szuminsky, N. J., Albers, A. C., Unger, P. & Eddy, J. G. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. *Phys. Ther.* **74**, 660–667 (1994).

374. Asadi, M. R. & Torkaman, G. Bacterial Inhibition by Electrical Stimulation. *Adv. Wound Care* **3**, 91–97 (2014).

375. Kim, H. *et al.* Antibacterial efficacy testing of a bioelectric wound dressing against clinical wound pathogens. *Open Microbiol. J.* **8**, 15–21 (2014).

376. Kloth, L. C. Electrical Stimulation for Wound Healing: A Review of Evidence From In Vitro Studies, Animal Experiments, and Clinical Trials. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **4**, 23–44 (2005).

377. Durand, S., Fromy, B., Bouyé, P., Saumet, J. L. & Abraham, P. Vasodilatation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms. *J. Physiol.* **540**, 261–269 (2002).

378. Grossmann, M. *et al.* The Effect of Iontophoresis on the Cutaneous Vasculature: Evidence for Current-Induced Hyperemia. *Microvasc. Res.* **50**, 444–452 (1995).

379. Durand, S., Fromy, B., Bouyé, P., Saumet, J. L. & Abraham, P. Current-Induced Vasodilation during Water Iontophoresis (5 min, 0.10 mA) Is Delayed from Current Onset and Involves Aspirin Sensitive Mechanisms. *J. Vasc. Res.* **39**, 59–71 (2002).

380. Gohin, S., Decorps, J., Sigaudo-Roussel, D. & Fromy, B. Sensory nerves contribute to cutaneous vasodilator response to cathodal stimulation in healthy rats. *Microvasc. Res.* **101**, 103–110 (2015).

381. Tartas, M. *et al.* Early vasodilator response to anodal current application in human is not impaired by cyclooxygenase-2 blockade. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **288**, H1668–H1673 (2005).

382. Gohin, S. *et al.* What Can Current Stimulation Tell Us about the Vascular Function of Endogenous Prostacyclin in Healthy Rat Skin In Vivo? *J. Invest. Dermatol.* **131**, 237–244 (2011).

383. Morris, S. J. & Shore, A. C. Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. *J. Physiol.* **496**, 531–542 (1996).

384. Berliner, M. N. Skin Microcirculation during Tapwater Iontophoresis in Humans: Cathode Stimulates More Than Anode. *Microvasc. Res.* **54**, 74–80 (1997).

385. Blaise, S. *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 557–565 (2011).

386. Blaise, S., Roustit, M., Hellmann, M., Millet, C. & Cracowski, J.-L. Cathodal Iontophoresis of Treprostinil Induces a Sustained Increase in Cutaneous Blood Flux in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **53**, 58–66 (2013).

387. Roustit, M. *et al.* Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 439–445 (2014).

388. Hellmann, M., Roustit, M., Gaillard-Bigot, F. & Cracowski, J.-L. Cutaneous iontophoresis of treprostinil, a prostacyclin analog, increases microvascular blood flux in diabetic malleolus area. *Eur. J. Pharmacol.* **758**, 123–128 (2015).