



HAL
open science

Exploration fonctionnelle des cellules cutanées en réponse au glyoxal et identification de facteurs impliqués dans le retard de cicatrisation lié au diabète : test de la Metformine comme molécule antiglycante

Cécile Guillon

► **To cite this version:**

Cécile Guillon. Exploration fonctionnelle des cellules cutanées en réponse au glyoxal et identification de facteurs impliqués dans le retard de cicatrisation lié au diabète : test de la Metformine comme molécule antiglycante. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1132 . tel-03827678

HAL Id: tel-03827678

<https://theses.hal.science/tel-03827678>

Submitted on 24 Oct 2022

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

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



N°d'ordre NNT :

2021LYSE1132

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat :
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 09/07/2021, par :
Cécile Guillon

Exploration fonctionnelle des cellules cutanées en réponse au glyoxal et identification de facteurs impliqués dans le retard de cicatrisation lié au diabète. Test de la Metformine comme molécule anti-glycante

Devant le jury composé de :

Pr VALCOURT Ulrich

Président

Dr CHAINIAUX DEBACQ

Rapporteuse

Dr GIBOT Laure

Rapporteuse

Pr RACHIDI Walid

Rapporteur

Dr SIGAUDO ROUSSEL Dominique

Directrice de thèse

Dr BONOD Christelle

Co-directrice de thèse

Dr BOUSCHBACHER Marielle

Invitée

Dr LEMAITRE Gilles

Invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

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

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

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



Mes trois années de thèses ont été financées par les **Laboratoires URGO** dans le cadre d'une organisation **CIFRE** : Conventions industrielles de formation par la recherche.

Ce projet de thèse a été encadré par le **Dr. Christelle Bonod** et le **Dr. Dominique Sigaud-Roussel** au sein du **LBTi** (Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique - Lyon) et par le **Dr. Marielle Bouschbacher** des Laboratoires URGO (Chenôve).

Les expériences ont été réalisées au sein du **LBTi** dans l'équipe SKIN (Intégrité Fonctionnelle du Tissu Cutané), co-dirigée par **Bérengère Fromy** et **Jérôme Lamartine**.

Les différents travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet d'une **publication en 2021** dans « **BMJ Open Diabetes Research and Care** ».

Dans le cadre de la thèse les résultats ont été présentés au **Club de recherche clinique du Québec** à Estérel en 2019 lors d'une **présentation orale**, et pour le 7^{ème} congrès international en physiologie cutanée **SPIM** sous forme de **poster** en 2020.

Un projet parallèle au projet de thèse fait l'objet d'une revue qui est en cours de révision dans « **European Journal of Dermatology** » et est disponible en annexe de ce manuscrit.

Durant ma thèse, j'ai pu encadrer une **stagiaire de Master 1** pendant 7 semaines et une **stagiaire en DUT** pendant 4 mois.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un merci particulier à mes rapporteurs, le Pr. **Walid Rachidi**, le Dr. **Florence Chainiaux** et le Dr. **Laure Gibot** pour leur relecture et leurs commentaires. Merci également au Pr. **Ulrich Valcourt** et au Dr. **Gilles Lemaitre** en tant qu'examineur et membre invité respectivement pour le temps et l'intérêt accordé à mon travail.

Merci ensuite à **Dominique** d'avoir cru en moi dès la fin de mon stage de Master 1 et de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre en Master 2 et en thèse avec Urgo (même si je disais : Je ne ferai jamais de thèse !). Merci pour votre bienveillance et nos nombreuses réunions et discussions qui m'ont permis d'évoluer.

Christelle, merci pour ton soutien inébranlable, tes conseils et explications pour me faire avancer et pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces années de thèse. Je suis heureuse de la belle relation que l'on a développée toutes les deux, qui est très précieuse à mes yeux. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi.

Marielle et **Sophie**, merci pour nos réunions, discussions et pour la confiance que vous m'avez accordée il y a un peu plus de 3 ans au début de ma thèse et pour celle que vous m'accordez aujourd'hui, c'est réellement un plaisir de continuer à travailler avec vous.

Merci également à **François Berthod** de m'avoir acceptée dans son équipe de recherche au LOEX et à **Sabrina Bellenfant** de m'avoir appris les secrets des peaux reconstruites.

J'adresse un remerciement particulier au Pr. **Frédéric Tessier** et au Dr. **Catherine Moali** pour leurs conseils pertinents et leur suivi dans le cadre des comités de suivi de thèse annuels qui m'ont permis de faire avancer mon projet.

Un grand merci aux membres de **l'équipe fonctionnalité et dynamique du tissu cutané** devenu l'équipe SKIN :

J'ai pu effectuer mon premier stage de Master 1 sur le sujet d'**Anne Laure Begey** qui m'a guidée lors de mes premières expériences en laboratoire : merci à toi.

Lors de ce premier stage j'ai rencontré un trio féminin infernal : **Charlotte**, **Noëlle** et **Choua**. Merci à vous pour votre folie, votre bonne humeur, vos conseils et votre amitié ... Vous m'avez aidée à m'intégrer et depuis cette rencontre on a vécu beaucoup de soirées déjantées, de confidences et surtout de potins ! Je garde de cette période de merveilleux souvenirs.

Un grand merci **Jérôme Sohier** et **Romain**, pour vos conseils scientifiques et pour tous ces bons moments passés en sorties d'équipe, autour d'une grande tablée ou en soirée endiablée, vous savez apporter une touche de folie à chaque évènement.

Merci infiniment à mes amies **Louise**, **Mariana** et **Marine**. Que dire de cette grande époque où on était ensemble à l'IBCP, on a tellement rigolé ensemble, chaque jour était un réel plaisir avec un fou rire minimum par jour. On a partagés nos galères, nos bonheurs, une des meilleures parties de ma thèse bien que plutôt courte, on a su en profiter !

Un merci tout particulier à **Ben**, mon collègue de bureau, mon binôme, devenu un ami très cher. Je ne vais pas en dire plus, pas sure que tu le mérites...

Je garderai un souvenir impérissable de l'équipe Afterwork : **Joshua** alias Josie, **Alexis Moreno, Guillaume, Ben, Louise, Choua, David et Mariana** ! Nous avons révolutionné ensemble les Happy Hours en Afterwork. Merci pour tous les moments de préparation de soirées, du choix du thème aux découpages de guirlandes cœur (mais pas que ...) et au flyers personnalisés (jusqu'à trouver **Louise**, l'experte en la matière).

Merci à **Julie** et **Lisa**, pour les quelques moments passés ensemble entre la Covid et mon séjour au Canada. Je vous souhaite plein de réussite pour la suite de votre thèse. Merci à **Alejandro** pour sa gentillesse incarnée et ses délicieux petits mets mexicains.

Merci à **Jérôme Lamartine, Bérengère, Nicolas, Fabien, Ming et Kiaoling** pour vos conseils lors des réunions d'équipe et votre sympathie. Je vous souhaite beaucoup de réussite pour vos projets en cours et à venir.

Merci à **Géraldine** et **Audrey** pour vos conseils, votre aide et nos petites discussions. Merci à **Jocelyne** pour la préparation et l'entretien des souris de l'animalerie. Merci à **Aurore**, pour l'organisation des sorties d'équipe pour les initiatives que tu prends pour qu'on passe de bons moments.

Merci à **Laurence Canaple** pour sa formation et son aide précieuse pour l'utilisation du Seahorse

Merci beaucoup **Sandra** pour les manips que tu as effectuées et le temps et l'intérêt que tu as porté à mon sujet de thèse. Merci à **Chloé**, que j'ai eu le plaisir de former pendant son stage de Master 1 : tu as fait du super boulot avec le sourire et toujours à l'écoute. Je suis super heureuse pour toi de te voir évoluer aujourd'hui, je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur.

Merci à toutes les personnes que j'oublie !

Un grand merci à mes amis :

Cylia merci pour notre amitié si importante pour moi, tu le sais... Pour tous nos souvenirs et ton soutien.

Mes petites Blebs : **Dounia, Toinette** et **Soraya** merci pour toutes nos tables rondes, nos confidences autour de gâteaux et toutes autres sucreries. Ça fait toujours un bien fou de vous voir et de vider son sac une par une ahah. Merci d'être vous !

Merci à mes totos préférés : **Charlotte** et **Alexis** merci pour tous nos repas Top Chef du mercredi soir qui étaient, à l'époque, une vraie pose détente dans la semaine avec des plats toujours plus gras mdr.

Un immense merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées au Canada et qui sont devenus ma petite famille pendant 8 mois. En particulier à mes parents de substitution **Aurélié** et **Julien** (hâte de vous voir en France). Aurélié tu as été la meilleure collègue de bureau du monde pendant ces 8 mois : planification de voyage, potins... et un peu de manips aussi bien sûr... Grâce à toi je me suis intégrée très rapidement et **les boys du Loex** sont nés : un grand merci pour votre bienveillance et votre sympathie les filles, j'espère vous revoir en France ou au Canada ... Merci à toutes les personnes de la

colloc pour nos soirées et w.e chasse et pêche mdr. Merci à ma petite **Manue** pour cette relation qu'on a développée, pour nos petites confidences, et ton amitié.

Un immense merci à **mes parents** sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Je ne saurais comment vous remercier de tout ce que vous m'avez apporté, de votre soutien inébranlable. Vous m'avez poussée, vous avez toujours cru en moi et si j'en suis ici c'est grâce à vous. Vous m'avez donné toutes les ressources, les clés et l'amour pour réussir, j'ai une chance incroyable de vous avoir.

Merci également à mes amours **de frères et sœurs** et **neveux et nièces** : vous me donnez toujours le sourire, vous voir me permet toujours de recharger les batteries et de me vider la tête.

Merci également ma petite **Mamie** pour l'intérêt que tu as toujours porté à mon travail et merci pour les merveilleux petits plats que tu concoctes.

Enfin je remercie tout particulièrement mon **n'amour, Jérémy** : tu es mon pilier, mon confident, mon meilleur ami, mon amour... On s'est rencontré au tout début de mon arrivée dans le labo et tu m'as suivie et supportée pendant toutes les périodes de doute et de stress que j'ai traversées... Tu m'as toujours poussée et encouragée dans tout ce que j'entreprenais : mille mercis.

Résumé

Les personnes diabétiques présentent un risque accru de développer des plaies chroniques, le plus souvent au niveau du pied, pouvant mener jusqu'à l'amputation. Les causes de ce défaut de cicatrisation sont encore mal connues. Il a cependant été montré qu'une des conséquences de l'hyperglycémie est l'accumulation de produits terminaux de glycation, ou AGEs, tel que le Nε-(carboxyméthyl)lysine (CML), au niveau de la peau des patients. Notre projet a eu pour objectif de mettre en évidence les effets de la glycation au niveau cutané afin de mieux comprendre les défauts de cicatrisation des diabétiques.

Dans un premier temps, notre travail a consisté à étudier le comportement des fibroblastes dermiques humains en réponse à un agent de glycation fort : le glyoxal. Nous avons montré une diminution importante de la prolifération et de la migration cellulaire à la suite d'une accumulation de CML. Il apparaît qu'en présence de glyoxal les fibroblastes produisent correctement le collagène I mais sont incapables de le cliver et/ou de l'assembler correctement. Ces résultats suggèrent que la glycation pourrait retarder la fermeture d'une plaie et induire une fragilité cutanée. Nous avons également pu mettre en évidence une forte accumulation de vésicules lipidiques dans le cytoplasme des fibroblastes en réponse au glyoxal, ce qui traduit un déséquilibre important du métabolisme des lipides comme il est observé chez les diabétiques. Les résultats obtenus en présence de metformine montrent que cette molécule permettrait de limiter l'accumulation lipidique.

Par la suite, un modèle de peaux 3D avec kératinocytes, fibroblastes et cellules endothéliales a été testé en présence de glyoxal et/ou de metformine. Le glyoxal induit une diminution de la maturité des vaisseaux sanguins, une forte perturbation de la différenciation épidermique avec notamment une diminution de l'épaisseur de l'épiderme et de l'expression de la kératine 1. Dans un autre modèle 3D complexe, permettant d'étudier la cicatrisation, nous avons montré que la migration des kératinocytes est drastiquement diminuée après traitement au glyoxal. Ces modèles 3D nous ont permis de mettre en évidence que la metformine est capable de rétablir partiellement la différenciation épidermique et d'améliorer la stabilité des vaisseaux sanguins, mais ne permet pas d'augmenter la migration des kératinocytes.

Enfin, nous avons testé un pansement contenant de la metformine sur des plaies de compression chroniques induites chez la souris diabétique de type II, la souris Db/Db. Sur ce modèle *in vivo* nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence une amélioration de la cicatrisation en présence de metformine.

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que la glycation est à l'origine d'une perturbation forte de différents paramètres essentiels au processus de cicatrisation comme la migration, la prolifération, la différenciation et le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces études pourront dans l'avenir servir de modèle afin de tester des molécules thérapeutiques innovantes comme par exemple la metformine qui montre certains résultats très encourageants.

Abstract

Diabetic patients are at risk of developing chronic wounds such as diabetic foot that can lead to amputation. The causes of this wound healing defect are still poorly understood but, it has been shown that Advanced Glycation End products (AGEs) like N ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML), resulting from chronic hyperglycemia, are accumulated in the skin. We aimed to highlight cutaneous glycation effect to better understand wound healing delay among diabetic patients.

First, we studied human dermal fibroblast behavior after the addition of a strong glycating agent: glyoxal. We showed an accumulation of CML and a drastic decrease of proliferation and migration. It appeared that in presence of glyoxal, collagen I is produced correctly but it does not mature properly and it cannot induce the formation of collagen fibers. These results are evidence of the pronounced effect of glycation on wound healing and skin quality. Diabetes patients present an imbalance of lipids metabolism and we showed a strong accumulation of lipid droplets in fibroblasts cytosol after glyoxal treatment. We proved that metformin could prevent lipid droplets accumulation.

Next, a 3D skin model with keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells was performed with glyoxal and metformin. Glyoxal decreased vessels maturity, disturbed epidermal differentiation including a decrease of epidermal thickness and keratin 1 expression. A 3D wound healing skin model showed a slowdown of keratinocyte migration in response to glyoxal. These 3D models allowed us to highlight that metformin is able to restore epidermal differentiation, to ameliorate vessels stability but cannot increase keratinocytes migration.

Finally, we tested a metformin-containing dressing on chronic compression wounds in diabetic mice but metformin did not seem to improve wound healing in these conditions.

Taking together, our results could explained skin fragility found in diabetic patient. In fact, glyoxal seemed to act at different level and disturbed some wound healing stage, such as proliferation, migration, neo-epidermis formation and remodeling of ECM. All our experiments could be used to study related skin diabetic complications and could help to test new therapeutic approach such as metformin, which shows encouraging results.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX.....	18
LISTE DES ABREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION GENERALE	21
1 LA PEAU	23
1.1 Structure	23
1.1.1 Epiderme	25
1.1.1.1 Couche basale.....	25
1.1.1.2 Couche épineuse	27
1.1.1.3 Couche granuleuse	29
1.1.1.4 Couche cornée.....	29
1.1.2 Derme.....	33
1.1.2.1 Composants de la matrice extracellulaire	33
1.1.2.2 Régulation de la matrice extracellulaire.....	41
1.1.2.3 Organisation du derme.....	43
1.1.2.4 Jonction dermo-épidermique	45
1.1.3 Tissu adipeux dermique	45
1.1.4 Vascularisation cutanée	47
1.1.5 Innervation cutanée	49
1.1.6 Annexes cutanées	49
1.1.6.1 Glandes sudoripares	49
1.1.6.2 Follicule pileux et glandes sébacées	51
1.2 La cicatrisation	53
1.2.1 Phase inflammatoire : Hémostase et inflammation	53
1.2.2 Phase de prolifération.....	55
1.2.2.1 Contraction des fibroblastes	55
1.2.2.2 Angiogenèse	57
1.2.2.3 Ré-épithélialisation.....	59
1.2.3 Phase de remodelage.....	59
2 GLYCATION.....	61
2.1 Mécanisme de la glycation	61
2.1.1 Découverte de la glycation.....	61
2.1.2 Processus de la glycation	61
2.1.3 Mode d'action des AGEs : La voie AGE-RAGE	65
2.1.4 Mécanismes d'élimination physiologique des AGEs	67
2.1.4.1 Protéolyse.....	67

2.1.4.2	Intervention de la fructose amine 3 kinase	67
2.1.4.3	Le système glyoxalase	69
2.1.5	Facteurs qui participent à la formation et à l'accumulation des AGEs	69
2.1.5.1	Facteurs environnementaux	69
2.1.5.2	Facteurs endogènes	70
2.2	Méthodes de dosage et de détection des AGEs	71
2.3	Molécules anti-glycantes	73
2.3.1	Guanidine	73
2.3.1.1	Aminoguanidine	73
2.3.1.2	Metformine	73
2.3.2	Casseur d'AGEs	74
2.4	Vieillesse et AGEs	74
2.5	Diabète et AGEs	75
3	LE DIABETE	79
3.1	Caractéristiques de la pathologie	79
3.2	Complications associées	81
3.2.1	Les plaies chroniques	83
3.2.1.1	Le pied du diabétique	84
3.2.2	Désordre métabolique, rôle des vésicules lipidiques	87
3.3	Traitements : la metformine	89
3.3.1	Mode d'action de la metformine	91
3.3.1.1	Réduction de la production hépatique de glucose	91
3.3.1.2	Augmentation de la sensibilité à l'insuline	92
3.3.1.3	Augmentation de la fonction des cellules β du pancréas	92
3.3.2	Implication de la metformine dans le cancer	92
3.3.3	Action dermatologique de la metformine	93
3.4	Modèles d'études du diabète	95
3.4.1	In vivo	95
3.4.1.1	Diabète de type I	95
3.4.1.2	Diabète de type II	96
3.4.2	Modèles <i>In vitro</i>	98
3.4.2.1	AGEs-BSA	98
3.4.2.2	Les α -oxoaldéhydes	99
3.5	Modèle d'étude de la cicatrisation	101
3.5.1	Différences peaux humaine et murine	101
3.5.2	Modèles de lésions cutanées	101
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	103
	MATERIELS ET METHODES	107

1	CULTURE CELLULAIRE 2D.....	109
1.1	Préparation des solutions.....	109
1.2	Fibroblastes.....	109
1.2.1	Analyse des protéines matricielles déposées et sécrétées	109
1.2.2	Analyse de la migration par scratch test / Time lapse	111
1.2.3	Cytométrie en flux.....	111
1.2.4	Analyse de la morphologie cellulaire et des forces mécaniques.	111
1.2.5	Analyse du métabolisme cellulaire par la technologie Seahorse.....	113
2	CULTURE D'UN MODELE DE PEAU 3D.....	115
2.1	Fabrication des éponges.....	115
2.1.1	Stérilisation	117
2.2	Culture cellulaire	119
2.2.1	Fibroblastes	119
2.2.2	Cellules endothéliales	119
2.2.3	Kératinocytes	119
2.3	Modèle de dermes vascularisés et de peaux complètes 3D	121
2.4	Modèle de cicatrisation 3D.....	123
3	TECHNIQUE DE BIOCHIMIE	125
3.1	Extraction des protéines.....	125
3.1.1	Extraction des protéines intracellulaires.....	125
3.1.2	Extraction des protéines de la matrice extracellulaire.....	125
3.1.3	Extraction des protéines du surnageant	126
3.2	Immunofluorescence	126
3.2.1	BODIPY 493/503-Perilipin-2	126
3.2.2	Immunofluorescence et coloration HES.....	126
3.2.3	Sur éponge complète pour observer le réseau vasculaire	127
3.3	Western blot	129
4	EXPERIENCES <i>IN VIVO</i>.....	131
4.1	Dépilation	131
4.2	Induction de l'ulcère de pression.....	131
	RESULTATS	133
1	RESULTATS 2D <i>IN VITRO</i>	135

1.1	La glycation par le glyoxal induit de profonds changements dans le comportement des fibroblastes dermiques.	135
1.2	La metformine diminue la production de CMLs dans les fibroblastes sans induire de toxicité.....	153
1.3	Le glyoxal et la metformine, ne modifient pas la morphologie cellulaire.....	155
1.4	La metformine semble contrecarrer les effets du glyoxal sur la force de traction exercée par les fibroblastes sur la matrice extracellulaire	155
1.5	La metformine évite l'accumulation de vésicules lipidiques en présence de glyoxal	159
2	RESULTATS <i>IN VITRO</i> 3D	159
2.1	La glycation compromet la maturité et la stabilité des vaisseaux dans un modèle de derme vascularisé	161
2.2	Le glyoxal perturbe la différenciation épidermique dans un modèle de peaux reconstruites complètes, la metformine présente des effets bénéfiques sur l'homéostasie de l'épiderme	163
2.2.1	La metformine permet de rétablir l'épaisseur de l'épiderme en présence de glyoxal	163
2.2.2	La glycation diminue la capacité de prolifération des kératinocytes	165
2.2.3	La couche épineuse est altérée en présence de glyoxal, la metformine permet de rétablir son équilibre	167
2.2.4	La différenciation terminale des kératinocytes est perturbée en présence de glyoxal	169
2.3	Modèle de cicatrisation <i>in vitro</i> 3D.....	169
2.4	Le glyoxal inhibe la migration des kératinocytes et restreint la fermeture d'une plaie dans un modèle 3D	171
3	TEST D'UN PANSEMENT METFORMINE <i>IN VIVO</i>.....	173
3.1	Les souris diabétiques présentent un retard de cicatrisation important, la metformine n'est pas capable d'améliorer la fermeture des plaies.....	173
	DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	175
	CONCLUSION GENERALE	195
	ANNEXES	199
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227

Liste des figures

Figure 1. Structure et composition de la peau humaine	22
Figure 2. Structure de l'épiderme et composition cellulaire	24
Figure 3. Marqueurs spécifiques de l'épiderme	24
Figure 4. Mélanogenèse et phagocyte des mélanosomes par les kératinocytes	26
Figure 5. Différents granules de kératohyaline dans un kératinocyte de la couche granuleuse.....	28
Figure 6. Structure de l'enveloppe cornée	30
Figure 7. Organisation complexe de la matrice extracellulaire dermique.....	32
Figure 8. Différents domaines moléculaires des collagènes fibrillaires.....	32
Figure 9. Ultrastructure des fibres de collagène.....	34
Figure 10. Synthèse des collagènes fibrillaires	34
Figure 11. Organisation moléculaire des protéoglycanes.....	36
Figure 12. Synthèse des fibres élastiques	38
Figure 13. Structure des laminines 332 et 511	38
Figure 14. Structure de la Ténascine-X	38
Figure 15. Histologie d'une peau humaine, organisation du derme	42
Figure 16. Différence entre les fibroblastes papillaires et réticulaires.....	42
Figure 17. Jonction dermo épidermique.....	44
Figure 18. Adipocytes et fraction vasculaire stromale.....	46
Figure 19. Réseau vasculaire cutané.....	46
Figure 20. Composition des vaisseaux	46
Figure 21. Innervation sensorielle de la peau	48
Figure 22. Follicule pileux.....	50
Figure 23. Différentes phases de la cicatrisation	52
Figure 24. Phase de prolifération lors de la cicatrisation	54
Figure 25. Processus d'angiogenèse	56
Figure 26. Schéma d'un réseau vasculaire néoformé lors de la cicatrisation en vue transversale	56
Figure 27. Dernière phase de cicatrisation : le remodelage de la matrice extracellulaire.	58
Figure 28. Différentes réactions menant à la production d'AGEs : La glycation	60
Figure 29. AGEs majoritaires et produits par les dicarbonyles	62
Figure 30. Structure de RAGE et sRAGE	64
Figure 31. La voie AGE-RAGE	64
Figure 32. Elimination physiologique des AGEs	66
Figure 33. Système de glyoxalase	68
Figure 34. Structure des différentes molécules anti-glycantes	72
Figure 35. Réaction entre la metformine et les dicarbonyles glyoxal / méthylglyoxal.....	72
Figure 36. Sources et conséquences du diabète.....	78
Figure 37. Coupe de pancréas humain et marquage des macrophages au sein des îlots de Langerhans	80
Figure 38. Plaie aigüe versus chronique	82
Figure 39. Structure des vésicules lipidiques	86
Figure 40. <i>Galega officinalis</i>	88
Figure 41. Mécanismes de réduction de la production hépatique de glucose par la metformine	90

Figure 42. Différences entre peau humaine et peau de souris	100
Figure 43. Modèles de lésion chez la souris.....	100
Figure 44. Protocole de culture des dermes vascularisés et des peaux complètes 3D	120
Figure 45. Photo d'une peau 3D élevée à l'interface air-liquide.....	120
Figure 46. Protocole de culture pour le modèle de cicatrisation 3D	122
Figure 47. Induction de la plaie de compression chez la souris.....	130
Figure 48. Effet de la metformine sur la viabilité des fibroblastes et la présence de CML	152
Figure 49. Morphologie des cellules en réponse au glyoxal et à la metformine	154
Figure 50. Analyse mécanique des fibroblastes.....	156
Figure 51. Metformine et vésicules lipidiques.....	158
Figure 52. Vascularisation du derme reconstruit : Immunofluorescence de PECAM et NG2	160
Figure 53. Epaisseur de l'épiderme reconstruit en réponse au glyoxal et à la metformine.....	162
Figure 54. Expression de Ki67 en réponse au glyoxal et à la metformine dans le modèle de peau 3D	164
Figure 55. Expression de K1 en réponse au glyoxal et à la metformine dans le modèle de peau 3D	166
Figure 56. Expression de la loricrine en réponse au glyoxal et à la metformine dans le modèle de peau 3D	168
Figure 57. Migration des kératinocytes au sein du modèle 3D de cicatrisation.....	170
Figure 58. Cicatrisation des souris Db/Db et contrôles avec un pansement metformine ou un placebo	172
Figure 59. Effet de l'inhibition de RAGE sur la prolifération des fibroblastes	178
Figure 60. Modèle de cicatrisation 3D de Stuermer et al.	182
Figure 61. Effet de la metformine sur la prolifération migration des fibroblastes.....	184

Liste des tableaux

Table 1. Exemple de MMPs et de leurs substrats.....	40
Table 2. Méthodes de détection et de quantification des AGEs	71
Table 3. Différents modèles animaux utilisés pour étudier le diabète.....	94
Table 4. Fibroblastes utilisés en 2D.....	108
Table 5. Réactifs et quantités utilisés pour le Seahorse	112
Table 6. Préparation des drogues pour le Seahorse.....	112
Table 7. Taille de perforateur à utiliser pour les ancrages des éponges	114
Table 8. Produits à utiliser pour fabriquer une éponge de collagène bovin / chitosan	114
Table 9. Cellules utilisées pour les expériences en 3D.....	118
Table 10. Concentrations utilisées pour les peaux 3D.....	120
Table 11. Concentrations utilisées pour le modèle de cicatrisation 3D	122
Table 12. Composants des tampons d'extraction et de dilution présents utilisés pour extraire la matrice extracellulaire	124
Table 13. Protocole d'un gel de western blot 6 et 10 %	128
Table 14. Anticorps utilisés en Western-Blot	128

Liste des abréviations

3DG : 3D-déoxyglucosone
ACC1 : Acetyl CoA carboxylase
ACTA2 : Actin Alpha 2
AFM : Microscopie à force atomique
AGEs : Advance Glycation End Products
AMPk : Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
BSA : Sérum d'albumine bovin
CDSN : Cornéodesmosine
CEL : N_{ϵ} -carboxy-ethyl-lysine
CML : N_{ϵ} -(carboxyméthyl) lysine
COL : Collagène
DAMPs : Danger-associated molecular patterns
DFU : Pied du diabétique
EGF : Epidermal Growth Factor
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
FAK : Focal Adhesion kinase
FAP : Fibroblasts Activation Protein
FAS : Fatty acid synthase
FBP1 : Fructose-1,6-biphosphatase
FGF : Fibroblast Growth Factor
FN3K : fructosamine-3-kinase (FN3K)
G-6-Pase : Glucose-6-phosphatase
GAG : Glycosaminoglycane
Glo1 : glyoxalase 1
Glo2 : glyoxalase 2
GSH : glutathion
H₂O₂ : Péroxyde d'hydrogène
HbA1c : Hémoglobine glyquée
HDMEC : Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HES : Hématoxyline Eosine Safran
HIF : Hypoxia-inducible factor
HO° : Radical hydroxyl
HOCl : Acide hypochloreux
IL : Interleukine
iNOS : forme inductible de NO synthase
IWGDF : Groupe de travail international sur le pied du diabétique
JDE : Jonction dermo-épidermique
LDs : Vésicules lipidiques
LKB1 : Liver kinase B1
LPK : Liver pyruvate kinase
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MEC : Matrice extracellulaire
MGP : Matrix Gla protein
MMP : Métalloprotéases
mTOR : Mammalian target of rapamycin
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NG2 : Neural glial antigen 2
NHDF : Normal Human Dermal Fibroblasts

NHEK : Normal Human Epidermal Keratinocytes
NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NOD : Non Obese Diabétique
NTN1 : Nétrine 1
NZO : Obèses Néo-zélandaise
OCT1 : Organic cation transporter 1
PAF : Platelet-Activating Factor
PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDPN : Podoplanine
PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxylase
PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
PKA : Protein kinase A
PLIN : Périlipines
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
PTB : N-phenacylthiazolium bromide
RAGE : Receptor for Advanced Glycation End products
REG : Réticulum Endoplasmique Granuleux
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SPR : Small proline rich
sRAGE : forme soluble du récepteur aux AGEs
SREBP : Sterol regulatory element binding protein 1
STZ : Streptozotocine
T1D : Diabète de type I
T2D : Diabète de type II
TCA : Trichoroacide
TGF- β : Transforming Growth Factor
TIMPs : Tissue Inhibitors of Metalloproteases
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale
TORC2 : The target of rapamycin complex 2
VEGF : Vascular endothelial growth factor
 α -SMA : α -Smooth muscle actin

INTRODUCTION

GENERALE

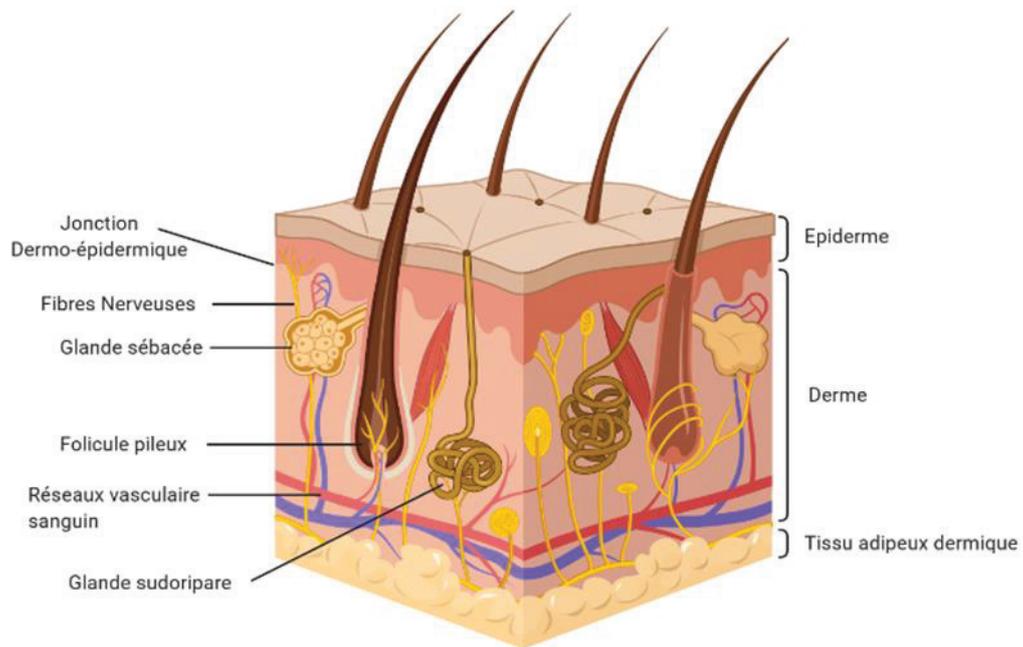


Figure 1. Structure et composition de la peau humaine

L'épiderme est composé en majorité de kératinocytes et correspond au compartiment le plus superficiel de la peau. La jonction dermo-épidermique délimite l'épiderme du derme sous-jacent vascularisé qui est composé en majorité de fibroblastes. Le derme comporte également de nombreuses annexes cutanées. Le tissu adipeux dermique est situé en profondeur et est composé principalement d'adipocytes.

Schéma réalisé sur Biorender

1 La peau

1.1 Structure

La peau joue un rôle social très important, en reflétant l'image que le sujet a de lui-même : c'est incontestablement l'interface entre l'individu et la société. C'est aussi le reflet de notre santé, de nos origines ethniques, de nos émotions et de notre âge. Mesurant entre 1,8 et 2 m² et représentant 15 % du poids total de l'adulte, la peau est l'organe le plus étendu du corps humain (Kanitakis 2002).

Outre son importance sociétale et personnelle, la peau remplit de nombreuses fonctions vitales. Ses propriétés mécaniques lui confèrent une résistance aux agressions physiques. Son pH acide, ses fonctions immunitaires, son microbiote et la production de peptides antimicrobiens empêchent la pénétration d'agents pathogènes ou allergènes. La pigmentation cutanée permet, elle, de protéger l'organisme des rayons solaires. Au-delà de ses capacités de protection, la peau régule les échanges entre le milieu intérieur et extérieur, en assurant l'équilibre des entrées et sorties d'eau pour éviter la déshydratation. C'est aussi un lieu de thermorégulation, de par les échanges thermiques qui s'y opèrent via le réseau vasculaire et l'élimination de la chaleur par la sueur. L'innervation sensitive permet la perception d'informations venant de l'extérieur et dépend de nombreux récepteurs cutanés. Par exemple, les mécano-récepteurs vont permettre de ressentir les vibrations, la pression, le toucher alors que les thermo-récepteurs vont, quant à eux, intervenir dans la perception de la chaleur. La peau est aussi métaboliquement active par la production de vitamine D3 sous l'effet des rayons UVB. L'ensemble de ces caractéristiques participe à ce qui est défini comme la fonction barrière de la peau. Le développement et le maintien d'une peau saine avec une barrière cutanée pleinement fonctionnelle est le rôle ultime d'une peau normalement développée et mature.

La peau est constituée de 3 couches distinctes mais cohésives : l'épiderme en surface, le derme et le tissu adipeux dermique en profondeur (Figure 1). Chez l'homme, l'épaisseur de ces couches varie considérablement en fonction de la localisation anatomique. Concernant le derme, il est le plus épais sur le dos où il est 30 à 40 fois plus épais que l'épiderme sus-jacent.

Des annexes cutanées sont également présentes comme des glandes sécrétrices (sudoripares et sébacées) et des follicules pileux (Figure 1). La jonction dermo-épidermique (JDE) assure la cohésion entre le derme et l'épiderme et est constituée d'une structure particulière appelée la lame basale.

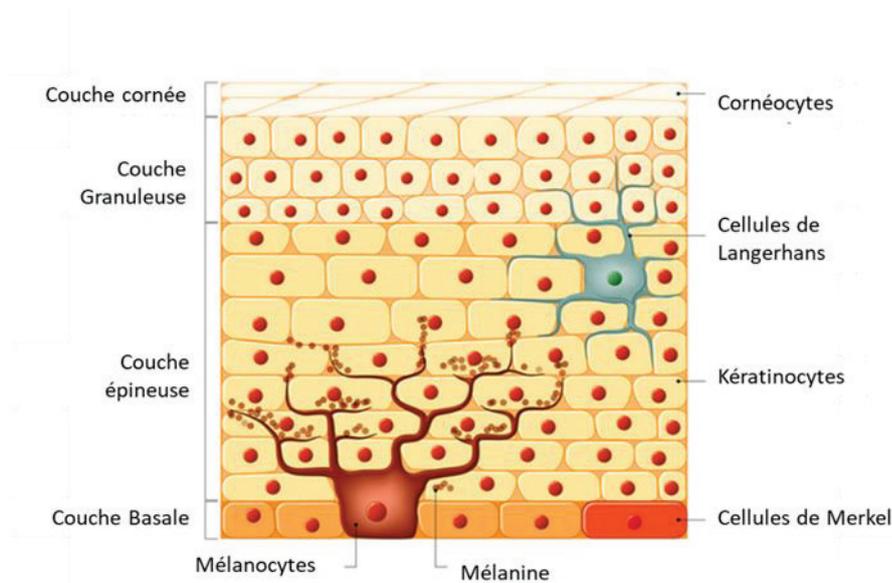


Figure 2. Structure de l'épiderme et composition cellulaire

Les kératinocytes sont les cellules majoritaires de l'épiderme. Les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langerhans sont les autres types cellulaires décrits dans l'épiderme (leur localisation est indiqué sur ce schéma).

Image issue de www.vectorstock.com

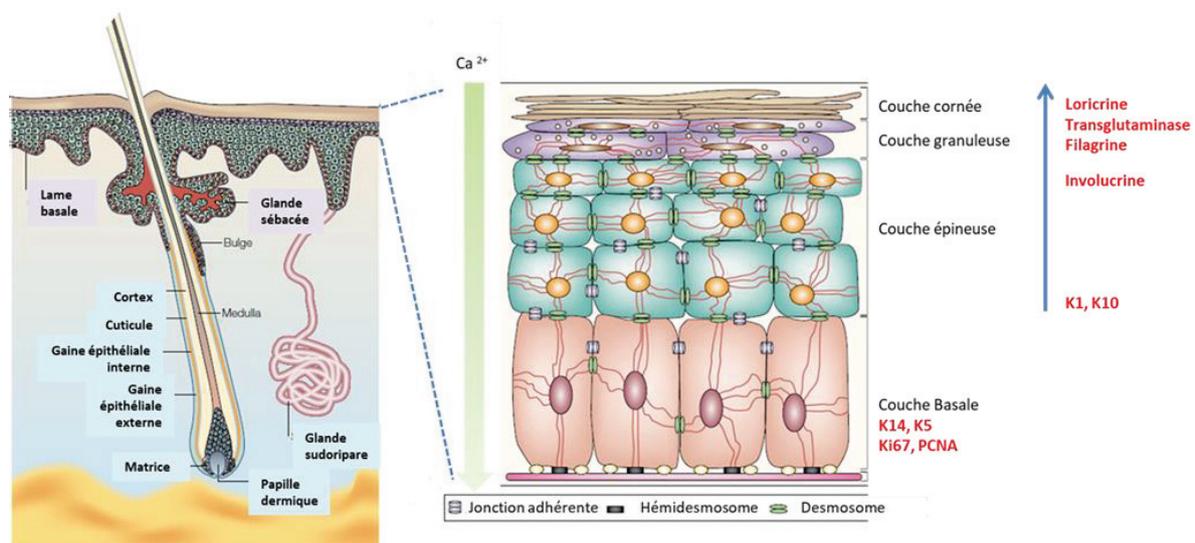


Figure 3. Marqueurs spécifiques de l'épiderme

L'épiderme est constitué de différentes couches de plus en plus différenciées depuis la couche basale jusqu'à la surface. Des exemples de protéines spécifiques de ces différentes couches sont ici renseignés.

D'après (Fuchs and Raghavan 2002)

1.1.1 Epiderme

L'épiderme est un tissu épithélial pavimenteux pluristratifié et kératinisé. D'origine ectodermique, il forme le tissu le plus externe de la peau. Son épaisseur moyenne est de 100 µm et varie selon la région anatomique. L'épiderme le plus fin est celui de la paupière, il mesure moins de 0,1 mm. Au contraire au niveau des paumes et de la plante des pieds, la couche épidermique est très épaisse et peut mesurer jusqu'à 1,5 mm. Le film hydrolipidique produit par les glandes sébacées et les kératinocytes, participe à la fonction barrière. L'épiderme est kératinisé et imperméable, les pertes hydro-électrolytiques sont contrôlées et la pénétration d'éléments exogènes est limitée. Ces fonctions sont essentielles puisque la peau n'est pas une surface plane, elle comporte environ 5 millions d'appendices tels que les follicules pileux et les canaux sudoripares (Figure 1). La surface estimée à 2m² est en réalité considérablement augmentée par la présence de ces appendices. Il a été estimé à 25 m² la surface accessible par l'ensemble des bactéries qui colonisent la peau : le microbiote (Gallo 2017). L'épiderme est constitué à 90 % de kératinocytes, les 10% restant correspondent à des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel (Figure 2).

Pour former l'épiderme, les kératinocytes passent par un programme de différenciation étroitement régulé. Du plus profond vers la surface de la peau, on distingue la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Goleva et al. 2019) (Figure 2).

Les kératinocytes de la couche basale prolifèrent et les cellules filles migrent en surface suivant une différenciation morphologique et biochimique : la kératinisation qui peut prendre jusqu'à 28 jours (Kanitakis 2002). Il existe un grand nombre de kératines qui s'expriment dans l'épiderme depuis la couche basale jusqu'à la desquamation, seules les plus importantes seront décrites ici (Figure 3).

1.1.1.1 Couche basale

Les kératinocytes de la couche basale sont organisés en une seule couche cellulaire. Les cellules sont cubiques ou prismatiques, jointives et mesurent entre 6 et 10 µm avec un large noyau basophile. La couche basale correspond au compartiment prolifératif, elle contient des cellules souches qui vont permettre le renouvellement constant de l'épiderme, tout en assurant le renouvellement du compartiment souche (Fortunel and Martin 2012). Les cellules mitotiques se situent le plus souvent dans le creux des crêtes épidermiques et à l'intérieur des annexes cutanées et sont responsables d'un renouvellement complet de l'épiderme. Seulement 15 % des cellules basales sont impliquées dans le renouvellement physiologique et perpétuel, les autres sont dans un état de quiescence et n'interviennent qu'en cas de lésions cutanées (Baroni et al. 2012, Blanpain and Fuchs 2006). Des marqueurs prolifératifs tels que Ki67 ou PCNA sont retrouvés au niveau de la couche basale.

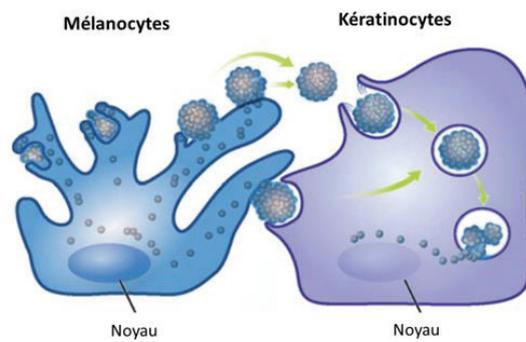


Figure 4. Mélanogenèse et phagocyte des mélanosomes par les kératinocytes

Description du mécanisme de sécrétion des mélanosomes par les mélanocytes qui sont phagocytés par les kératinocytes. La mélanine est ensuite dispersée en position apicale des noyaux des kératinocytes.

D'après (Ando et al. 2012)

Les principales protéines structurelles de l'épiderme sont les kératines. Les kératines prédominantes au niveau de la couche basale sont la K14 et la K5. Elles s'assemblent en hétéro-dimères pour former un réseau de filaments intermédiaires de 10 nm organisé en tonofilaments autour du noyau (Blanpain and Fuchs 2006, Jacob et al. 2018). Le réseau de kératine est associé aux héli-desmosomes qui assurent l'ancrage de l'épiderme à la JDE sous-jacente, et aux desmosomes qui permettent d'assurer un lien fort entre cellules adjacentes (Basler et al. 2016, Fuchs and Raghavan 2002)(Figure 3). Les kératinocytes basaux expriment également des intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ qui assurent la cohésion à la JDE. De plus, on note la présence de jonctions adhérentes qui forment un pont entre les cytosquelettes d'actine de cellules voisines (Fuchs and Raghavan 2002). Les kératines 14 et 5 jouent également un rôle dans le maintien de la capacité de prolifération des kératinocytes et empêchent l'entrée en différenciation (Alam et al. 2011).

Dans la couche basale, les mélanocytes sont à l'origine de la pigmentation cutanée. On retrouve un mélanocyte pour 4 à 10 kératinocytes basaux (Kanitakis 2002). Grâce à leurs prolongements, les mélanocytes sont en contact avec 30 à 40 kératinocytes dans l'épiderme (Figure 2). Ils sont responsables de la synthèse de mélanine qui est empaquetée dans des mélanosomes Figure 4) (Ando et al. 2012). Les mélanosomes sont phagocytés par les kératinocytes puis la mélanine se disperse en position apicale des noyaux des kératinocytes afin de les protéger des rayons UV et ce mécanisme concerne plus particulièrement les noyaux des cellules souches (Figure 4).

Les cellules de merkel représentent une petite partie de la population cellulaire de la couche basale (Figure 2). Elles participent à la mécano-réception et plus particulièrement à la sensibilité tactile (Boulais 2007). En réponse à des stimuli, des neuropeptides sont libérés dans l'espace intercellulaire jusqu'aux terminaisons nerveuses cutanées (Misery and Gaudillere 1996, Tachibana 1995).

1.1.1.2 Couche épineuse

La couche épineuse s'organise en 5 à 15 couches de cellules volumineuses de 10 à 15 μm qui s'aplatissent de plus en plus vers les couches les plus superficielles (Kanitakis 2002). Le cytoplasme des kératinocytes épineux est éosinophile et comporte un noyau volumineux et vésiculeux. Les kératines 1 et 10 commencent à s'exprimer dans ce compartiment et sont très bien organisées en tonofilaments. Il existe une grande cohésion entre les cellules avec un nombre important de desmosomes. En effet, l'abondance des desmosomes donne un aspect épineux aux cellules lors des

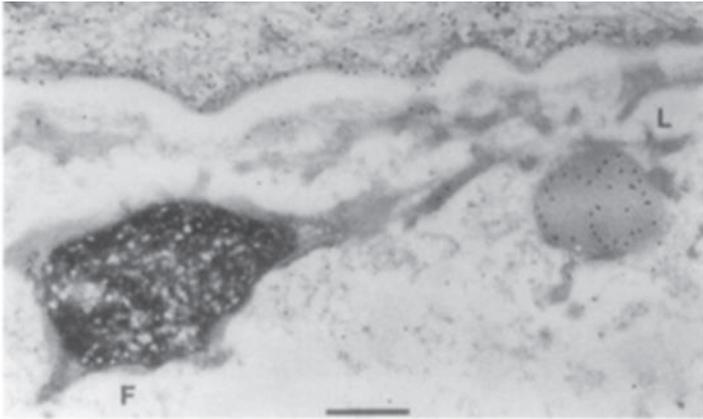


Figure 5. Différents granules de kératohyaline dans un kératinocyte de la couche granuleuse

Observation au microscope électronique à transmission d'un épiderme de souris. F indique les granules F qui renferment la pro-fillagrine. L, indique les granules L qui contiennent la loricrine. Barre d'échelle = 0,5 μm .

D'après (Ishitsuka and Roop 2020)

préparations histologiques avec la rétractation des membranes cytoplasmiques (Eckert and Rorke 1989, Viac et al. 1985). C'est d'ailleurs de cette observation qu'est né le nom de cette couche. C'est ici que commence à s'exprimer l'involucrine qui est le premier précurseur de l'enveloppe cornée. Nous retrouvons également des cellules de l'immunité appelées cellules de Langerhans qui sont présentatrices d'antigènes et classer comme cellule dendritiques (Figure 2) (Deckers et al. 2018).

1.1.1.3 Couche granuleuse

1 à 3 couches de kératinocytes correspondent à la couche granuleuse qui est la dernière couche nucléée de l'épiderme. Les cellules sont aplaties et avec un noyau ovale. La chromatine, l'appareil de Golgi et les mitochondries commencent à se raréfier. Les tonofilaments de kératine 1 et 10 sont répartis de façon aléatoire. Le nom de cette couche est dû à la présence de granulation car y sont retrouvés des corps lamellaires et des granules de kératohyaline qui vont être essentiels à la synthèse de l'enveloppe cornée.

Les corps lamellaires d'Odland sont issus de l'appareil de Golgi et possèdent une double membrane (Tarutani et al. 2012). Au pôle apical de la couche granuleuse, les corps lamellaires déversent leur contenu dans l'espace intercellulaire et transportent des lipides de type cholestérol et acides gras saturés mais aussi des protéines comme la cornéodesmosine (CDSN) (Hafttek et al. 1997, Jonca et al. 2011). Ces corps lamellaires sont impliqués dans le processus de desquamation et de formation d'une couche péri-cellulaire lipidique. Cette couche lipidique agit comme une barrière contre les substances étrangères hydrophiles (Kanitakis 2002, Lee S. H. et al. 2006, Ponc et al. 2001). Les granules de kératohyaline sont volumineux, et basophiles (Freeman and Sonthalia 2020). Ces granules ne comportent pas de membranes externes puisqu'il s'agit d'agrégats de protéines insolubles (Freeman and Sonthalia 2020). On distingue les « granules F » de forme irrégulière, et les « granules L » plus petits et de forme ronde (Figure 5) (Steven et al. 1990). Les granules F, renferment le précurseur de la filagrine, la pro-filagrine, sous une forme inactive et insoluble (Sandilands et al. 2009). Les granules L contiennent des précurseurs de l'enveloppe cornée comme la loritrine. C'est ainsi que les précurseurs de l'enveloppe cornée commencent à s'exprimer. L'involucrine déjà présente en petite quantité dans la couche épineuse s'accumule dans la couche granuleuse. On retrouve également la transglutaminase essentielle à la formation de l'enveloppe de la couche cornée.

1.1.1.4 Couche cornée

La couche cornée est la couche la plus externe de l'épiderme et marque le stade final de la maturation et du développement des kératinocytes. Elle est constituée de 4 à 20 couches de cellules

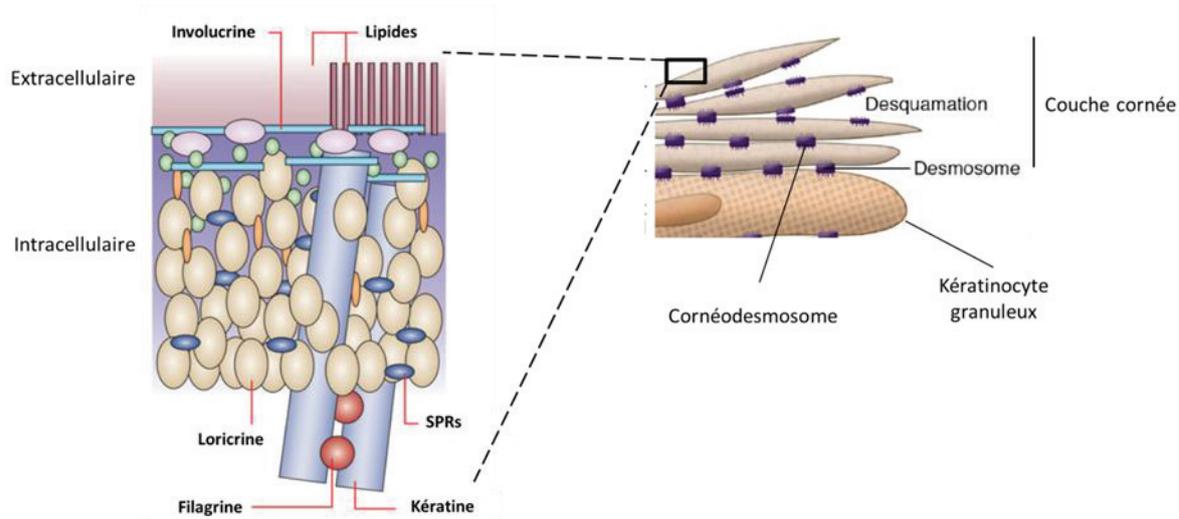


Figure 6. Structure de l'enveloppe cornée

Schéma représentant la structure et les principaux composants de l'enveloppe cornée.

D'après (Candi et al. 2005)

aplaties et kératinisées : les cornéocytes. Ils ne contiennent aucun organite cytoplasmique et pas de noyau. Tels des briques, les cornéocytes baignent dans une matrice extracellulaire lipidique qui fait office de mortier. Cette organisation permet de réguler la perméabilité, d'initier la desquamation, d'exclure les toxines et de mettre en place une absorption chimique sélective, tout en ayant une activité peptidique anti-microbienne (Bosko 2019, Egawa and Kabashima 2018, Goleva et al. 2019). La couche cornée est divisée en stratum conjunctum, profond dense et cohésif et en stratum disjunctum, plus lâche et en superficie (Murphrey et al. 2020). Dans la couche cornée, ce sont les cornéo-desmosomes qui sont responsables de la solidarité des cornéocytes (Figure 6.). Pour ce faire, les corps lamellaires libèrent de la cornéodesmosine qui va s'incorporer au niveau des desmosomes à l'origine des cornéo-desmosomes (Figure 6) (Jonca et al. 2011, Robinson et al. 1997). La protéolyse des cornéo-desmosomes au niveau du stratum disjunctum participe au phénomène de desquamation (Caubet et al. 2004, Eckhart et al. 2013).

L'enveloppe cornée est une coque protéique insoluble et rigide qui remplace la membrane plasmique (Figure 6). La concentration en calcium augmente de plus en plus dans les couches supra-basales (Figure 3) et ce phénomène est au cœur de la formation de l'enveloppe cornée. Son assemblage se déroule en plusieurs étapes (Kalinin et al. 2001). Durant l'initiation au niveau de la couche épineuse, l'envoplakine, la périplakine et l'involucrine s'associent à la membrane plasmique de façon dépendante du calcium et via la transglutaminase 1 et 5. Petit à petit l'envoplakine, la périplakine et l'involucrine forment une couche mono-moléculaire le long de la surface interne de la membrane plasmique (Figure 6). Au pôle apical de la couche granuleuse, les corps lamellaires commencent à déverser leur contenu lipidique dans l'espace extracellulaire. Les glucosylcéramides et la sphingomyéline sont convertis en céramides et les phospholipides sont convertis en acides gras libres et en glycérol (Feingold 2007). Par la suite, la transglutaminase 1 lie une partie des oméga-hydroxycéramides et des acides gras libres à la face externe de l'enveloppe (Eckhart et al. 2013, Nemes and Steinert 1999). L'augmentation du calcium participe également à la dégradation des granules F de kératohyaline au pôle apical de la couche granuleuse. La pro-filagrine est alors déphosphorylée et soumise à protéolyse pour libérer de nombreux monomères de filagrine (Sandilands et al. 2009). Au niveau de la couche cornée, ces monomères se lient et enveloppent les filaments intermédiaires de kératine 1 et 10. Le réseau de kératine s'agrège et s'épaissit, ce qui a pour effet de condenser le cytosquelette des kératinocytes. La phase la plus tardive de la formation de l'enveloppe cornée est l'ajout de loricrine. Plus de 80% de l'enveloppe est constituée de loricrine qui est complexée à des nombreuses protéines SPR (Small proline rich) via la transglutaminase 1 et 3 (Kalinin et al. 2001) (Figure 6).

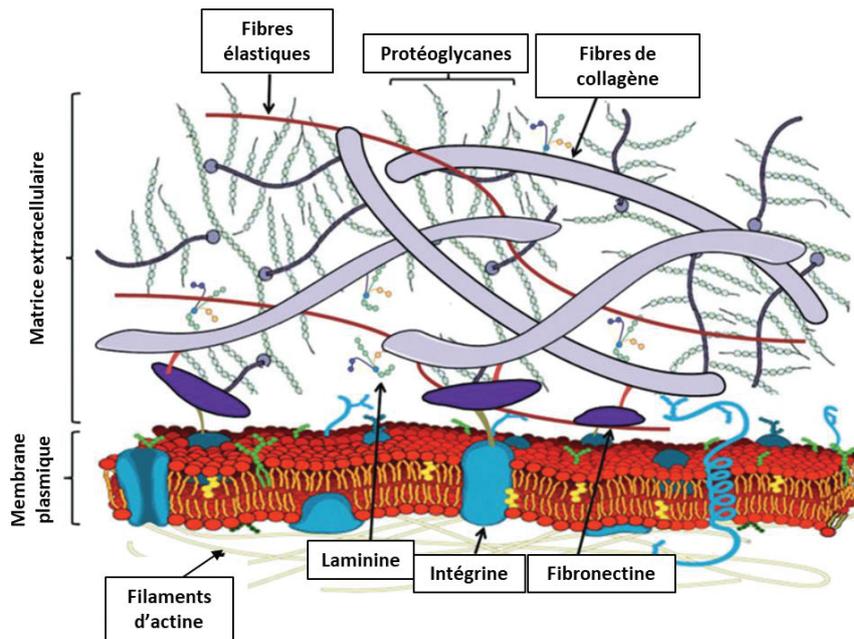


Figure 7. Organisation complexe de la matrice extracellulaire dermique

De nombreuses protéines interviennent dans l'organisation de la matrice extracellulaire dermique. Leur interaction bien définie est essentielle pour l'adhésion à la matrice et leur migration au sein de celle-ci.

D'après (Xue M. and Jackson 2015)

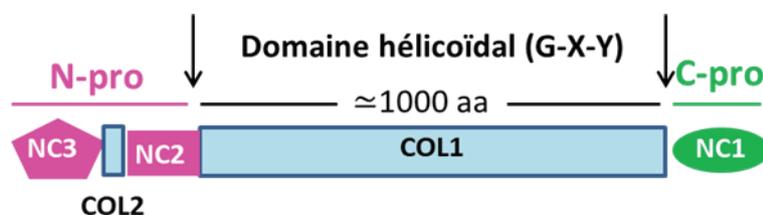


Figure 8. Différents domaines moléculaires des collagènes fibrillaires

Description de la structure moléculaire des collagènes fibrillaires. G : Glycine, X est souvent la proline et Y l'hydroxyproline, COL : domaine hélicoïdal collagénique, NC : parties non collagéniques globulaires, aa : acides aminés. Les flèches indiquent le lieu de clivage des extrémités par les N- et C-protéases.

Réalisée sur power point

1.1.2 Derme

D'origine mésodermique, le derme est un tissu conjonctif innervé et vascularisé. Composé d'une matrice extracellulaire (MEC) riche, sécrétée par les fibroblastes, le derme est un tissu nourricier et de soutien qui assure la résistance mécanique de la peau. Les fibroblastes sont les cellules les plus abondantes et sont responsables de la synthèse de la MEC et de son remodelage via l'expression de métallo-protéases (MMPs). La MEC du derme est un ensemble de macromolécules de type glycoprotéines (dont les collagènes), protéoglycanes et élastine (Figure 7). On distingue le derme papillaire et le derme réticulaire, dans lesquels il a été montré que les fibroblastes sont issus de lignées différentes (Driskell et al. 2013).

1.1.2.1 Composants de la matrice extracellulaire

La MEC dermique a longtemps été décrite comme inerte et passive. En réalité, elle présente un rôle actif et complexe en régulant la prolifération, la migration, la différenciation et la mort cellulaire. De plus, il existe de nombreuses pathologies associées à des mutations des composants de la matrice.

1.1.2.1.1 La grande famille des collagènes

Les collagènes sont des molécules trimériques composées de 3 chaînes polypeptidiques α , qui contiennent n répétitions d'une séquence (Glycine-X-Y) où X est souvent la proline et Y l'hydroxyproline (Ricard-Blum and Ruggiero 2005). Ces répétitions permettent la formation d'une triple hélice droite qui est caractéristique de la superfamille du collagène. L'association des chaînes en triple hélice peut se faire de façon homotrimérique avec des chaînes identiques ou en hétérotrimère avec des chaînes différentes. De façon générale, les chaînes α contiennent un domaine hélicoïdal collagénique (COL) central, flanqué par des parties non collagéniques globulaires (NC) qui seront clivées une fois sécrétées dans l'espace extracellulaire.

Aujourd'hui, on dénombre 28 membres génétiquement distincts numérotés en chiffre romains de I à XXVIII. Dans le derme, on distingue 3 sous-familles de collagènes, les collagènes I, III et V dit fibrillaires, les collagènes XII, XIV et XVI dit FACITS (Fibril associated collagen with interrupted triple helix) associés aux fibres de collagène et enfin le collagène VI, seul membre de sa famille, qui va former des filaments perlés qui s'enroulent autour des faisceaux de collagène fibrillaires (Ruggiero et al. 2005). Il existe également des collagènes qui forment des filaments d'ancrage comme le collagène VII présent à la jonction dermo-épidermique.

La sous-famille des collagènes fibrillaires est la plus abondante dans le derme. Ils sont constitués d'une large région collagénique ininterrompue de 300 nm avec environ 1000 acides aminés (COL1), ainsi que d'un petit domaine hélicoïdal en N-terminal (COL2) (Figure 8). Les régions non

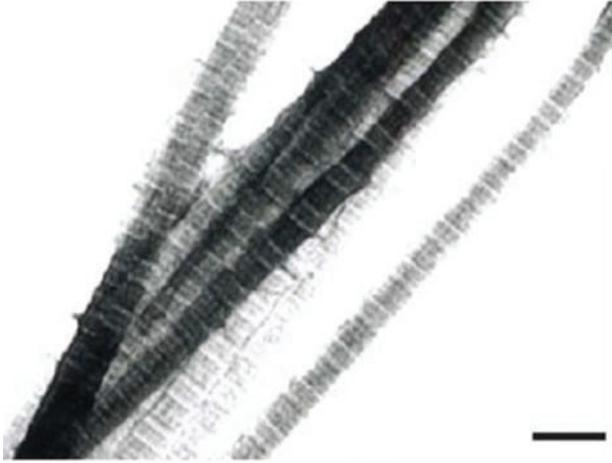


Figure 9. Ultrastructure des fibres de collagène

Observation au microscope électronique à transmission de fibre de collagène qui révèle la striation périodique des fibres.

Figure extraite de (Ricard-Blum and Ruggiero 2005)

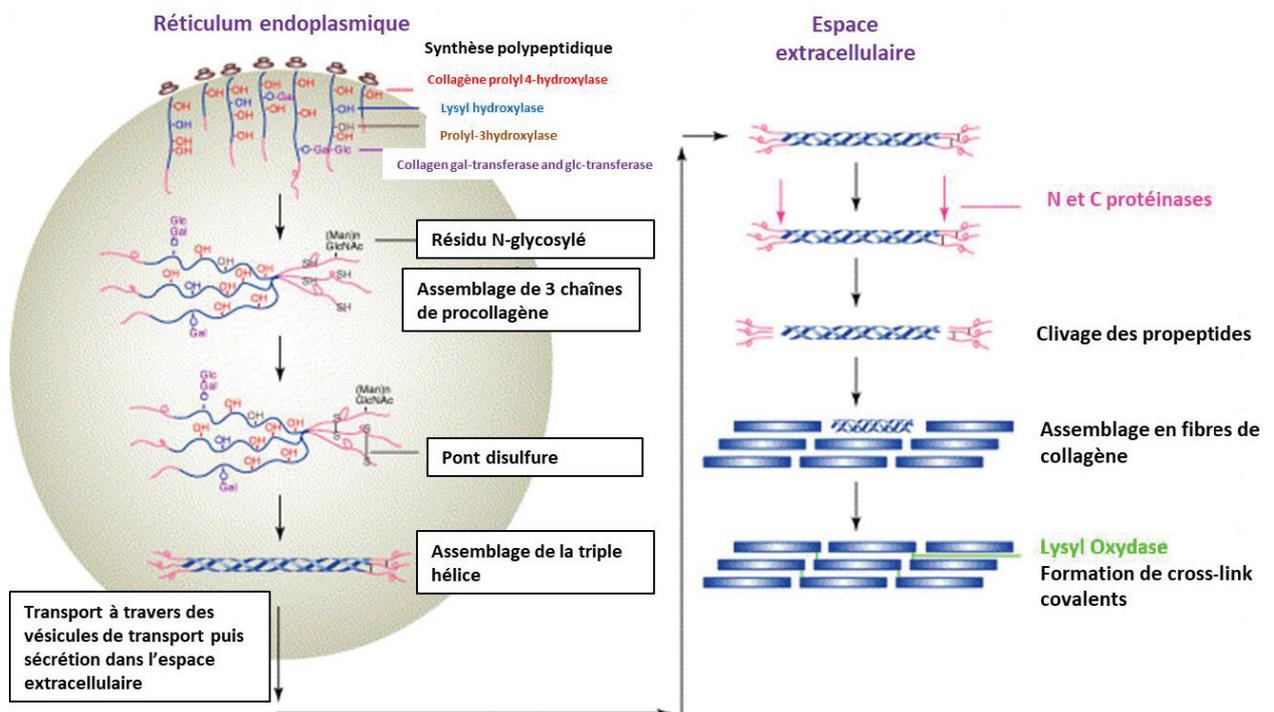


Figure 10. Synthèse des collagènes fibrillaires.

Description détaillée de la synthèse des collagènes fibrillaires depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à la formation de fibres organisées en réseau dans l'espace extracellulaire.

D'après (Myllyharju and Kivirikko 2004)

collagéniques sont NC1 en C-Terminal et NC2 / NC3 en N-terminal, elles seront clivées dans l'espace extracellulaire lors de la maturation du collagène (Figure 8).

Ces collagènes fibrillaires partagent la capacité unique de s'agréger en des fibres hautement organisées avec un modèle ultra-structural en répétitions de bandes qui forme des striations (Figure 9). Les collagènes les plus présents dans le derme sont les collagènes I, III et V, leur ratio et leur assemblage est très contrôlé et est essentiel dans la fibrillogenèse. Le collagène V forme des fibres hétérotypiques avec le collagène I afin de réguler le diamètre des fibres (Birk 2001).

La biosynthèse de ces collagènes à partir de leur ARNm débute à la surface du réticulum endoplasmique granuleux (REG) (Figure 10). Au fur et à mesure de leur synthèse, les chaînes pro- α rentrent dans le REG où elles vont subir des modifications post-traductionnelles de type glycosylation et hydroxylation des résidus proline et lysine (Myllyharju and Kivirikko 2004). Les chaînes pro- α se lient par 3 via leur extrémité C-terminale au niveau du domaine NC1 et s'assemblent ensuite en triple hélice pour donner naissance au pro-collagène (Figure 10). Les molécules de pro-collagène, sont transportées dans des vésicules de transport du REG vers l'appareil de golgi. Durant ce transport, les molécules commencent à s'agréger latéralement et sont prêtes pour être sécrétées (Bonfanti et al. 1998). Une fois dans l'espace extracellulaire, les extrémités C- et N- terminales (appelées N- et C-propeptides) sont clivées par des N- et C-protéases (Figure 10). Le collagène ainsi maturé s'assemble progressivement en fibres, et ce réseau est enfin consolidé par l'action de la lysyl oxydase qui va former des « cross link » entre les fibres.

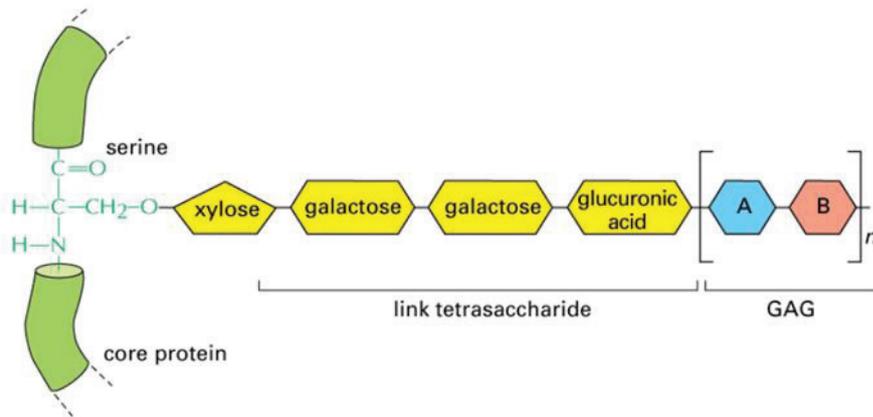


Figure 19-39. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 11. Organisation moléculaire des protéoglycanes

Schéma représentant l'association d'une protéine via une sérine à un GAG (glycosaminoglycane) pour former un protéoglycane. A et B sont des exemples de GAG (chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, kératane sulfate, héparine sulfate, héparine, acide hyaluronique) répétés n fois.

Issue de 4^{ème} édition de Molecular Biology of the Cell

1.1.2.1.2 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes correspondent à l'association d'une protéine avec un glycosaminoglycane (GAG) via un tétrasaccharide lié à une sérine d'une protéine (Figure 11). La composition structurale d'un GAG se base sur la répétition d'unités disaccharidiques. Il existe 6 types de GAGs : la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate, l'héparine et l'acide hyaluronique (Lee D. H. et al. 2016b, Oh et al. 2011, Taylor and Gallo 2006). La chaîne de sucre est synthétisée dans l'appareil de golgi via des glycosyl-transférases. L'acide hyaluronique est une exception puisque sa synthèse s'effectue à la membrane plasmique pour être sécrété directement dans la matrice extracellulaire.

Les GAGs contiennent de nombreux groupes carboxyles et sulfates chargés négativement, ainsi ils jouent un rôle important dans le maintien de l'eau dans les tissus et sont donc des éléments clés pour l'hydratation de la peau (Oh et al. 2011). Par exemple l'acide hyaluronique est capable d'absorber des molécules d'eau jusqu'à 1000 fois son poids moléculaire (Anderegg et al. 2014).

Les protéoglycanes participent à de nombreuses fonctions physiologiques comme l'adhésion et la migration cellulaire ou encore la formation de la jonction dermo-épidermique (Kolset and Tveit 2008, Parish 2006, Tkachenko et al. 2005). Par exemple, la décorine se lie à différents type de collagènes et de fibres élastiques pour réguler leur synthèse (Danielson et al. 1997). Au niveau de la membrane basale on retrouve le collagène XVIII et le perlécan qui est essentiel à la survie et à la prolifération des kératinocytes (Sher et al. 2006).

1.1.2.1.3 Les fibres élastiques

Alors que le collagène participe à la résistance aux forces de traction, les fibres élastiques contribuent à l'extensibilité et au retour à la normal de la peau, ce qui permet de résister à des déformations mécaniques répétées sans subir de dommages irréversibles.

Les fibres élastiques sont essentielles à l'homéostasie cutanée bien qu'elles ne représentent que 2 % de la portion dermique. Elles sont constituées à 90 % d'élastine qui va conférer les propriétés élastiques à la peau qui est soumise à de nombreux stress mécaniques. L'élastine est principalement produite par les fibroblastes, bien que les kératinocytes en soient également capables (Weihermann et al. 2017). Les fibres élastiques correspondent à l'association de 2 composants majeurs : un cœur interne d'élastine réticulé et insoluble avec une enveloppe externe microfibrillaire (Noblesse et al. 2004). Les microfibrilles sont principalement constituées de fibrilline associée à de nombreuses molécules MAGP (pour « Microfibril-Associated Glycoprotein » ; Fibuline ; protéoglycanes ...). La biosynthèse des fibres élastiques commence par la synthèse d'une forme soluble de l'élastine : la

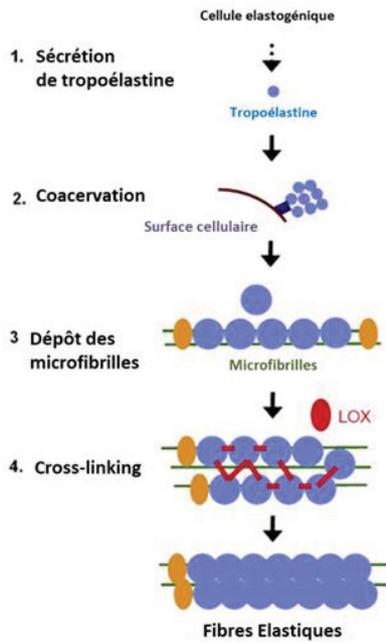


Figure 12. Synthèse des fibres élastiques
D'après (Yeo et al. 2011)

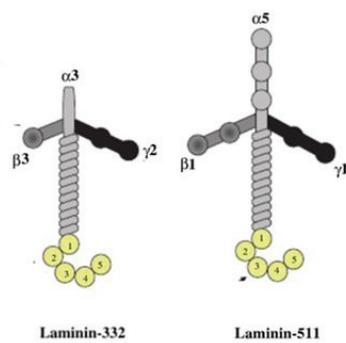


Figure 13. Structure des laminines 332 et 511
D'après (Sugawara et al. 2008)

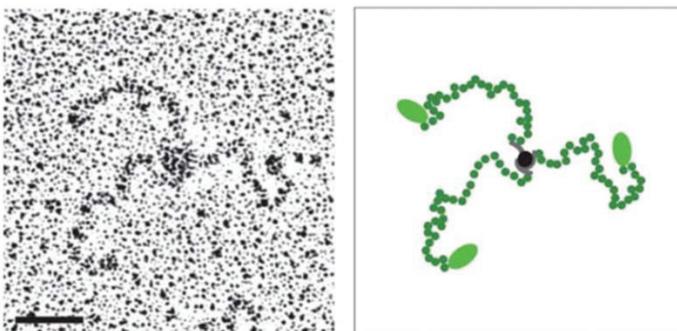


Figure 14. Structure de la Ténascine-X
Observation au microscope électronique à transmission de la Ténascine-X et sa représentation schématique sous forme de trimère. Barre d'échelle = 50nm. D'après (Valcourt et al. 2015)

tropo-élastine. Afin d'assurer sa stabilisation dans l'espace intercellulaire, la tropo-élastine se lie à l'EBP (Elastin Binding Protein) dans le réticulum endoplasmique, est transloquée dans l'appareil de golgi puis dans des vésicules de sécrétion jusqu'à l'espace extracellulaire (Davis and Mecham 1998, Hinek 1995, Hinek and Rabinovitch 1994). A la surface cellulaire, la tropo-élastine va s'agrèger, on parle de coacervation, puis elle va ensuite restée attachée à cette surface. Ces larges agrégats se déposent sur les microfibrilles et la lysyl oxydase permet alors la réticulation de la tropo-élastine sur les microfibrilles (Figure 12).

1.1.2.1.4 Autres protéines de la matrice

Les laminines sont de grandes glycoprotéines extracellulaires qui sont des composants essentiels des lames basales. Elles sont impliquées dans la liaison à la MEC mais aussi dans l'interaction cellule-matrice. Toutes les laminines sont composées de 3 chaînes : α , β et γ , qui sont assemblées grâce à des ponts disulfures. L'ultrastructure des laminines ressemble à une croix avec un large domaine globulaire à la base en C-terminal subdivisé en 5 sous-domaines qui font partie de la chaîne α (Figure 13). Le domaine globulaire représente le principal site d'interaction avec des récepteurs membranaires de type intégrine ou syndécan. Les laminines majoritaires au niveau de la peau sont la 332 et la 511, elles jouent un rôle important au niveau de la jonction dermo-épidermique (Rousselle and Beck 2013, Sugawara et al. 2008). La fibronectine est une protéine matricielle qui intervient dans l'adhésion, la migration, la prolifération et l'apoptose des cellules. Elle joue un rôle particulièrement important lors de la cicatrisation, elle peut être associée aux collagènes I et III afin de favoriser la prolifération ou le remodelage de la matrice (Patten and Wang 2020).

La famille des ténascines fait partie des protéines de la MEC avec 4 membres : les ténascines -X, -R, -W et -C. La ténascine-X est associée à de nombreux types de collagène et exerce une fonction architecturale cruciale. Elle est composée de 5 domaines distincts : un peptide signal, un domaine hydrophobe, une série de répétition de motifs EGF (Epidermal Growth Factor)-like, un nombre important de module de fibronectine III et un domaine de fibrinogène globulaire en C-terminale (Valcourt et al. 2015). La ténascine-X va s'organiser en trimère grâce aux extrémités N-terminales (Figure 14), elle fait partie intégrante du réseau de collagène, et régule notamment l'espace et la cohésion entre les fibres de collagène (Valcourt et al. 2015).

Famille	Nom	Exemple de substrat
Collagénases	MMP-1	Collagènes I, II, III, VII et X
	MMP-8	Collagènes I, II, III
	MMP-13	Collagènes I, II, III, IV, IX, X et XIV. Fibronectine, Laminines, Ténascine
Gélatinases	MMP-2	Collagènes I, IV, V, VII et X Fibronectine, Ténascine
	MMP-9	Collagènes I, III, IV, V et VII Elastine, Fibrilline
Stromélysines	MMP-3	Collagènes IV, V, IX et X Fibronectine, Elastine, Nidogène
	MMP-10	Collagènes IV, V, IX et X Fibronectine, Elastine, Laminines

Table 1. Exemple de MMPs et de leurs substrats

D'après (Caley et al. 2015)

1.1.2.2 Régulation de la matrice extracellulaire

Le remodelage et le renouvellement de la MEC sont régulés par des MMPs et par leurs inhibiteurs les TIMPs (pour Tissue Inhibitors of Metalloproteases). Différentes cellules de la peau sont capables de produire des MMPs : les fibroblastes, les kératinocytes, les neutrophiles ou encore les mastocytes. Les MMPs également appelées matrixines sont dépendantes du zinc et peuvent être classées en différents groupes selon leur substrat (Caley et al. 2015). On distingue par exemple les collagénases, les gélatinases ou encore les stromélysines, chaque MMP pouvant dégrader des substrats particuliers (Table 1).

Les MMPs vont jouer un rôle important lors de la cicatrisation, en permettant la migration des kératinocytes et des fibroblastes afin de refermer la plaie.

L'homéostasie de la matrice est finement régulée par la balance MMPs / TIMPs. Dans le cadre de la cicatrisation les MMPs et les TIMPs sont exprimées de façon très précise en fonction du stade. Un déséquilibre de l'homéostasie du derme peut mener à une fragilité cutanée importante de par la dégradation de divers composants de la matrice ou peut engendrer des défauts de cicatrisation (Dalton et al. 2005, Zigrino et al. 2016).

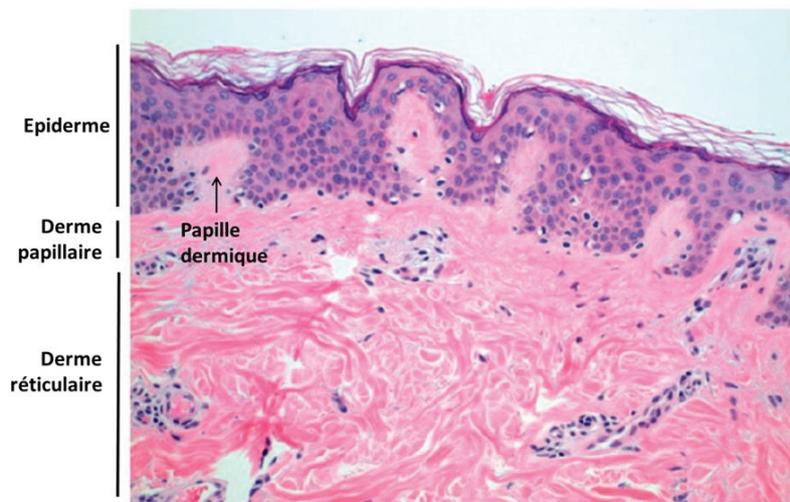


Figure 15. Histologie d'une peau humaine, organisation du derme

La photo représente une coupe transversale de peau humaine colorée à l'hématoxyline / éosine (HE) (x200).

D'après (Ji and Li 2016)

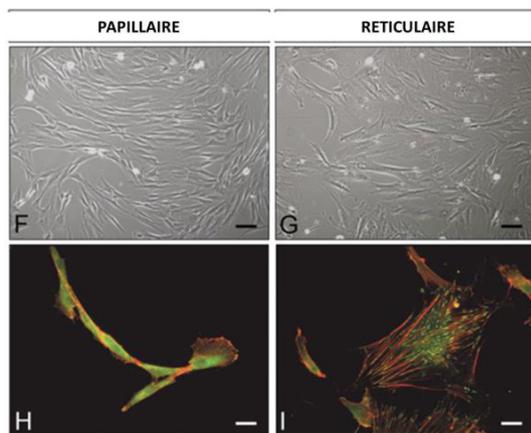


Figure 16. Différence entre les fibroblastes papillaires et réticulaires

F et G représentent des photographies à contraste de phase de fibroblastes papillaires et réticulaires respectivement. H et I représentent des fibroblastes papillaires et réticulaires respectivement après immuno-marquage de l'actine en rouge et de la vinculine en vert. Ces marquages permettent d'analyser le cytosquelette des cellules et d'observer leur capacité d'étalement. Barre d'échelle = 2,5 μm . D'après (Mine et al. 2008)

1.1.2.3 Organisation du derme

1.1.2.3.1 Derme papillaire

Le derme papillaire se situe sous la jonction dermo-épidermique, et présente des papilles dermiques qui forment des invaginations dans l'épiderme (Figure 15). Ces papilles dermiques permettent une plus grande surface de contact avec l'épiderme sus-jacent et logent les terminaisons nerveuses et des micro-vaisseaux (Schulze et al. 1997, Stucker et al. 2002). La densité cellulaire est importante, avec un fort taux de prolifération de fibroblastes fusiformes (Figure 16) (Janson D. G. et al. 2012, Mine et al. 2008). Les fibroblastes du derme papillaire régulent la croissance du poil et participent au contrôle du muscle arrecteur du poil (Driskell et al. 2013, Thulabandu et al. 2018). Le derme papillaire comprend une faible densité de collagène et les fibres élastiques sont moins riches en élastine, on retrouve surtout des microfibrilles (Meigel et al. 1977, Rippa et al. 2019). Il a été montré que les fibroblastes papillaires synthétisent plus de protéoglycanes que de collagènes et que leur sécrétion était plus bénéfique sur la viabilité et la survie des kératinocytes sus-jacent (Janson D. et al. 2017, Smith M. M. and Melrose 2015). Contrairement aux collagènes I, II et V qui sont présents dans toute la profondeur du tissu, il est possible de distinguer des collagènes spécifiques des régions papillaire et réticulaire.

Au niveau papillaire, on retrouve principalement du COL XII et XVI, mais Nauroy et al, montrent une augmentation de production du COL VII par les fibroblastes papillaires afin de participer à l'élaboration de la jonction dermo-épidermique (Nauroy et al. 2017, Ruggiero et al. 2005). Seuls quelques fibroblastes papillaires sont positifs pour le marquage α SMA, marqueur de la capacité de contraction des fibroblastes (Janson D. G. et al. 2012).

1.1.2.3.2 Derme réticulaire

Le derme réticulaire est présent plus en profondeur et représente la plus grande portion du derme. Cette partie est riche en collagènes (organisés en fibres denses) et en fibres élastiques qui participent à une MEC très ordonnée. Les fibroblastes réticulaires sont étalés et peu prolifératifs et sont à l'origine d'une grande production de MEC dans laquelle ils baignent (Driskell et al. 2013). L'élastine est présente en plus grande quantité et de façon surprenante un des marqueurs du derme réticulaire serait le collagène XI qui est principalement retrouvé au niveau du cartilage, il jouerait ici une fonction particulière qui reste à déterminer (Nauroy et al. 2017). On retrouve également du COL XIV qui apparaît au début du derme réticulaire et finit par envahir tout le derme.

La plupart des fibroblastes réticulaires expriment α -SMA de façon plus importante, ce qui leur confère une capacité de contractilité plus élevée (Janson D. G. et al. 2012, Wang J. et al. 2008).

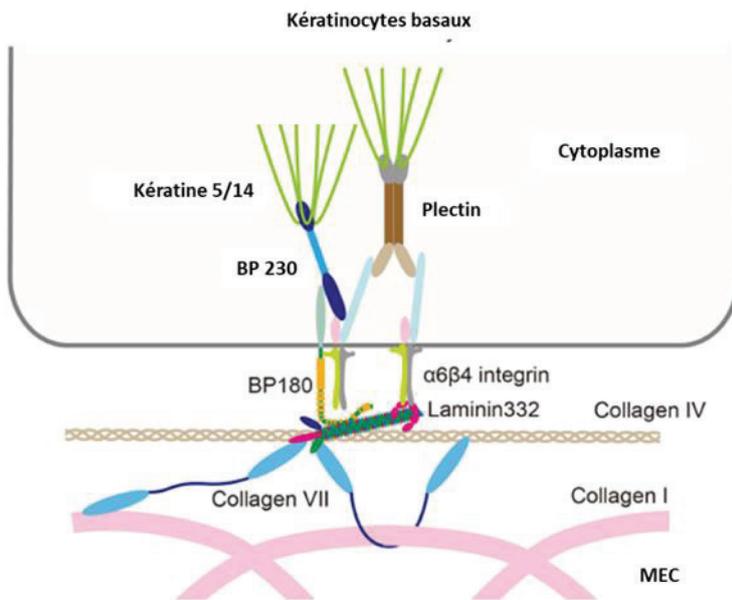


Figure 17. Jonction dermo épidermique

Schéma de la structure complexe de la jonction dermo épidermique qui permet de délimiter et de faire le lien entre l'épiderme et le derme sous-jacent.

D'après (Tasanen et al. 2019)

Récemment Korosec et al, ont découvert des marqueurs de surface qui discriminent les fibroblastes papillaires des réticulaires. L'association de FAP⁺ (Fibroblast Activation Protein) et CD90⁻ représente des fibroblastes avec un potentiel prolifératif important qui sécrètent PDPN (Podoplanine) et NTN1 (Nétrine 1), qui n'ont pas la capacité de se différencier en adipocytes (Korosec et al. 2019). Au contraire, les marqueurs FAP⁻ et CD90⁺ correspondent à des fibroblastes qui sécrètent ACTA2 (Actin Alpha 2), MGP (Matrix Gla protein), PPAR γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma) et CD36 et sont capables de suivre une différenciation adipogénique, ce qui est représentatif des fibroblastes réticulaires.

Il est important de noter que dans des conditions de culture *in vitro*, les fibroblastes papillaires se différencient petit à petit en fibroblastes réticulaires (Janson D. et al. 2013).

1.1.2.4 Jonction dermo-épidermique

La JDE est une structure très organisée qui permet de faire le lien entre l'épiderme et le derme sous-jacent. Il s'agit d'une lame basale qui sert de support d'ancrage de l'épiderme sur le derme et qui est essentielle pour réguler les échanges moléculaires et cellulaires. Elle permet le transport de nutriments venant du réseau vasculaire dermique jusqu'aux kératinocytes basaux. La JDE mesure de 50 à 100 nm et est constituée de protéines de haut poids moléculaire de type laminines, collagènes, nidogène et perlécan (Aumailley 2020, Behrens et al. 2012). Pour faire le lien entre le derme et l'épiderme, la laminine 332 est reliée aux intégrines $\alpha 6\beta 4$ exprimés par les kératinocytes basaux au niveau des héli-desmosomes (intégrine $\alpha 6\beta 4$, plectin, et de BP230 et 180) et des points de contact focaux (Borradori and Sonnenberg 1999) (Figure 17). Le réseau de collagène de type IV est relié aux laminines par le nidogène et le perlécan (Behrens et al. 2012). Le collagène VII intervient ensuite en faisant le pont entre le collagène IV et le collagène I du derme (Figure 17) (Tasanen et al. 2019).

1.1.3 Tissu adipeux dermique

Le tissu adipeux dermique intervient dans le stockage d'énergie, l'isolation thermique et le soutien mécanique (Alexander et al. 2015). Historiquement, on parlait de tissu adipeux sous cutané mais la nomenclature a changé récemment. En effet, il a été montré que chez l'homme il existe un tissu adipeux dermique, présent en grande majorité et sans délimitation distincte et un tissu adipeux sous cutané ayant une morphologie et des fonctions différentes (Cappellano et al. 2018, Driskell et al. 2014). Les cellules majoritaires du tissu adipeux dermique sont les adipocytes qui dérivent de

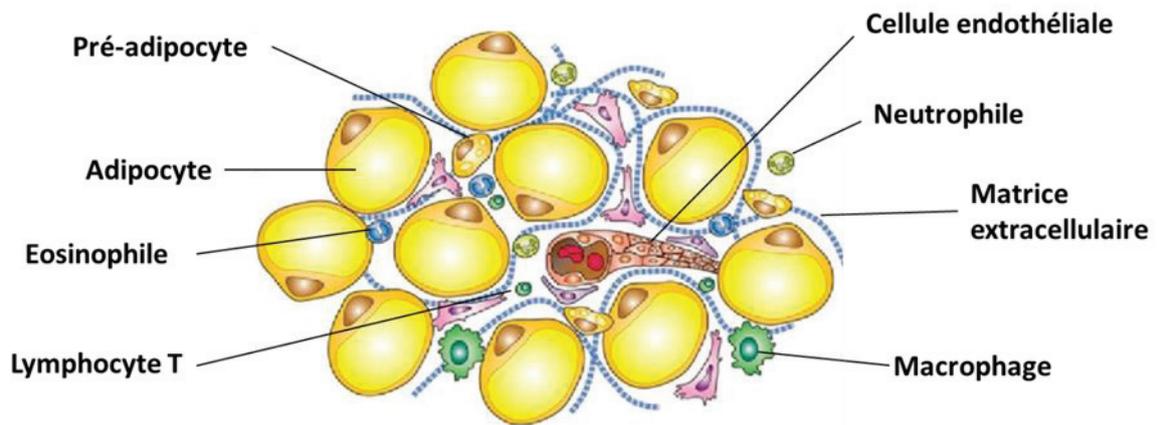


Figure 18. Adipocytes et fraction vasculaire stromale
 D'après (Alabdulkarim 2017)

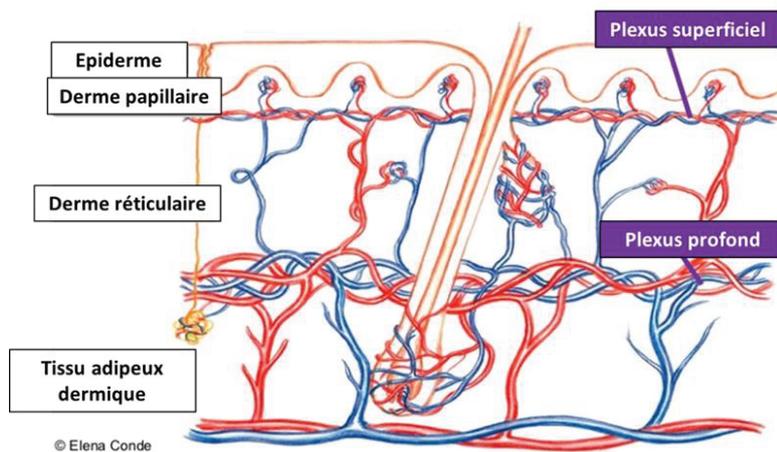


Figure 19. Réseau vasculaire cutané
 D'après : www.elenaconde.com

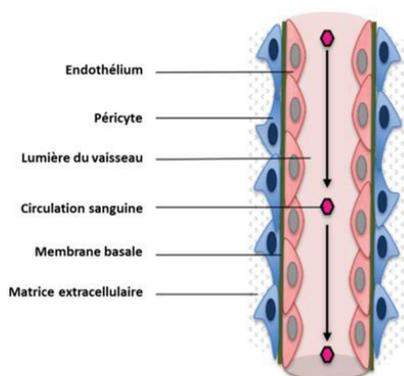


Figure 20. Composition des vaisseaux
 D'après (Brand et al. 2016)

précurseurs mésenchymateux appelés les pré-adipocytes (Chen S. X. et al. 2019, Macotela et al. 2012). Les adipocytes stockent les lipides sous forme de triglycérides et les libèrent sous forme d'acide gras. Ce mécanisme permet de gérer les réserves énergétiques selon les besoins de l'organisme (Flier 1995). Ce tissu est un tissu métaboliquement important car les adipocytes matures sécrètent de nombreuses molécules comme des adipokines mais aussi des cytokines (TNF α , IL-6) (Carey et al. 2006, Rosen and Spiegelman 2006). Les adipocytes sont entourés d'une fraction vasculaire stromale formée de MEC et de fibroblastes dispersés, de pré-adipocytes, de cellules souches, endothéliales et immunitaires (Figure 18) (Bi et al. 2019, Morris et al. 2015). Les cellules immunitaires représentent le second type de cellules les plus abondantes dans le tissu adipeux dermique. C'est en 2014 que Mraz et Haluzik l'ont décrit comme un organe immunitaire responsable d'une réponse inflammatoire locale dans le cas d'obésité ou de diabète (Mraz and Haluzik 2014). Dans des conditions physiologiques, les cellules immunitaires sont responsables de l'homéostasie du tissu car elles sont capables d'éliminer les cellules apoptotiques, d'induire le remodelage de la MEC et d'intervenir dans l'angiogenèse (Schipper et al. 2012).

1.1.4 Vascularisation cutanée

Dans la peau, la distribution du sang est assurée par des artères qui proviennent du tissu profond au niveau de l'hypoderme (Figure 19). Le sang nourrit et irrigue le derme en formant des plexus. Le plexus vasculaire profond se trouve entre le derme réticulaire et le tissu adipeux dermique, le plexus superficiel, dit papillaire, se trouve, quant à lui, à la jonction dermo-épidermique (Figure 19) (Deegan and Wang 2019). Ce réseau vasculaire organisé participe à la thermorégulation, la nutrition, la communication intercellulaire et à la réponse immunitaire.

Les vaisseaux matures sont entourés d'une membrane basale, composée principalement de collagène de type IV et recouverte de laminine avec des cellules musculaires lisses et des péricytes qui favorisent la survie des cellules endothéliales et permettent la stabilité des vaisseaux (Figure 20) (Carmeliet 2003). Les péricytes ont été décrits il y a plusieurs décennies et constituent un groupe cellulaire issu de la souche mésenchymateuse des cellules musculaires lisses (Crocker et al. 1970). Il s'agit de cellules coniques avec de long et fins processus cytoplasmiques qui s'étirent et entourent le tube endothélial. Ces cellules péri-vasculaires partagent la membrane basale des vaisseaux sanguins et des cellules endothéliales, elles influencent également la stabilité et la souplesse des vaisseaux. Les péricytes présentent des caractéristiques de cellules multipotentes, car elles peuvent se différencier en fibroblastes, cellules musculaires lisses ou encore en ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes (Farrington-Rock et al. 2004). Ces cellules présentent donc un intérêt important dans la réparation ou la régénération tissulaire.

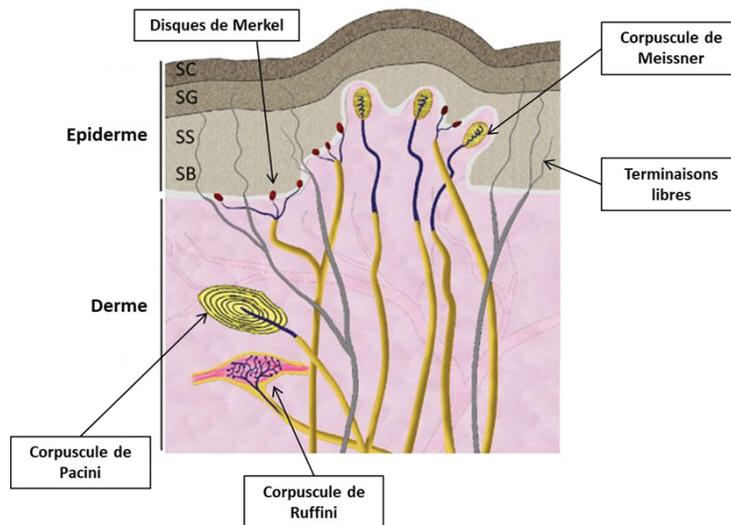


Figure 21. Innervation sensorielle de la peau

Le disque de Merkel correspond à la terminaison nerveuse en forme de disque qui rejoint une cellule de Merkel présente dans la couche basale de la peau. Les corpuscules de Meissner sont situés dans le derme papillaire et sont constitués de cellules lamellaires horizontales encastrées dans le tissu conjonctif. Les corpuscules de Pacini sont présents dans le derme profond et dans l'hypoderme, la capsule qui entoure la terminaison nerveuse est organisée en superposition lamellaire. Les corpuscules de Ruffini sont également présents dans le derme profond et correspondent à une capsule allongée en fuseau.

SC : Stratum Cornéum ; SG : Stratum Granulosum ; SS : Stratum Spinosum, SB : Stratum basal. D'après (Abraira and Ginty 2013)

1.1.5 Innervation cutanée

La peau est un organe sensoriel important, permettant de ressentir l'environnement, grâce à une innervation par le système nerveux périphérique. On distingue les fibres nerveuses sensibles qui sont majoritaires et les fibres nerveuses autonomes.

Les fibres nerveuses autonomes se limitent au derme en innervant les glandes sudoripares, le follicule pileux ou encore les vaisseaux sanguins. Des neuromédiateurs comme l'acétylcholine vont stimuler la sécrétion des glandes sudoripares (Gagnon and Crandall 2018).

Les fibres nerveuses sensibles innervent aussi bien le derme que l'épiderme et le tissu adipeux dermique sous forme d'un réseau tridimensionnel. Ces fibres sensibles permettent le sens du toucher et de la douleur par l'activation de mécanorécepteurs. Le toucher est médié par des fibres avec des terminaisons encapsulées comme les corpuscules de Meissner et de Pacini qui permettent les sensations de vibration, ou encore les disques de Merkel et les corpuscules de Ruffini qui transmettent la sensation du toucher avec pression (Figure 21) (Abraira and Ginty 2013, Lumpkin et al. 2010). Il existe également des terminaisons nerveuses libres qui participent à ces sensations.

D'autre part, les nocicepteurs vont être responsables de la sensation de douleur, les thermorécepteurs de la perception de la chaleur et enfin les pruricepteurs vont déclencher la sensation de démangeaisons (Misery 2014, 2020).

1.1.6 Annexes cutanées

1.1.6.1 Glandes sudoripares

Les glandes sudoripares sont classées en 2 grands types : eccrine et apocrine (Sato et al. 1989). Les glandes eccrines déversent la sueur à la surface de l'épiderme, les apocrines au niveau des follicules pileux. Durant l'exercice physique ou à la suite d'un stress, l'évaporation de la transpiration permet d'évacuer la chaleur. Il a été rapporté que nous perdons entre 0,2 à 3 L/h en fonction de notre activité physique et de notre environnement (Barnes et al. 2019). Entre 2 et 4 millions de glandes eccrines sont réparties sur la surface du corps, ce sont les plus nombreuses et elles sont responsables de la production du plus grand volume de transpiration. Les glandes eccrines sont composées de deux éléments fonctionnels constitués d'un épithélium tubulaire simple : un serpentin sécrétoire et un canal (Sato and Sato 1983). Elles permettent d'évacuer la transpiration composée principalement d'eau et de NaCl, mais il a été montré qu'elle contenait de nombreux micronutriments comme du K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , des vitamines mais également des métabolites, des cytokines et du cortisol (Baker and Wolfe 2020).

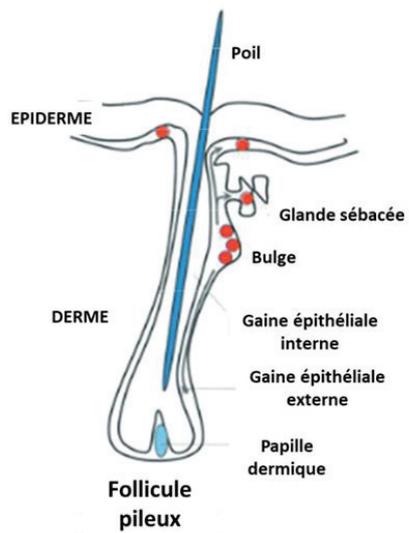


Figure 22. Follicule pileux

Le schéma représente un follicule pileux qui s'invagine dans le derme. Les points rouges correspondent à la localisation des cellules souches qui nichent dans cette structure.

D'après (Pastar et al. 2014)

1.1.6.2 Follicule pileux et glandes sébacées

La présence de poils et de cheveux est caractéristique des mammifères où ils interviennent dans de nombreux processus physiologiques comme : l'isolation thermique, la dispersion de la sueur, la protection physique ou encore les fonctions sensorielles et tactiles. Le follicule pileux est reconnu comme un mini-organe complexe de la peau qui constitue l'unité pilo-sébacée avec les glandes apocrines, le muscle arrecteur et les glandes sébacées (Schneider et al. 2009). Le follicule pileux plonge dans le derme et est composé d'une tige pileuse et de deux gaines épithéliales, une interne et une externe (Figure 22). Il se forme en grande majorité pendant le développement embryonnaire, leur nombre est donc déterminé dès la naissance. Les follicules pileux subissent un cycle bien précis. On distingue d'abord la phase de croissance dite anagène qui peut durer entre 2 et 6 ans. La phase suivante est une phase de transition de 2 à 3 semaines où le poil commence à régresser, il s'agit de la phase catagène. Le poil finit ensuite par se dégrader lors de la phase télogène. La libération du follicule pileux lors de la phase exogène permet de recommencer un cycle pour former un nouveau poil.

Les glandes sébacées sont holocrines et correspondent à des appendices multilobés constitués de sébocytes. Chargés en lipides, les sébocytes finissent par éclater et libérer leur contenu, le sébum, via leur canal à la surface de l'épiderme. Le sébum participe à la lubrification de la peau afin de protéger du dessèchement, des rayonnements solaires et il possède des propriétés bactériostatiques et fongistatiques (Shamloul and Khachemoune 2020).

L'unité pilo-sébacée loge de nombreuses cellules souches au niveau du bulge du follicule pileux et des glandes sébacées (Figure 22) (Pastar et al. 2014).

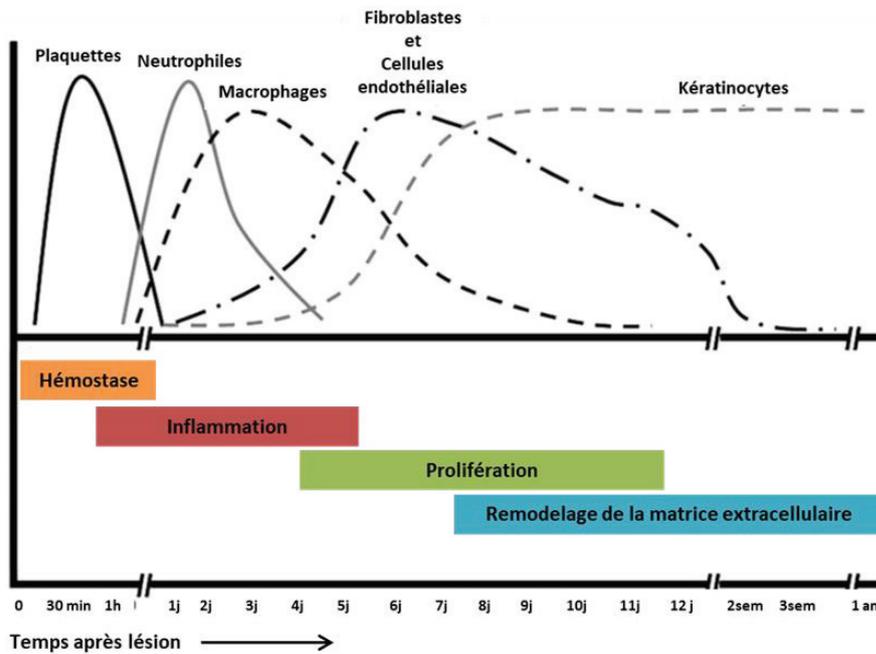


Figure 23. Différentes phases de la cicatrisation

Le graphique représente l'intervention des différentes cellules qui vont jouer un rôle dans la cicatrisation en fonction du temps. Le temps de cicatrisation s'entrecoupe en différentes phases qui sont représentées dans les rectangles colorés.

D'après (Pence and Woods 2014)

1.2 La cicatrisation

La cicatrisation est un processus complexe qui va mener à la réparation ou à la régénération d'un tissu lésé. La régénération conduit à une reconstruction complète du tissu qui va revenir à un état normal via la prolifération et la migration cellulaire. La réparation passe par la formation d'un tissu conjonctif fibreux et qui va aboutir à la formation d'une cicatrice. L'intégrité de la peau joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie physiologique du corps humain. Une lésion au niveau de la peau, est une véritable porte d'entrée pour l'environnement extérieur vers notre organisme, qui va tout mettre en œuvre pour rétablir la barrière cutanée. La cicatrisation nécessite l'intervention d'un grand nombre de types cellulaires et se décompose en 3 phases distinctes mais chevauchantes (Witte and Barbul 1997) (Figure 23) :

- L'hémostase et l'inflammation
- La prolifération
- La maturation, le remodelage de la matrice extracellulaire

Des modifications ou perturbations d'évènements lors de l'une de ces 3 phases peut mener à des retards de cicatrisation ou à l'apparition de plaies chroniques.

1.2.1 Phase inflammatoire : Hémostase et inflammation

Une blessure est perçue comme une réelle agression par le système immunitaire. L'organisme va tout d'abord mettre en place l'hémostase dans les premières heures après une lésion qui met à nu l'endothélium vasculaire. Le saignement va permettre de nettoyer la plaie en dirigeant les agents bactériens vers l'extérieur de l'organisme. La vasoconstriction et la formation d'un caillot de fibrine médié par l'agrégation des plaquettes au contact de la matrice extracellulaire assure l'hémostase et le comblement temporaire de la plaie. Le caillot comprend de la fibrine, de la fibronectine mais aussi de la thrombine (Golebiewska and Poole 2015, Witte and Barbul 1997). Les plaquettes et le caillot de fibrine induisent la libération de cytokines et de facteurs de croissance comme : le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le TGF- β (Transforming Growth Factor) et le PAF (Platelet-Activating Factor) (Golebiewska and Poole 2015). Cette véritable matrice provisoire va permettre la migration des leucocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales.

L'hémostase va permettre l'initiation de l'inflammation. Les neutrophiles circulent dans le sang dans un état de quiescence, leur activation et recrutement au niveau du site de la lésion sont effectués par les facteurs de croissances et cytokines exprimés par les plaquettes dans le caillot de fibrine mais aussi par des peptides N-formyl libérés par les bactéries et les cellules endommagées (Mantovani et al. 2011, Nami et al. 2016). Une fois installés, les neutrophiles continuent de libérer des médiateurs

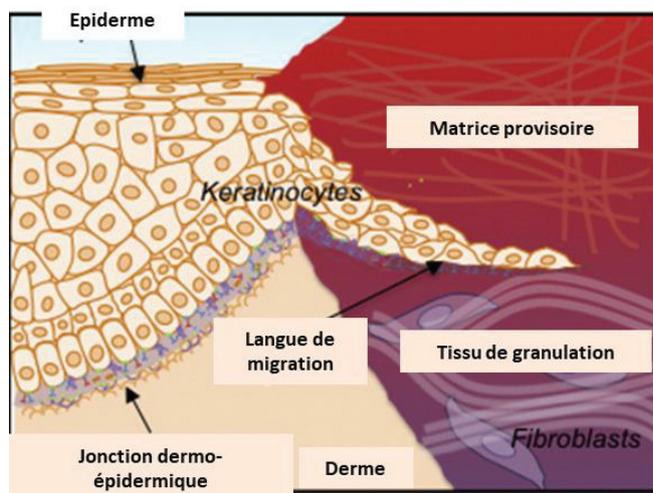


Figure 24. Phase de prolifération lors de la cicatrisation.

Schéma représentant la langue de migration qui avance au travers de la matrice provisoire pour refermer la plaie. Le tissu de granulation contient des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires. L'objectif de cette phase est de diminuer la surface du tissu lésé par contraction des fibroblastes, angiogenèse et ré-épithélialisation.

D'après (Rousselle et al. 2019)

chémo-attractants pour attirer d'autres neutrophiles. Ce sont les premières cellules de l'immunité à arriver sur le site de la plaie avec un pic au 2^{ème} jour, leur concentration diminue ensuite graduellement (Figure 23). Les neutrophiles sont indispensables dans cette phase précoce de l'inflammation de par leur capacité de phagocytose et de sécrétion de protéases. Ils neutralisent les bactéries locales et dégradent les tissus dévitalisés (Kolaczowska and Kubes 2013, Weiss 1989). Les granules libérés par les neutrophiles instaurent le recrutement de monocytes qui vont se différencier en macrophages pour devenir la population la plus importante au site de la plaie (Figure 23). Les macrophages vont reconnaître les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) et les DAMPs (danger-associated molecular patterns) via leur récepteur PRR. La production d'INF γ et TNF α (par ex : les Lymphocytes T, ou les cellules présentatrices d'antigènes) va induire la différenciation des macrophages en phénotype inflammatoire M1. Les M1 expriment des cytokines pro-inflammatoires de type interleukines (IL-1, IL-6, IL-12) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène nécessaires pour éliminer les pathogènes (Mosser and Edwards 2008). Les neutrophiles et les macrophages coopèrent dans l'initiation, l'évolution et la résolution de la phase inflammatoire.

L'inflammation est un processus essentiel à la cicatrisation afin d'éviter tout risque d'infection mais cette étape doit se stopper pour éviter l'installation de plaies chroniques inflammatoires. En effet, l'action des neutrophiles sur le long terme finit par dégrader la matrice extracellulaire et peut devenir délétère à la cicatrisation. Les neutrophiles apoptotiques sont éliminés par les macrophages par un processus appelé l'efférocytose (Khanna et al. 2010). La synthèse du miR-21 pendant l'élimination des neutrophiles participe à la transition des macrophages M1 vers un phénotype M2 « anti-inflammatoire » (Fadok et al. 1998, Yao et al. 2021).

Le contrôle de la phase inflammatoire et sa transition vers un phénotype non inflammatoire est essentiel à l'initiation de l'étape de prolifération (Landen et al. 2016).

1.2.2 Phase de prolifération

Une fois la phase inflammatoire effectuée, le caillot de fibrine est remplacé par un tissu conjonctif, le tissu de granulation, qui contient des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires (Figure 24). L'objectif de cette phase est de diminuer la surface du tissu lésé par contraction des fibroblastes, angiogenèse et ré-épithélialisation.

1.2.2.1 Contraction des fibroblastes

Les fibroblastes des zones non lésés migrent au centre de la plaie sous l'effet du PDGF, du FGF (Fibroblast Growth Factor), du TGF $-\beta$ et de l'IL-1, principalement sécrétés par les cellules

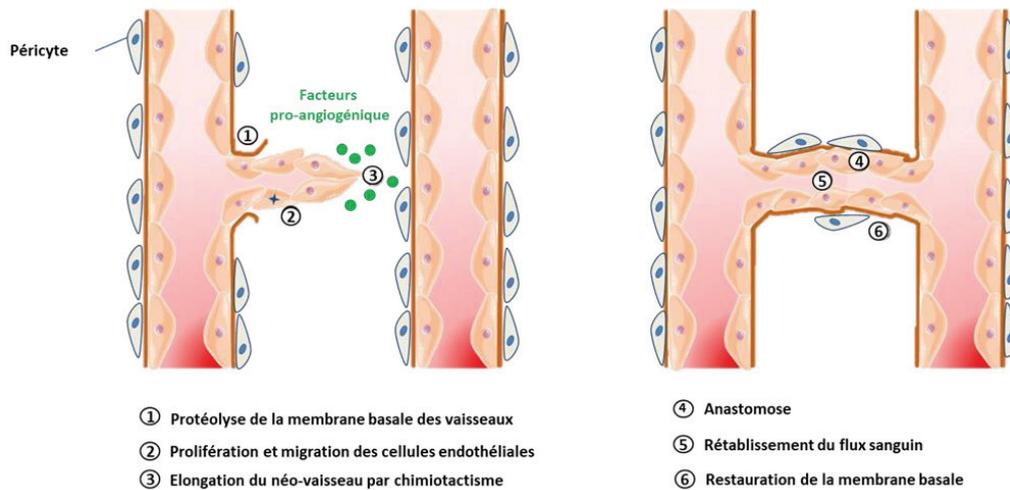


Figure 25. Processus d'angiogénèse

D'après (Guerra et al. 2018)

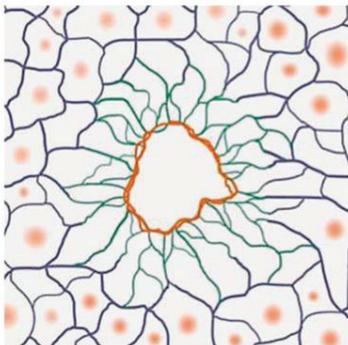


Figure 26. Schéma d'un réseau vasculaire néoformé lors de la cicatrisation en vue transversale

Les néo-vaisseaux en orange, s'organisent de façon circulaire autour de la plaie. Les vaisseaux en vert s'échappent de façon radiale pour effectuer un pont avec le réseau vasculaire non lésé (en bleu). Le réseau non lésé s'organise autour des follicules pileux (point rouges).

D'après (Sorg et al. 2017).

immunitaires (Werner and Grose 2003). Les fibroblastes commencent également à proliférer et progressent dans le tissu cicatriciel via l'action de MMPs de type -1, -2, -3, -14 et -19 qui dégradent la MEC (Loffek et al. 2011). A ce moment, les fibroblastes sécrètent en majorité du collagène de type III, ce qui modifie le ratio physiologique collagène I/ collagène III (5 :1) (Xue M. and Jackson 2015). Il a été établi que la contraction du tissu de granulation est en grande majorité dû à des fibroblastes qui se différencient au contact du TGF- β : les myofibroblastes (Desmouliere et al. 1993, Majno et al. 1971). Ces cellules sécrètent du collagène et possèdent des capacités contractiles importantes induites par l'expression et l'incorporation d' α -SMA dans leur cytosquelette d'actine. Les myofibroblastes vont s'accumuler aux bords de la plaie et permettre leurs rapprochements par contraction.

1.2.2.2 Angiogenèse

La néo-vascularisation est un phénomène crucial lors de la cicatrisation physiologique. La micro-vascularisation joue un rôle dès le départ au moment de l'hémostase, en effectuant l'initiation du long et complexe processus qu'est la cicatrisation. Ce processus physiologique est essentiel puisqu'il va permettre le rétablissement d'un flux sanguin normal et par conséquent un échange suffisant d'oxygène et de nutriments (Carmeliet and Jain 2011). La matrice provisoire va être le point de départ de la formation des nouveaux vaisseaux qui vont venir nourrir la plaie en terme de cellules immunitaires afin d'éliminer les débris cellulaires (Sorg et al. 2017). L'angiogenèse implique notamment la réorganisation de la membrane basale, la prolifération des cellules endothéliales, l'association en structure tubulaire et le recrutement de cellules péri-vasculaires : les péricytes (Figure 25).

Lors de la cicatrisation, les vaisseaux sont exposés à des facteurs pro-angiogéniques, leur membrane basale se réorganise et les cellules endothéliales commencent à proliférer et migrer ce qui entraîne un prolongement du vaisseau. Afin de rétablir le flux sanguin, la densité vasculaire augmente et les prolongements vasculaires fusionnent avec ceux des vaisseaux voisins grâce à un processus appelé l'anastomose. Les vaisseaux non perfusés vont régresser en des processus apoptotiques. Le système peut alors revenir à un état de quiescence lorsque les vaisseaux sont de nouveaux recouverts de péricytes (Figure 25). Les nouveaux vaisseaux vont s'organiser d'une façon très précise autour de la lésion (Figure 26). Ils vont se placer de façon circulaire directement au bord de la plaie, puis vont s'organiser radialement pour alimenter les vaisseaux intérieurs en se raccordant au réseau non lésé de la peau.

L'angiogenèse est finement régulée par des programmes génétiques et de nombreux facteurs chimiques qui permettent d'activer les cellules. La famille des facteurs de croissance endothéliaux

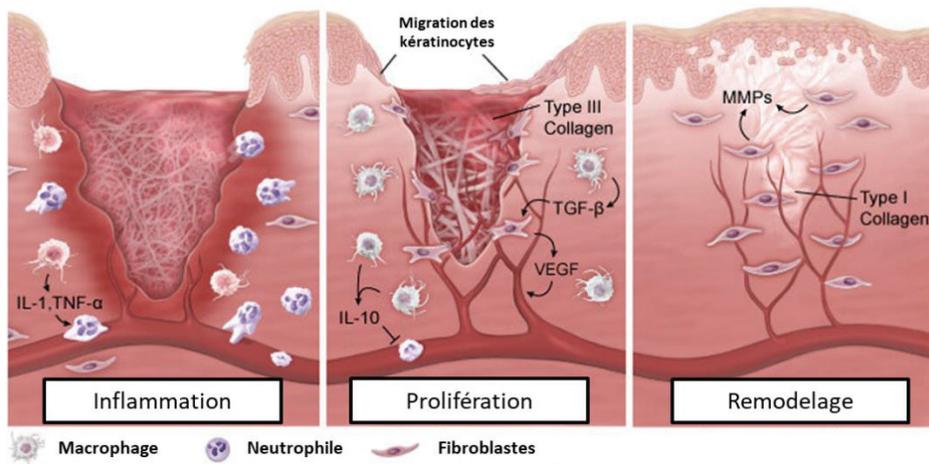


Figure 27. Dernière phase de cicatrisation : le remodelage de la matrice extracellulaire.

Schéma représentant le remodelage de la MEC qui permet le remplacement du tissu de granulation riche en myofibroblastes et en collagène de type III en une matrice plus physiologique composé de collagène de type I en majorité. Les cellules inflammatoires et les myofibroblastes meurent petit à petit par apoptose.

D'après www.mcwallin.com

vasculaires (VEGF) sont les principaux régulateurs de l'angiogenèse. La liaison du VEGF sur son récepteur VEGFR stimule la prolifération, la migration, la différenciation et la survie des cellules endothéliales ce qui permet la formation de nouveaux vaisseaux (Koch and Claesson-Welsh 2012). Outre la famille des VEGFs, d'autres facteurs de croissance interviennent dans le processus angiogénique comme le PDGF, le TGF β ou encore HIF (Hypoxia-inducible factor).

1.2.2.3 Ré-épithélialisation

Chez l'homme, la fermeture de la plaie s'effectue entre 60 et 80 % grâce à la ré-épithélialisation qui requiert la migration et la prolifération des kératinocytes (Volk et al. 2013). Seulement quelques heures après la blessure, les kératinocytes aux berges de la plaie commencent à migrer. La migration est initiée par la perte d'inhibition de contact des kératinocytes. La langue kératinocytaire est formée par des kératinocytes adjacents aux berges de la plaie, qui forment un véritable tunnel au travers de la matrice de fibrine et se dirige via des mécanismes qui impliquent TGF β 1 et l'EGF (Epidermal Growth Factor) et requiert l'activation du plasminogène (Ronfard and Barrandon 2001, Rousselle et al. 2019) (Figure 24). De nombreuses métalloprotéases participent activement à la migration des kératinocytes, par exemple, MMP1 et 9 sont exprimés par les kératinocytes en première ligne pour migrer et combler la plaie. MMP9 est nécessaire à la destruction des tissus endommagés et de la matrice provisoire afin de promouvoir une migration facilitée des kératinocytes (Michopoulou and Rousselle 2015). Ce n'est que 2-3 jours après le début de la cicatrisation que les kératinocytes basaux présents dans les follicules pileux et les glandes eccrines sudoripares, commencent à proliférer afin d'enrichir la langue kératinocytaire (Rittie et al. 2013, Rittie et al. 2016). Une fois que les kératinocytes sont arrivés au milieu de la plaie, la migration est stoppée par inhibition de contact et les kératinocytes commencent à se différencier afin de former un néo-épiderme.

1.2.3 Phase de remodelage

La phase de remodelage est la dernière phase de la cicatrisation qui peut durer jusqu'à 1 et 2 ans, elle a pour but de remplacer le tissu de granulation par une matrice extracellulaire physiologique, la plus proche d'un tissu non lésé. Le tissu de granulation disparaît petit à petit par apoptose des cellules endothéliales, macrophages et myofibroblastes (Desmouliere 1995). Ce processus d'apoptose évite notamment la formation de plaies hypertrophiques en empêchant une contraction et une production excessive de collagène (Figure 27). Le collagène III produit dans le tissu de granulation est remplacé petit à petit par du collagène I, ce qui confère au tissu une meilleure résistance. Une fois que la ré-épithélialisation est terminée, les myofibroblastes continuent de sécréter des MMPs et des TIMPs.

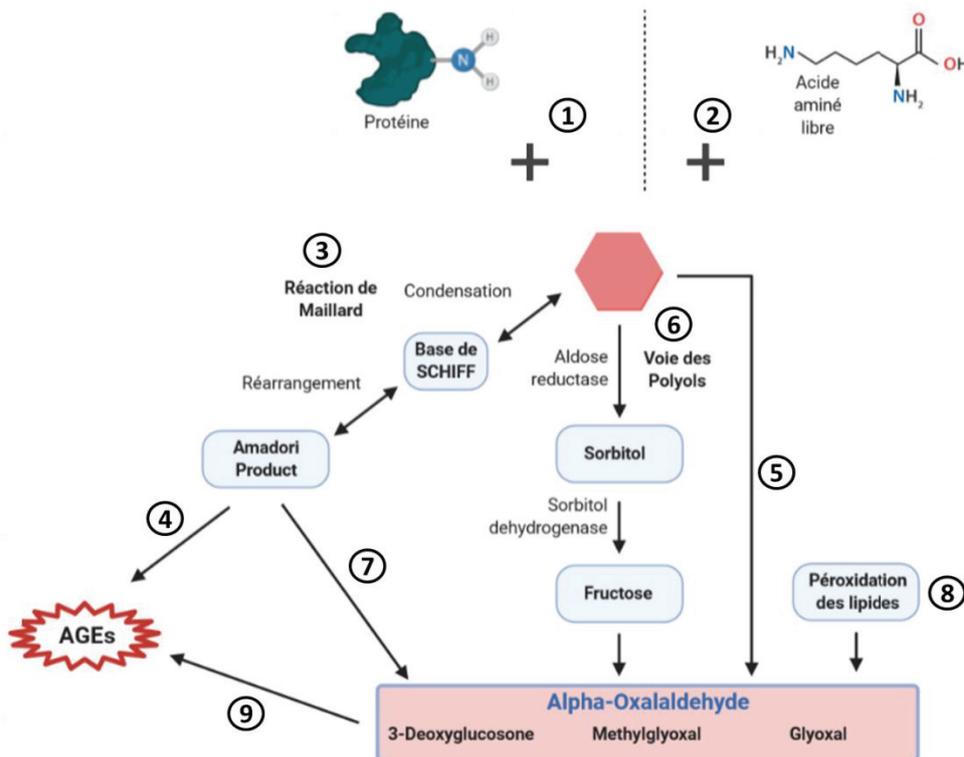


Figure 28. Différentes réactions menant à la production d'AGEs : La glycation

Le processus de glycation commence par la réaction du glucose avec une protéine (1) ou un acide aminé libre (2). La réaction non enzymatique de Maillard commence par la formation de la base de Schiff très instable qui se réarrange en produit d'Amadori (3). Le clivage des produits d'Amadori aboutit à la formation d'AGEs (4).

La dégradation ou l'autoxydation du glucose peuvent être à l'origine de 3-DG, méthylglyoxal et glyoxal (5). La voie des polyols mène par exemple à la formation de 3-DG et glyoxal (6). Le produit d'Amadori peut se fragmenter en 3-DG (7). La peroxydation des lipides participe à la formation de glyoxal (8).

En réagissant avec le groupement amine d'une protéine ou avec un acide aminé libre, les α -oxoaldéhydes produisent des AGEs (9).

Figure réalisée sur Biorender

2 Glycation

2.1 Mécanisme de la glycation

2.1.1 Découverte de la glycation

C'est en 1912 que Louis-Camille Maillard, chimiste français, observe des produits de couleur brune après la réaction à haute température de glucose avec de l'acide aminé glycine (Maillard 1912). Cette observation résulte de la réaction initiale entre un sucre réducteur comme le glucose et un groupement aminé. A l'époque, la théorie de Maillard était que cette réaction pouvait être impliquée dans la modification chimique des nutriments pendant la cuisson des aliments. Il émit également l'hypothèse que cette réaction pouvait avoir une importance en biologie humaine. Il a été le premier à mettre en évidence un processus long et complexe : la glycation. 40 ans plus tard, Hodge a réalisé une description des voies chimiques à l'origine des produits terminaux de glycation (AGEs) dans la nourriture (Hodge 1953). Son article reste une référence dans le domaine, et son étude est encore utilisée aujourd'hui (Hodge 1953). Les AGEs, en touchant plusieurs acides aminés, sont à l'origine d'altérations structurales, fonctionnelles et irréversibles des protéines.

2.1.2 Processus de la glycation

La réaction de Maillard est non enzymatique car elle se fait de façon spontanée et peut prendre plusieurs semaines ou mois pour générer des AGEs.

La première étape est la formation d'une réaction entre le groupement carbonyle d'un sucre réducteur de type glucose et d'une fonction amine libre d'un acide aminé isolé ou constitutif d'une protéine. Le plus souvent, l'acide aminé en question est une lysine ou une arginine (Figure 28), mais les sucres réducteurs peuvent également réagir avec des acides nucléiques et des lipides pour générer des AGEs. La première réaction est réversible et mène à la formation de la base de SCHIFF par condensation. Fortement instable, la base de SCHIFF va subir un réarrangement à l'origine de produits de glycation précoces : les produits d'Amadori (Figure 28). Ces deux premières réactions sont toutes deux réversibles, mais le réarrangement complexe ainsi que des clivages sont à l'origine de la formation irréversible d'AGEs. Par exemple, le clivage oxydatif des produits d'Amadori génère des AGEs comme le CML (N ϵ -(carboxyméthyl) lysine) ou le pentosidine (Figure 28) (Miyata et al. 1997).

Les α -oxoaldéhydes ou dicarbonyles sont des produits intermédiaires de glycation très important qui regroupent majoritairement le glyoxal, le méthylglyoxal et le 3D-déoxyglucosone (3DG) (Figure 28 et Figure 29. A). Il est important de comprendre que ces intermédiaires de la glycation sont capables de générer des AGEs à leur tour en réagissant avec des acides aminés libres ou issu de protéines. Ces

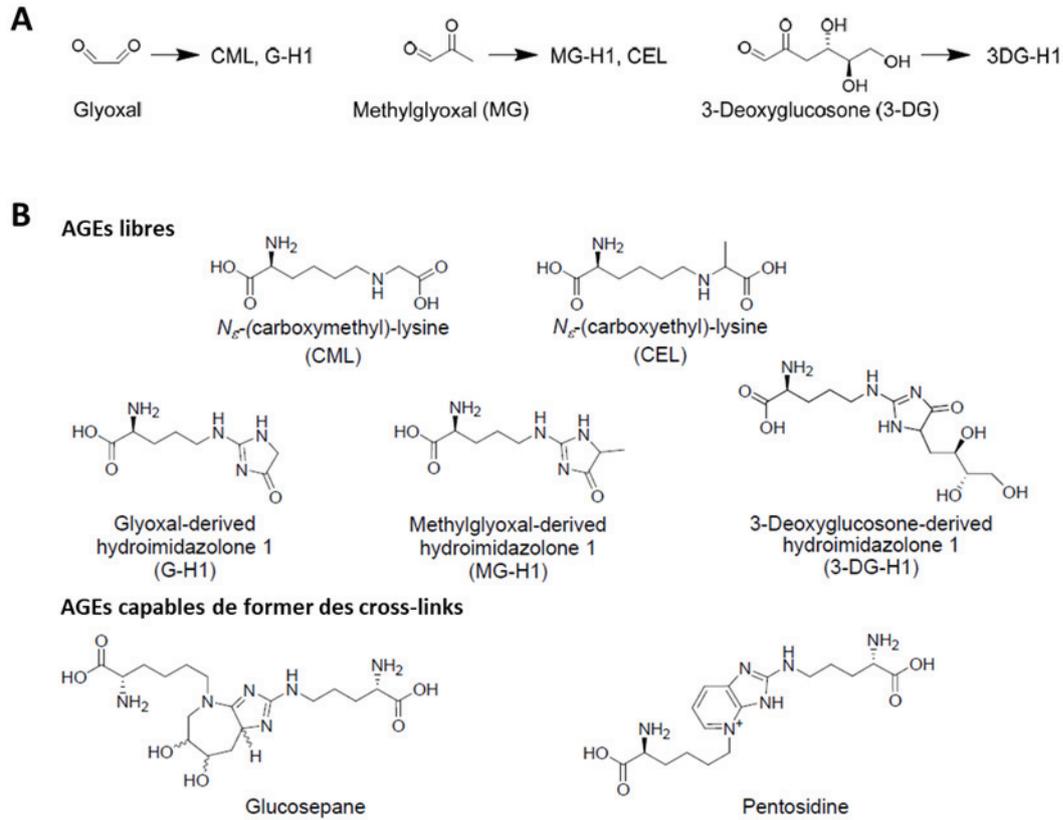


Figure 29. AGEs majoritaires et produits par les dicarbonyles

A/AGEs produits par les différents α-oxoaldéhydes. **B/** Structure des AGEs les plus courants.
 Figure extraite de (Brings et al. 2017)

composés ont une activité chimique très élevée puisqu'ils sont 20 000 fois plus réactifs que le glucose pour former des AGEs (Turk 2010).

Les dicarbonyles peuvent être produits de différentes façons (Figure 28):

Thornalley et al, ont montré que les diarbonyles pouvaient aussi bien provenir de la dégradation spontanée et physiologique du glucose mais également sous condition oxydative par l'autoxydation du glucose (Thornalley et al. 1999).

La formation du 3-DG peut provenir du produit d'Amadori ou fructoselysine, qui se phosphoryle en fructosamine-3-phosphate via la fructosamine-3-kinase (FN3K) puis se fragmente spontanément en 3DG (Kappler et al. 1997). Cette kinase intervient également dans la voie des polyols en phosphorylant le fructose pour donner du fructose-3-phosphate précurseur du 3DG.

Le méthylglyoxal provient principalement du glucose par la voie glycolytique et plus précisément de la fragmentation du triosephosphate qui perd son groupement phosphate par voie enzymatique ou non. Le méthylglyoxal peut également parvenir de la fragmentation du 3-DG via le catabolisme d'une thréonine (Beisswenger et al. 2003).

Le glyoxal peut être un résultat de la peroxydation des acides gras polyinsaturés ou de la voie des polyols (Figure 28) (Mlakar and Spiteller 1996, Onyango 2012).

Comme expliqué ci-dessus, les sources des dicarbonyles sont très variées. Ces composés sont des intermédiaires essentiels au cœur de la production d'AGEs (Figure 29.A).

La réaction entre le glyoxal et une lysine induit la formation de CML qui fut le premier AGE isolé (Figure 29. A) (Ahmed M. U. et al. 1986). Le CML est aujourd'hui un des bio-marqueurs majeur de la glycation dans les tissus humain (Thorpe and Baynes 2002) Il a été détecté dans le cristallin, l'urine, mais aussi le collagène de la peau (Dunn et al. 1989, Dunn et al. 1991, Wadman et al. 1975). Il existe de nombreux autres AGEs dont les plus courants sont listés dans la Figure 29. B. Il faut noter que certains AGEs comme le glucosépane et le pentosidine, sont capables de former des cross-links en réagissant avec deux résidus aminés différents, permettant ainsi de former des ponts entre les protéines glyquées (Figure 29. B).

La glycation est un processus très complexe car pour une protéine plusieurs destins sont possibles en fonction de l'agent glyquant, ce qui crée une très grande diversité d'AGEs. Par exemple, l'albumine de sérum humain est glyquée sur 4 lysines par le glucose alors que le méthylglyoxal va préférentiellement glyquer 5 arginines de cette même protéine (Ahmed N. 2005, Iberg and Fluckiger 1986, Tessier 2010).

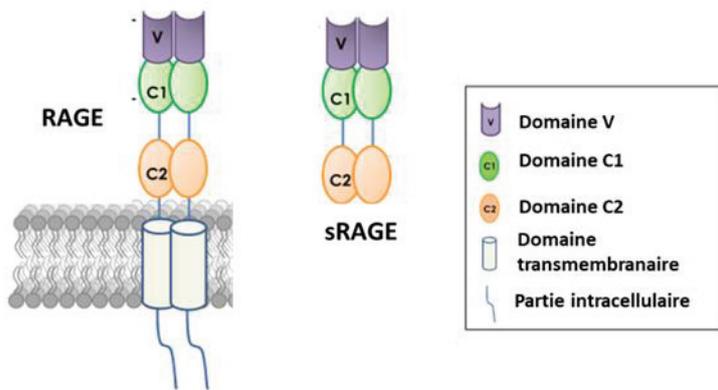


Figure 30. Structure de RAGE et sRAGE
D'après (Riuzzi et al. 2018)

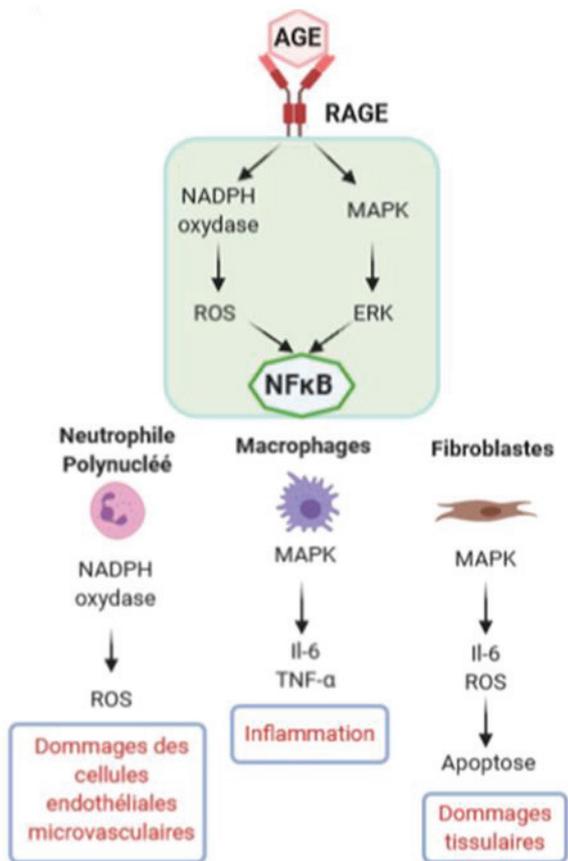


Figure 31. La voie AGE-RAGE
Illustration des différentes conséquences de l'activation de la voie AGE-RAGE en fonction du type cellulaire.
Figure réalisée sur Birender

2.1.3 Mode d'action des AGEs : La voie AGE-RAGE

Les AGEs se lient à leur récepteur RAGE (pour « Receptor for Advanced Glycation End products ») qui est un récepteur transmembranaire ubiquitaire qui appartient à la super famille des récepteurs de surface cellulaire de type immunoglobulines. RAGE comporte 3 domaines extracellulaires : un domaine V (variable) de l'acide aminé (aa) 23 à 116, des domaines C (constants), C1, C2 de l'aa 124 à 221 et de l'aa 227 à 317 respectivement, puis ensuite une hélice transmembranaire (aa 343-363) et enfin un petit domaine cytoplasmique (aa 363-404) (Moysa et al. 2019) (Figure 30). Pour être fonctionnel, le récepteur se dimérise et se stabilise via son domaine C2 qui se lie à un autre domaine C2 par des ponts di-sulfure (Figure 30) (Xue J. et al. 2011). De par leur grande diversité, les AGEs se lient uniquement au domaine extracellulaire variable qui est capable de reconnaître les multiples structures (Kislinger et al. 1999). La liaison de CEL (N_ϵ -carboxy-ethyl-lysine) et de CML avec leur récepteur a été associée aux complications du diabète, à des inflammations chroniques et à la sévérité de la maladie d'Alzheimer (Cai et al. 2016, Ramasamy et al. 2005). Outre les AGEs, des médiateurs de type cytokine de la famille S100, l'amphotérine ainsi que des protéines nucléaires libérées par les cellules nécrotiques, peuvent se lier à RAGE (Moysa et al. 2019). Il y a donc une grande diversité de ligands pour ce récepteur avec des spécificités de liaison propre à chacun mais cependant leur liaison induit le plus souvent une réaction inflammatoire (Shen et al. 2020).

La forme soluble du récepteur (sRAGE), correspond au récepteur sans les parties transmembranaires et cytoplasmiques (Figure 30). Il existe 2 isoformes possible de sRAGE, une forme clivée au niveau de la partie extracellulaire cRAGE, et esRAGE qui résulte d'un épissage alternatif de l'ARNm (Steenbeke et al. 2020). cRAGE représente 75% des isoformes de sRAGE et est clivée par les métalloprotéases ADAM10 et MMP9 (Raucci et al. 2008, Zhang L. et al. 2008). La liaison des ligands avec leur récepteur RAGE augmente le phénomène de clivage, la concentration sanguine de sRAGE pourrait donc refléter l'expression tissulaire de RAGE (Colhoun et al. 2011). Avec uniquement la partie extracellulaire, sRAGE, est capable de lier les mêmes ligands que la forme complète et agirait comme un leurre pour l'organisme (Park et al. 1998). En effet, sans le domaine intracellulaire le signal n'est pas transmis à la cellule, ce qui induit une compétition entre sRAGE et RAGE et permet la régulation de la transmission du signal.

Plusieurs voies sont potentiellement activées suite à la liaison d'AGEs sur leur récepteur RAGE comme les voies MAPK-ERK et NADPH-oxydase. Ces voies activent le facteur de transcription NF- κ B pour transcrire des cytokines pro-inflammatoires, et induit un stress oxydatif important (Figure 31) (Ott et al. 2014, Sorci et al. 2013).

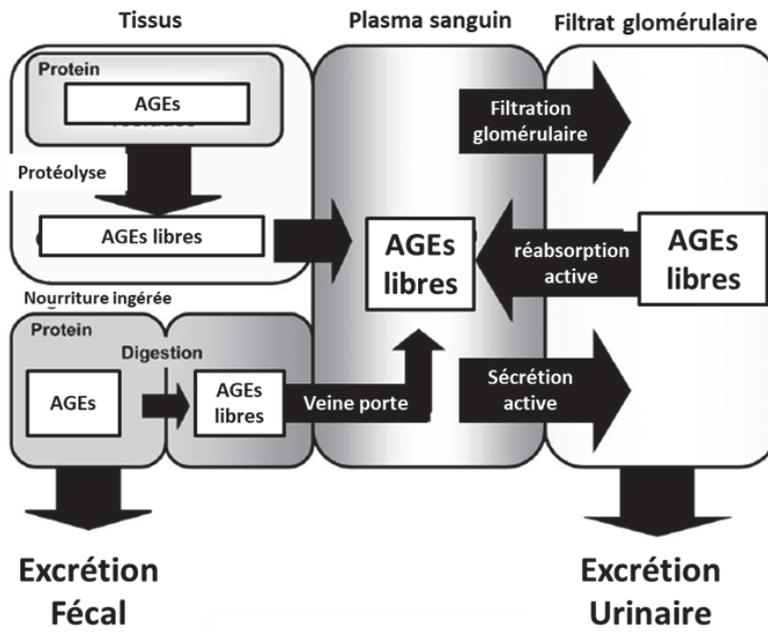


Figure 32. Elimination physiologique des AGEs

Description détaillée du mécanisme d'élimination physiologique des AGEs par voie fécal et urinaire.
D'après (Thornalley 2006)

Chez des patients diabétiques, la liaison d'AGEs sur des neutrophiles polynucléaires augmente l'expression de NADH-oxydase et induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : il en résulte un dommage des cellules endothéliales micro-vasculaires (Gupta et al. 2007). D'autre part un régime riche en AGEs induit une augmentation de production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α par les macrophages de façon dépendante de RAGE (van der Lugt et al. 2018). Au contact des AGEs, les macrophages et les fibroblastes gingivaux activent la voie MAPK-ERK et NF- κ B pour augmenter l'expression d'IL-6. Les fibroblastes isolés de patients diabétiques exposés aux AGEs activent l'inflammasome NLRP3 via l'induction de ROS et rentrent rapidement en apoptose (Figure 31) (Dai et al. 2019).

2.1.4 Mécanismes d'élimination physiologique des AGEs

Il est extrêmement difficile pour l'organisme et la machinerie cellulaire d'éliminer les AGEs produits et l'organisme a développé différentes méthodes pour palier à cette difficulté.

2.1.4.1 Protéolyse

Bien que plus résistantes aux systèmes de dégradation développés par la cellule, les protéines glyquées à demi-vie courte vont être dégradées par protéolyse et libérer les AGEs libres anciennement fixés dans l'organisme (Ahmed N. et al. 2005, Verzijl et al. 2000). Ce phénomène est augmenté chez les patients diabétiques de type I et II ce qui contribue à l'élévation et à la libération constante d'AGEs libres dans le plasma, l'urine et les fèces (Figure 32) (Ahmed N. et al. 2005). Au contraire les protéines à demi-vie longue qui sont très peu éliminées par protéolyse, vont accumuler les AGEs au fil du temps.

2.1.4.2 Intervention de la fructose amine 3 kinase

De façon intéressante la FN3K, initialement décrite comme étant à l'origine du 3DG aux capacités hautement glycantes (Kappler et al. 1997), a ensuite été décrite comme une enzyme participant à la déglycation (Delpierre et al. 2000, Szwergold et al. 2001). En effet, après la phosphorylation de la fructoselysine par la FN3K, la fructoselysine 3-phosphate, très instable, se décompose en 3DG et en une lysine non glyquée. Ce processus conduit à la déstabilisation du produit d'Amadori et donc à la diminution de la glycation. Récemment, une étude a montré que certains variants de la FN3K qui la rende plus efficace, étaient responsables de la diminution des complications vasculaires liées à la glycation chez des patients diabétiques (Sartore et al. 2020).

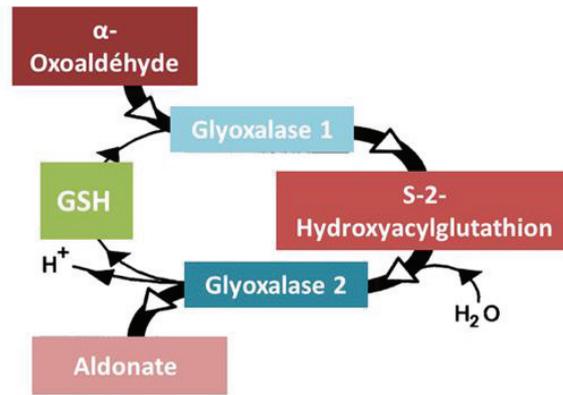


Figure 33. Système de glyoxalase

Schéma de la glyoxalase qui permet de détoxifier le méthylglyoxal et le glyoxal. GSH : forme réduite du glutathion.

S-(2-hydroxyacyl) glutathion = S-lactoylglutathion lorsque le méthylglyoxal est le substrat et S-glycolylglutathion pour le glyoxal

Aldonate = D-Lactate pour le méthylglyoxal et glycolate pour le glyoxal.

D'après (Thornalley 1998)

2.1.4.3 Le système glyoxalase

Le système glyoxalase est fortement conservé chez tous les organismes vivants et il correspond à la coopération de 2 enzymes, la glyoxalase 1 (Glo1) et la glyoxalase 2 (Glo2) et nécessite la forme réduite du glutathion (GSH) en tant que co-facteur (Dakin and Dudley 1913, Thornalley 1998). Ce système enzymatique dit détoxifiant, permet d'empêcher la formation d'AGEs dérivant du glyoxal et du méthylglyoxal (Knight et al. 2010, Thornalley 2008). En effet, les dicarbonyles sont transformés en hydroxy-acides qui ne possèdent pas la capacité de glyquer des protéines.

Le méthylglyoxal et le glyoxal vont réagir de façon non enzymatique avec le GSH pour donner un hémithioacétal. La Glo1 convertit ensuite l'hémithioacétal en S-(2-hydroxyacyl) glutathion : S-lactoylglutathion pour le méthylglyoxal, ou en S-glycolylglutathion pour le glyoxal (Figure 33). La thiolestérase glyoxalase 2 hydrolyse les dérivés du S-(2-hydroxyacyl) glutathion pour produire un aldionate et pour régénérer le GSH qui peut alors démarrer un nouveau cycle. Lorsque le substrat est le méthylglyoxal, l'aldionate obtenu est le D-Lactate et lorsque c'est le glyoxal, on obtient du glycolate (Figure 33) (Knight et al. 2010, Kuhla et al. 2005, Thornalley 1998).

2.1.5 Facteurs qui participent à la formation et à l'accumulation des AGEs

Il existe différents facteurs endogènes ou environnementaux qui favorisent la formation d'AGEs et leur accumulation.

2.1.5.1 Facteurs environnementaux

2.1.5.1.1 Régime alimentaire

Bien que les AGEs puissent être produits de façon endogène, ils peuvent aussi être apportés par l'alimentation. En effet, des teneurs plus élevées en AGEs sont détectés dans les aliments cuisinés à forte température par exemple en les faisant brûler, griller, frire ou rôtir (Uribarri et al. 2010). Au contraire, les aliments cuits à plus basse température ou dans l'eau présentent des taux d'AGEs plus faible. Il faut savoir que 10 à 30 % des AGEs consommés sont absorbés par l'intestin, 1/3 sont excrétés par l'urine ou les fèces et 2/3 s'accumulent dans le corps (Koschinsky et al. 1997). Le taux d'AGEs dans de l'huile de friture utilisée plusieurs fois est plus élevé par rapport à une huile qui n'a jamais été chauffée (Chhabra et al. 2017). Une étude a été effectuée en comparant le taux plasmatique de CEL chez des personnes suivant un régime riche en viande rouge transformée à celui de personnes suivant un régime alimentaire équilibré sur le plan énergétique, riche en céréales complètes, en produits laitiers, en noix et en légumineuses (Kim Y. et al. 2020b). L'analyse par

chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse a révélé des taux de CEL plus élevé chez les personnes qui mangeait essentiellement de la viande rouge.

2.1.5.1.2 Cigarette

La combustion de cigarette est à l'origine de produits de glycation qui sont transférés dans le sérum des fumeurs (Cerami C. et al. 1997). En effet, les métabolites de la nicotine et la nor nicotine peuvent catalyser des réactions aldoliques et provoquer une glycation aberrante des protéines (Dickerson and Janda 2002). La production d'AGEs serait augmentée chez les fumeurs et l'inhibiteur de RAGE sRAGE serait réduit, la voie de signalisation AGE-RAGE serait donc fortement activée avec la sécrétion de cytokines pro- inflammatoires et la génération de ROS (Prasad et al. 2015). Prasad et al ; démontrent même que le ratio AGE/sRAGE est un très bon marqueur chez les fumeurs pour prédire les maladies cardiovasculaires.

2.1.5.2 Facteurs endogènes

2.1.5.2.1 Hyperglycémie

La réaction à la base de la formation des AGEs est la réaction d'un sucre avec un acide aminé libre ou faisant partie d'une protéine. Il est donc facile de comprendre que l'hyperglycémie, une augmentation du taux de sucre dans le sang, participe activement à la formation exagérée d'AGEs (Shen et al. 2020). Aragno et al, montrent qu'une consommation élevée en fructose provoque une accumulation d'AGEs dans divers tissus associée à une résistance à l'insuline et à un désordre du métabolisme des lipides (Aragno and Mastrocola 2017). Il est connu que les personnes diabétiques avec une hyperglycémie chronique présentent des taux élevés d'AGEs dans différents tissus (Paolillo et al. 2019).

2.1.5.2.2 Vieillesse associé à un stress oxydatif

L'accumulation d'AGEs avec le vieillissement est liée à un stress oxydatif important et à une réponse inflammatoire : ces mécanismes perturbent l'homéostasie tissulaire en causant des dommages cellulaires. Chez les personnes âgées, de nombreuses maladies sont induites par l'inflammation comme des désordres cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose ou encore le diabète (Chung et al. 2019). Les AGEs au niveau du cœur sont 2,5 fois plus élevés chez les personnes âgées par rapport aux jeunes (Munch et al. 1997). D'autre part, chez le rat, Son et al, montrent une accumulation d'AGEs et de RAGE dans le tissu adipeux viscéral avec l'âge, menant à une réaction inflammatoire avec l'activation des macrophages (Son et al. 2016).

2.1.5.2.3 Obésité

L'obésité est liée à de vastes problèmes cardiovasculaires, à l'hypertension ou à la résistance à l'insuline. Or, il a été montré que la production d'AGEs était augmentée dans le tissu adipeux et le muscle squelettique lors de l'obésité et pouvait être lié à ces complications associées à l'obésité. En effet la perte de poids importante d'une personne obèse (non diabétique) est liée à la diminution de 17 % du taux de CML dans leur sérum (Deo et al. 2017), au contraire le taux de CML augmente avec la prise de poids (de la Maza et al. 2008). D'autre part, le tissu adipeux et le sérum de rats obèses présentent des taux de méthylglyoxal plus élevés que les souris contrôles (Jia and Wu 2007).

2.1.5.2.4 Autres

Il existe d'autres causes qui conduisent à l'accumulation des AGEs, comme l'insuffisance rénale. En effet les pathologies chroniques du rein sont associées à une augmentation du taux d'AGEs dans l'organisme (Agalou et al. 2005, Rabbani and Thornalley 2018). La clairance est diminuée, l'élimination des AGEs par l'urine ne se fait pas correctement et les AGEs libres s'accumulent dans les fluides corporels.

Un déficit dans le système de glyoxalase ne permet pas de détoxifier les AGEs et par conséquent ceux-ci s'accumulent.

Enfin, l'inflammation pourrait favoriser l'accumulation des AGEs car leur taux plasmatique est élevé dans les maladies auto-immunes ou les rhumatismes inflammatoires (Chen Y. S. et al. 2009, Shen et al. 2020).

2.2 Méthodes de dosage et de détection des AGEs

Il existe différentes méthodes pour détecter et quantifier les AGEs dans l'organisme. Leurs avantages et inconvénients sont listés dans la table 2.

Technique	Matériel	Avantages	Inconvénients
ELISA, Western Blot	Sang, Urine, Protéines extraites d'un tissu ou de cellules	- Méthodes simples avec de nombreuses mesures possibles. - Détection d'AGEs spécifiques	- Impossibilité de différencier les AGEs libres ou associés à des protéines. - Peu spécifique et reproductible
Chromatographie liquide haute performance	Sang, Urine, Protéines extraites d'un tissu ou de cellules	- Mesure très précise - Détection d'AGEs spécifiques libres ou liés à des protéines.	Méthode plus complexe et coûteuse
Immunofluorescence ou Immunohistochimie	Tissus ou cellules	Localisation tissulaire ou cellulaire des AGEs	Méthode invasive pour prélever la biopsie
Autofluorescence	Tissu cutané	Méthode non invasive, rapide, prédictive des complications	Difficulté de mesure sur les peaux noires

Table 2. Méthodes de détection et de quantification des AGEs
D'après (de Vos et al. 2016)

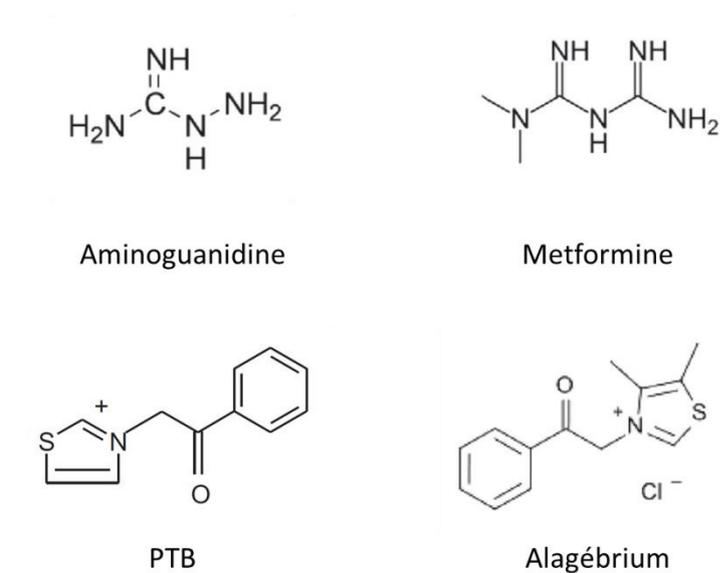


Figure 34. Structure des différentes molécules anti-glycantes

PTB = N-phenacylthiazolium bromide
D'après (Bathaie and Farajzadeh 2014)

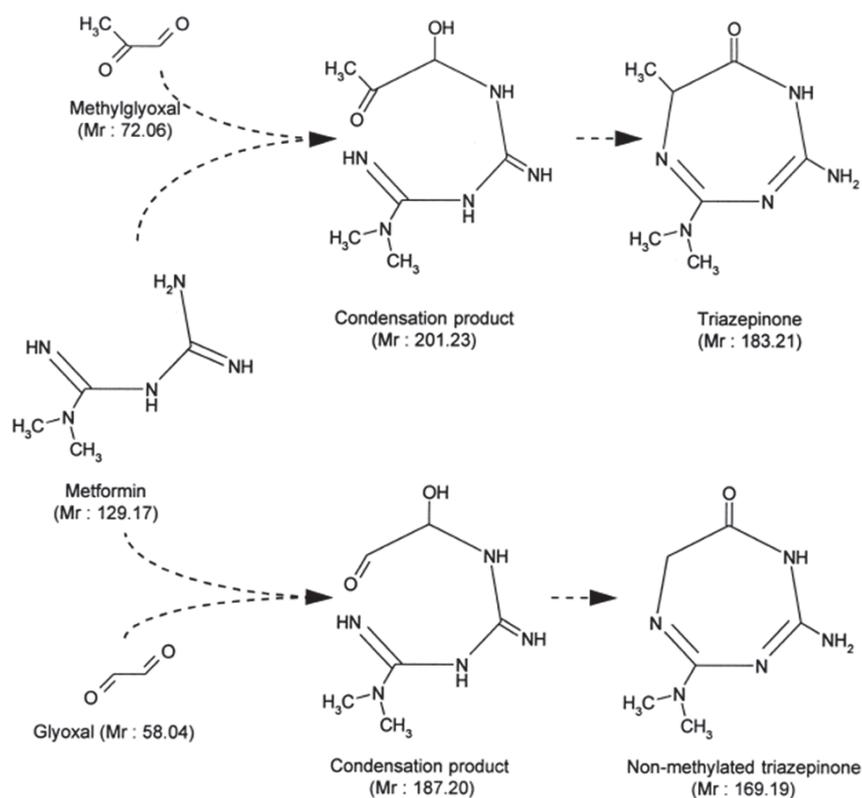


Figure 35. Réaction entre la metformine et les dicarbonyles glyoxal / méthylglyoxal

Mr = poids moléculaire.
D'après (Ruggiero-Lopez et al. 1999)

2.3 Molécules anti-glycantes

Il existe un certain nombre de molécules anti-glycantes, ici nous allons nous concentrer sur les plus étudiées : les guanidines, et les casseurs d'AGEs

2.3.1 Guanidine

Les molécules de la famille des guanidines diminuent la glycation en captant les composés dicarboxyles, afin d'empêcher leur action et la production d'AGEs qui en résulte : elles possèdent en parallèle des activités anti-oxydantes. Ce sont donc des molécules thérapeutiques préventives, elles ne permettent pas de détruire ou de casser des AGEs déjà produits.

2.3.1.1 Aminoguanidine

L'aminoguanidine a été le premier inhibiteur d'AGEs proposé pour empêcher l'action des dicarboxyles comme le glyoxal, le méthylglyoxal ou le 3DG (Figure 34) (Brownlee et al. 1986). L'aminoguanidine va par exemple réagir avec le glyoxal et le méthylglyoxal pour former des composés triazine (Colzani et al. 2016, Lo et al. 1994). Comme vu précédemment, la voie AGE-RAGE conduit à la formation de ROS qui participent à l'installation d'un stress oxydatif important et accélère le processus de glycation (Bavkar et al. 2019, Colzani et al. 2016). Les molécules anti-oxydantes sont donc de bons candidats pour limiter la glycation et ses effets néfastes. Or, il s'avère que l'aminoguanidine possède des vertus anti-oxydantes et protège des effets du stress oxydatif. Elle est capable de séquestrer des ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl (HO^\bullet) ou encore l'acide hypochloreux (HOCl) (Pintus et al. 2018, Yildiz et al. 1998). L'aminoguanidine permet également d'inhiber la forme inductible de NO synthase (iNOS) qui est à l'origine de l'accumulation de monoxyde d'azote (Misko et al. 1993).

2.3.1.2 Metformine

La metformine est un dérivé des guanidines qui possède une structure similaire à l'aminoguanidine (Figure 34). En 1999, Ruggiero-Lopez et al, démontrent pour la première fois que la metformine réagit fortement avec le glyoxal et le méthylglyoxal en formant un produit guanidine-dicarboxyle : le triazepinone (Figure 35) (Ruggiero-Lopez et al. 1999). Bien que la metformine et l'aminoguanidine aient des structures similaires, les réactions chimiques qui bloquent l'action des dicarboxyles sont différentes et mènent à des composés distincts. Nous pouvons noter qu'en présence de metformine, les AGEs produits suite à l'incubation de glyoxal ou de méthylglyoxal avec de l'albumine sont réduits de 37 % et 47 % respectivement. De plus, la metformine serait capable de diminuer les ROS chez des souris hyperglycémiques diabétiques en plus de diminuer le taux d'hémoglobine glyquée dans le sang (Al-Ani et al. 2021). La metformine permettrait donc d'atténuer le stress oxydatif induit par la

glycation et les effets délétères qui lui sont associés. Chez des patients diabétiques qui présentent une hyperglycémie chronique et donc une glycation accrue, il a été montré que la metformine était capable de diminuer le taux de CML, de RAGE mais également capable d'augmenter le niveau d'antioxydants ainsi que la forme inhibitrice de RAGE : esRAGE (Adeshara et al. 2020).

2.3.2 Casseur d'AGEs

L'alagébrium (4,5-diméthyl-3-phénylthiazolium chloride) et le PTB (N-phénylthiazolium bromide) sont des casseurs d'AGEs, capables de briser les liaisons carbone-carbone entre les AGEs issus des dicarbonyles et les protéines pour libérer la protéine afin qu'elle retrouve sa fonction normale (Figure 34) (Forbes et al. 2003, Vasan et al. 1996). Une étude par HPLC (chromatographie liquide) démontre que des protéines glyquées de haut poids moléculaire ont la capacité de s'agréger avec l'alagébrium (Hollenbach et al. 2003). Il est tout de même très difficile de briser les AGEs et le rôle de l'alagébrium reste controversé car d'autres études effectuées sur la peau et les tendons, ne montrent aucun effet sur les AGEs pré-formés (Mentink et al. 2002, Yang S. et al. 2003a). D'autres analyses révèlent que l'alagébrium est également capable de capter le méthylglyoxal pour limiter son action (Kim T. and Spiegel 2013).

2.4 Vieillessement et AGEs

Au début des années 80s, il a été montré que le vieillissement des protéines de la matrice extracellulaire et les pathologies associées étaient potentiellement dues à la réaction de Maillard. Cette hypothèse participe à l'intérêt grandissant de la population scientifique pour la glycation *in vivo* (Cerami A. 1985, Monnier and Cerami 1981). Étant donné la difficulté d'éliminer les AGEs notamment sur les protéines à longue demi-vie comme l'élastine et le collagène, ceux-ci s'accumulent au cours de la vie et sont retrouvés en grande quantité dans le derme avec le vieillissement (Thornalley 2008, Xin et al. 2021). Plusieurs AGEs stables s'accumulent avec l'âge au niveau du collagène et de l'élastine de la peau comme le CML, CEL ou encore le pentosidine (Mizutani et al. 1997, Verzijl et al. 2000). Nous savons que le collagène est glyqué par le glucose sur 3 lysines préférentielles alors que les 18 autres résidus lysine sont faiblement glyqués (Reiser et al. 1992). L'accumulation de ces AGEs contribue à des déficits structuraux et fonctionnels des tissus durant le vieillissement. Les AGEs au niveau de la matrice extracellulaire peuvent aussi créer une surface catalytique qui favorise un stress oxydatif supplémentaire et déclenche un processus inflammatoire lié à l'oxydation (Baynes 2001).

Il a également été montré que les AGEs s'accumulaient au niveau de l'épiderme lors du vieillissement. Plus précisément, les CML étaient retrouvés en grand nombre dans l'épiderme, la kératine 10 est proposée comme cible préférentielle. La présence de CML au niveau de K10 pourrait

participer à la perturbation de la barrière épidermique et expliquer la fragilité cutanée des personnes âgées (Kawabata et al. 2011).

2.5 Diabète et AGEs

Outre ses répercussions dans le vieillissement, la glycation est également augmentée dans le cadre du diabète. Les scientifiques ont commencé à s'intéresser à l'implication des AGEs dans la physiologie humaine grâce à la découverte de la première protéine glyquée in vivo : l'hémoglobine (Kunkel and Wallenius 1955). En 1968, Rahbar montre qu'une forme d'hémoglobine glyquée (HbA1c) est présente à un taux supérieur dans les érythrocytes des patients diabétiques (Rahbar 1968). De plus, Monnier *et al.*, ont démontré une corrélation entre la glycation du collagène dermique et les complications liées au diabète (Monnier et al. 1986). Vlassara et son équipe ont été parmi les premiers à recenser des accumulations d'AGEs dans plusieurs tissus des patients diabétiques, dont le tissu cutané (Brownlee et al. 1988). En effet, en 1993 on parle du diabète comme une maladie caractérisée par un vieillissement chimique accéléré des protéines (Dyer et al. 1993).

L'étude de la glycation prend alors une nouvelle dimension dans le domaine de la physiopathologie.

L'augmentation de la glycation avec l'accumulation d'AGEs qui en découle a été très bien décrite chez le diabétique.

Chez les personnes avec une fonction rénale normale, les AGEs libres et les précurseurs sont rapidement éliminés de la circulation. Cependant dans des cas de néphropathie diabétique, il a été observé une accumulation systémique des précurseurs de glycation et une augmentation du nombre d'AGEs dans leur sérum (Baynes 2001). En effet, les dicarbonyles, hautement réactifs sont retrouvés à des taux plus élevés dans le plasma de patients diabétiques favorisant la production d'AGEs (Scheijen and Schalkwijk 2014). Cette augmentation est corrélée à de nombreuses dysfonctions, notamment au niveau vasculaire, où la glycation par le méthylglyoxal du collagène IV de la membrane basale des vaisseaux, compromet la survie des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Dobler et al. 2006). Les AGEs s'accumulent dans la peau des diabétiques de la même façon que lors du vieillissement. L'auto-fluorescence de la peau est corrélée à cette accumulation d'AGEs et il s'agit donc d'un moyen simple pour mesurer les d'AGEs au niveau de la peau. Il a été montré que le collagène insoluble issu de patients diabétiques de type I présentait une fluorescence importante (Monnier et al. 1986). Il s'avère que le pentosidine est le premier AGEs auto-fluorescent découvert, capable d'effectuer un cross-link lysine-arginine (Sell and Monnier 1989). Plusieurs structures issues de la réaction de Maillard, peuvent être responsables de cette auto-fluorescence (Matiacevich et al. 2005), mais le taux de pentosidine cutané est spécifiquement corrélé à l'auto-fluorescence du

collagène (Meerwaldt et al. 2005). La mesure de la fluorescence peut être utilisée comme prédicteur de développement du diabète de type 2, ou des complications cardiovasculaires associées (van Waateringe et al. 2019). Récemment, il a été décrit que l'auto-fluorescence augmentait avec l'âge mais de façon plus rapide chez les diabétiques, en particuliers chez les fumeurs et ceux qui développent des complications vasculaires (Januszewski et al. 2020).

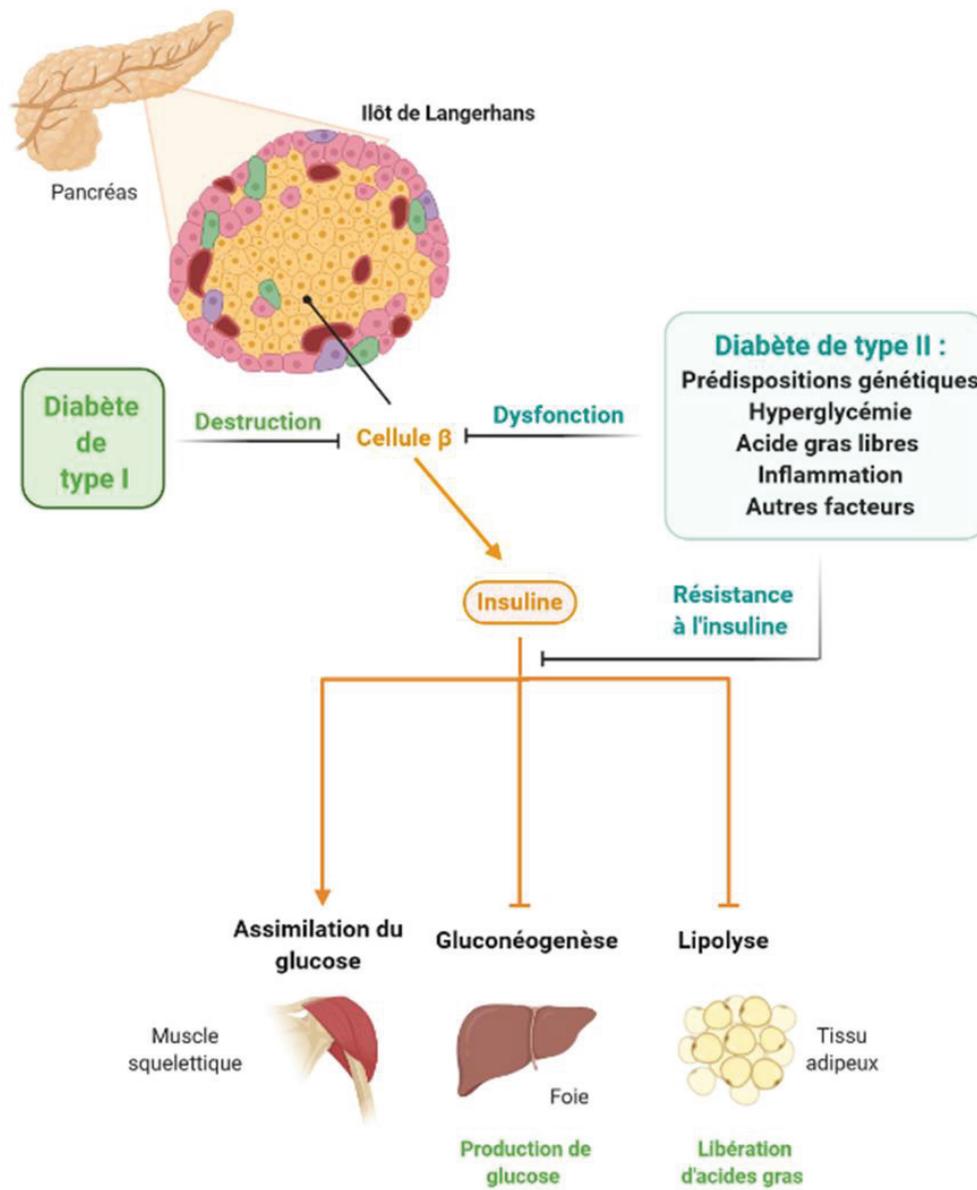


Figure 36. Sources et conséquences du diabète
 Réalisée sur Biorender

3 Le diabète

3.1 Caractéristiques de la pathologie

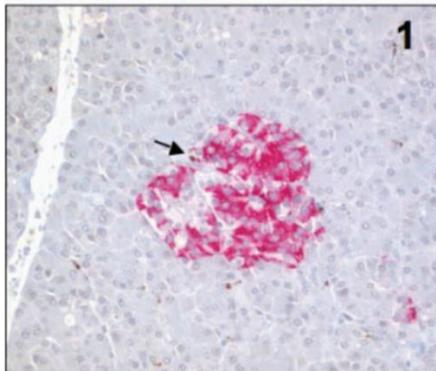
Le diabète est un problème de santé mondial majeur puisque 463 millions d'adultes sont touchés dans le monde (IDF 2019). Cette pathologie mène à une hyperglycémie chronique avec un taux de sucre à jeun dans le sang supérieur à 1,26g/l, qui est dû à un défaut de production ou d'utilisation de l'insuline (Association 2015). L'insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas, au niveau des îlots de Langerhans et participe à la diminution du glucose dans le sang circulant en le stockant dans les cellules où il va pouvoir être convertit en énergie (Tokarz et al. 2018). Lors du diabète, l'insuline ne va d'une part, plus pouvoir empêcher la lipolyse, entraînant ainsi une libération d'acide gras et d'autre part n'inhibe plus la néoglucogenèse réalisée par les cellules hépatiques ce qui conduit à une forte augmentation du glucose dans le sang (Figure 36). Enfin le glucose n'est plus assimilé par le muscle squelettique pendant l'effort et reste donc dans la circulation sanguine (Figure 36).

On distingue 2 types majeurs de diabète qui surviennent selon l'environnement et/ou des prédispositions génétiques.

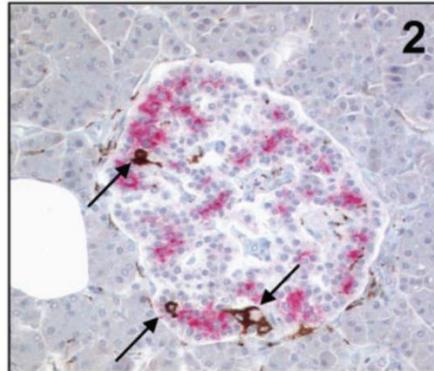
Le diabète de type I (T1D) dans lequel la destruction des cellules bêta du pancréas entraîne une carence absolue en insuline. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent les cellules β du pancréas et les détruisent (Mallone and Eizirik 2020). Il est de plus en plus évident que le diabète de type I est une maladie non seulement de l'auto-immunité mais aussi de la cellule bêta elle-même (Culina et al. 2018, Gonzalez-Duque et al. 2018, Mallone and Eizirik 2020). En effet, il a été montré que les lymphocytes T CD8 circulaient à des niveaux similaires dans le sang chez les patients diabétiques comme chez les non diabétiques. Cependant le taux de ces lymphocytes est plus important dans le pancréas des patients diabétiques (Culina et al. 2018, Gonzalez-Duque et al. 2018). Outre les prédispositions génétiques, un micro-environnement inflammatoire est installé dans les îlots de Langerhans où résident les cellules bêta, ce qui expliquerait leur destruction préférentielle par les lymphocytes T CD8. Bien qu'il ait été montré que le diabète de type I pouvait intervenir à tout âge, la maladie se déclenche généralement lors du jeune âge et s'accompagne d'un amaigrissement. Les patients sont insulino-dépendants, c'est-à-dire qu'ils doivent quotidiennement s'injecter de l'insuline pour palier à la destruction des cellules β du pancréas.

Le diabète de type II (T2D) lui, représente plus de 90 % des cas dans le monde et résulte d'une résistance à l'insuline ce qui mène à une hyperglycémie. Le T2D est souvent une conséquence du mode de vie, l'obésité contribuant à environ 55% des cas (CDC 2004). Le manque d'activité, le

Coupe d'un pancréas humain
Sain



Coupe d'un pancréas humain
Diabète de type II



CD68 / Insuline

Figure 37. Coupe de pancréas humain et marquage des macrophages au sein des îlots de Langerhans
1/ Coupe de pancréas humain sain 2/ Coupe d'un pancréas humain atteint de diabète de type II. Le marquage insuline permet de localiser les îlots de Langerhans, CD68 permet de marquer les macrophages (Flèches noires).
D'après (Donath et al. 2008).

tabagisme et la consommation d'alcool ont été reportés comme étant des facteurs de risques (Hu F. B. et al. 2001). L'insuline est produite mais la stimulation trop importante de l'organisme pour baisser le taux de glucose dans le sang finit par rendre les cellules résistantes à l'insuline. Cet épuisement du système intervient en réponse à la sédentarité, combinée à une alimentation trop riche en gras et en sucres. Si l'amélioration de l'hygiène de vie ne suffit pas, les patients suivent le plus souvent un traitement oral à base de metformine pour contrôler le taux de glucose sanguin. La résistance périphérique à l'insuline est fréquente pendant l'obésité et le vieillissement, mais la progression vers le T2D, est souvent dû à un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline et à l'apoptose des cellules β (Gilbert and Liu 2012). On parle de glucolipotoxicité car l'hyperglycémie est un prérequis pour développer des altérations intracellulaires lipidiques importantes. C'est d'ailleurs en majorité la toxicité des acides gras libres qui sont responsables de la mort des cellules β par apoptose en présence d'un taux élevé de glucose (El-Assaad et al. 2003). La glucolipotoxicité est également à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique et d'un stress oxydatif important (Poitout and Robertson 2008). L'organisme ne peut donc pas palier à la résistance à l'insuline installée à cause de l'effet synergique du glucose et des acides gras.

Les cellules pancréatiques présentent une inflammation qui participe à leur dysfonctionnement (Figure 37). Des études montrent une infiltration de cellules immunitaires, principalement de macrophages et à un dépôt d'amyloïde dans les îlots pancréatiques (Ehses et al. 2007, Kamata et al. 2014). De nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées, ce qui entretient l'inflammation au niveau des cellules pancréatiques (Eguchi and Nagai 2017).

D'autre part, de nombreuses équipes ont identifiés des prédispositions génétiques pour le T2D en mettant en évidence des loci à risques sur des gènes contrôlant la fonction ou le développement de la cellule β (Steinthorsdottir et al. 2007, Zeggini et al. 2007). Le T2D peut intervenir à tout âge, mais les premiers symptômes sont moins importants et évidents que le T1D. C'est pourquoi des patients peuvent rester non diagnostiqués pendant des années et présenter des complications graves car ils ont été pris en charge trop tardivement (IDF 2019).

3.2 Complications associées

Malgré le contrôle du taux de glucose dans le sang, les patients diabétiques subissent des fluctuations journalières importantes. De nombreuses complications micro- ou macro-vasculaires se révèlent en conséquence de l'hyperglycémie. Les complications micro vasculaires, regroupent les néphropathies, les neuropathies et les rétinopathies (Forbes and Fotheringham 2017). Les complications macro-vasculaires affectent des vaisseaux plus larges, et sont impliquées dans la

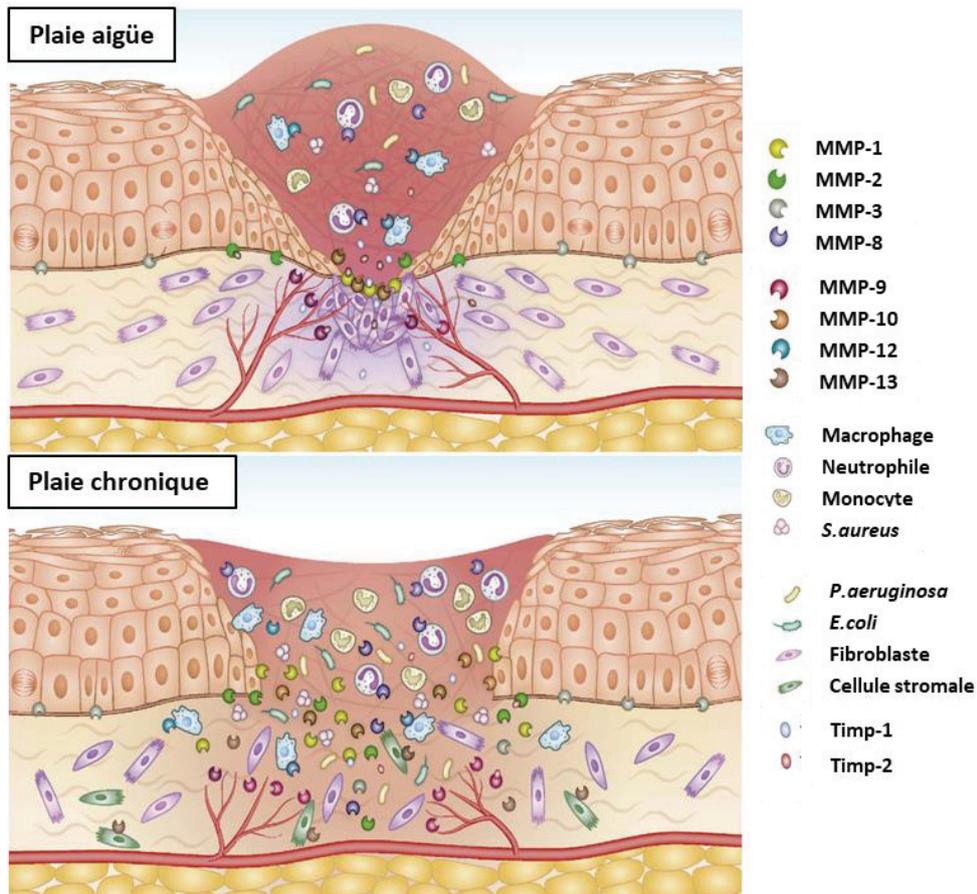


Figure 38. Plaie aigüe versus chronique

Schéma représentant la différence entre les plaies aigüe et chronique. L'activité protéolytique soutenue des MMPs, la diminution des TIMPs, l'infiltrat inflammatoire important, la difficulté des vaisseaux à effectuer des prolongements et la diminution des myofibroblastes pour contracter la plaie participent à la persistance des plaies chroniques.

D'après (Krishnaswamy et al. 2017)

survenue d'infarctus du myocarde, de crise cardiaque ou encore d'athérosclérose (Forbes and Fotheringham 2017). Une des complications majeures du diabétique est le défaut de cicatrisation qui va mener à l'apparition de plaies chroniques.

3.2.1 Les plaies chroniques

Les plaies chroniques se manifestent si la phase inflammatoire est prolongée, lors d'une ré-épithélialisation ralentie ou d'un remodelage de la MEC défectueux.

Les MMPs joueraient un rôle central dans l'installation et la persistance des plaies chroniques. En effet, ces protéases participent activement aux différentes phases de la cicatrisation, et leur dérégulation peut engendrer des conséquences importantes (Figure 38). En effet, l'activité protéolytique soutenue, principalement due à l'augmentation des MMPs, et la diminution des TIMPs, est l'un des principal facteur responsable de la cicatrisation anormale observée dans les plaies chroniques (Krishnaswamy et al. 2017). Le tissu de granulation est anormal avec des vaisseaux qui font très peu de prolongements. De plus, seulement quelques myofibroblastes sont présents et ne permettent pas une contraction efficace de la plaie ne favorisant donc pas sa fermeture. En effet, la voie du TGF- β est drastiquement diminuée dans les plaies chroniques et ne permet pas la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Pastar et al. 2010). Il a également été montré une diminution de la capacité migratoire des fibroblastes qui deviennent sénescents (Brem et al. 2007). Enfin, les kératinocytes présents aux berges de la plaie expriment une signature de gènes qui reflète une activité proliférative importante, les cyclines sont augmentées et le régulateur du cycle cellulaire, p53, est inhibé (Stojadinovic et al. 2008).

D'autre part, l'infiltrat inflammatoire est très important dans les plaies chroniques avec de nombreux neutrophiles qui participent à l'installation d'une inflammation chronique qui est délétère à une cicatrisation efficace (Herrick et al. 1992). Le fait que la plaie reste ouverte favorise sa colonisation par des bactéries qui peuvent être à l'origine d'une infection qui dépend du type et de la quantité de bactéries (Cooper and Lawrence 1996). Celles-ci peuvent s'associer pour former un biofilm qui va retarder la fermeture de la plaie en empêchant la ré-épithélialisation et la formation du tissu de granulation (Metcalf and Bowler 2013). Les plaies chroniques infectées doivent souvent être débridées afin d'éliminer le biofilm pour favoriser la mise en place du tissu de granulation. Les bactéries les plus retrouvées dans les plaies chroniques sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Bessa et al. 2015) (Figure 38).

3.2.1.1 *Le pied du diabétique*

Chez les patients diabétiques, ces plaies chroniques apparaissent le plus souvent au niveau du pied en raison des contraintes physiques : on parle dans ce cas du pied du diabétique (DFU). Selon le groupe de travail international sur le pied du diabétique (IWGDF), le DFU est une plaie profonde de la peau, pénétrant dans le derme, située sous la cheville chez un patient diabétique (Bakker et al. 2016). Le pied est une zone qui subit une pression quotidienne importante en soutenant poids du corps, la compression de la peau s'effectue entre les proéminences osseuses et des éléments extérieurs comme le sol ou la chaussure. Des cycles répétés de pression, de friction, de cisaillement et d'humidité participent activement à l'apparition de plaies chez les diabétiques. Les cycles de pression répétés sont à l'origine de cycles d'ischémie et re-perfusion sanguine qui aggravent les lésions (Peirce et al. 2000). 80 % des patients qui développent des ulcères du pied, présentent également une neuropathie, ce qui en fait le facteur principal à l'origine du DFU. Les ulcérations du tissu profond, mènent dans de nombreux cas à l'amputation du pied ou d'une partie du pied. Le DFU fait partie des plaies chroniques et peut être considéré comme une lésion de pression ou escarre (Edsberg et al. 2016). Une plaie est définie comme chronique si elle n'est pas cicatrisée après 3 mois. Elle s'installe généralement lorsque la phase inflammatoire et la phase proliférative sont prolongées et altérées (Martin P. and Nunan 2015).

3.2.1.1.1 *Marqueurs prédictifs du pied du diabétique*

Afin de mieux comprendre et de prévenir l'apparition des lésions chroniques chez le diabétique il est important d'identifier des marqueurs prédictifs.

Le taux d'HbA1c en lien avec l'apparition de DFU a été étudié mais reste controversé. Certaines études montrent que le % d'HbA1c serait corrélé à la récurrence du pied du diabétique (Dubsky et al. 2013, Khalifa 2018, Mantey et al. 1999), au contraire certaines ne montrent aucune corrélation entre la présence d'HbA1c et le DFU (Boyko et al. 1999, Vouillarmet et al. 2013). Le dosage d'HbA1c ne serait donc pas un marqueur prédictif fiable pour éviter le développement de lésion chronique.

En revanche, il existe une grande corrélation entre l'accumulation d'AGEs visualisable par l'auto-fluorescence de la peau et l'apparition d'ulcère du pied, ce qui en fait un marqueur prédictif très intéressant (Hu H. et al. 2012, Vouillarmet et al. 2013). L'auto-fluorescence cutanée est fortement corrélée à l'âge des patients et la durée du diabète, mais indépendamment de ces paramètres, elle reste corrélée aux DFU (Hu H. et al. 2012).

De plus, il apparaît que l'indice de masse corporel, la durée du diabète, le taux de glucose sanguin mais également l'usage inapproprié d'antibiotiques sont des facteurs aggravant qui favorisent

l'amputation (Bekele et al. 2020). En 2020, 25 facteurs différents ont été reportés comme pouvant aggraver le pied du diabétique et la plupart se réfèrent au style de vie. Une bonne hygiène de vie et une surveillance fréquente des pieds participeraient donc à la diminution de l'apparition et de la sévérité des plaies chroniques (Jalilian et al. 2020).

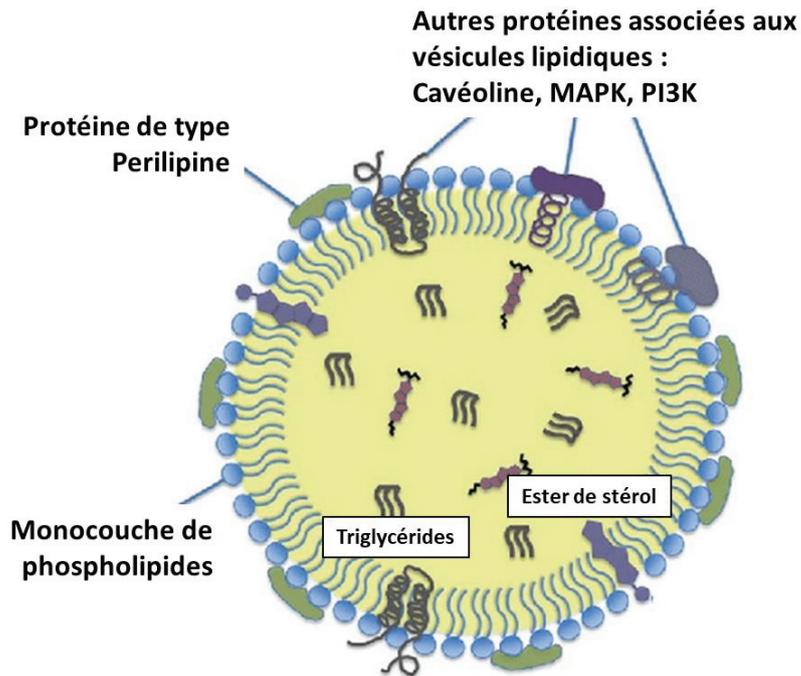


Figure 39. Structure des vésicules lipidiques

Les vésicules lipidiques sont constituées d'une membrane de phospholipides organisée en monocouche et stockent des triglycérides et des esters de stérol. Le schéma présente les différents types de protéines qui peuvent être associées à la membrane.

D'après (Onal et al. 2017)

3.2.2 Désordre métabolique, rôle des vésicules lipidiques

Le diabète a également pour conséquence l'accumulation ectopique de lipides dans des tissus non adipeux comme le muscle squelettique ou le foie, ce désordre lipidique est associé à une résistance à l'insuline et à une dysfonction cellulaire (Hong et al. 2019, Schaffer 2003). L'homéostasie des lipides est médiée par les vésicules lipidiques (LDs) qui sont retrouvées dans tous les types de cellules des mammifères (Sztalryd and Brasaemle 2017). Les LDs possèdent une membrane de phospholipides organisée en monocouche et stockent des triglycérides et des esters de stérol qui vont servir pour la synthèse de la membrane plasmique ou comme source d'énergie pour la cellule (Figure 39) (Sztalryd and Brasaemle 2017). Les adipocytes primaires peuvent contenir des LDs de plus de 100 μm mais les cellules non adipeuses comme les fibroblastes présentent des LDs entre 0,1 et 5 μm (Fujimoto T. and Parton 2011). Plusieurs protéines sont associées à la membrane des LDs, comme des protéines de signalisation (MAPK ou PI3K) ainsi que des cavéolines qui vont permettre l'endocytose ou le transport du cholestérol. Mais les protéines qui sont majoritairement et spécifiquement associées à la membrane des LDs sont les protéines de la famille des PAT, les périlipines (PLIN) (Figure 39). On retrouve 5 types de PLIN chez les mammifères (1 à 5), mais seules la PLIN2 et PLIN3 sont exprimées de façon ubiquitaire.

Les fibroblastes de souris qui expriment constitutivement la PLIN2 présentent une accumulation de LDs qui ont une taille plus élevée (Imamura et al. 2002). De plus, l'étude d'Imamura et al, montre que cette augmentation de LDs n'est pas dépendante de l'expression de gènes dits lipogéniques comme PPAR γ ou acyl-CoA synthetase. Plusieurs études révèlent que l'augmentation des vésicules lipidiques et plus spécifiquement de la PLIN2 sont associés à des maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète (McManaman et al. 2013, Varela et al. 2008). En effet une délétion complète de la PLIN2 chez des souris, les protège contre l'obésité induite par un régime riche en gras, mais aussi contre la résistance à l'insuline ou encore l'inflammation du tissu adipeux (Orlicky et al. 2019). L'expression de SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein), qui est impliqué dans la lipogenèse, est abolie chez ces souris (Libby et al. 2016).



Figure 40. *Galega officinalis*
D'après (Thomé 1885).

3.3 Traitements : la metformine

L'objectif principal de la gestion du diabète est de contrôler le taux de sucre dans le sang. Il existe de nombreux traitements pour traiter l'hyperglycémie chronique des diabétiques de type II, ici nous allons nous concentrer sur la molécule la plus fréquemment prescrite : la metformine.

La metformine fait partie de la famille des biguanides comme la phenformine et la buformine. Leur découverte est liée à celle d'une herbe médicinale européenne la *Galega officinalis* (Figure 40) riche en biguanide, utilisée dès le moyen âge pour traiter les symptômes du diabète. En 1918, il a été montré que cette plante diminuait le taux de glucose sanguin chez l'animal. A la suite de ces résultats des dérivés, dont la metformine, ont été synthétisés et certains ont été utilisés comme traitement pour les diabétiques mais induisaient cependant une certaine toxicité. A l'époque, la metformine n'avait pas été testée en traitement, les résultats ont peu fait parler d'eux et n'ont pas donné suite. Dans les années 40, la metformine et autres biguanides refont surface dans la recherche contre la malaria et l'influenza. Mais c'est en 1957 que Jean Sterne publie pour la première fois l'utilisation de la metformine pour traiter le diabète (Sterne 1957).

C'est aujourd'hui le traitement le plus utilisé pour traiter les T2D lorsque le changement d'hygiène de vie ne suffit ou ne fonctionne pas (Flory and Lipska 2019). La metformine réduit avec grande efficacité la glycémie à jeun et post-prandiale, elle joue également un rôle pour abaisser le taux d'HbA1c (Fujioka et al. 2005). Elle intervient sur différentes cibles et toutes ne sont pas encore bien connues. Son effet hypoglycémique reste étroitement lié à sa capacité à supprimer la production de glucose au niveau du foie, à réduire l'absorption de glucose au niveau de l'intestin et à améliorer la sensibilité à l'insuline ainsi que la fonctions des cellules β du pancréas (Argaud et al. 1993, Radziuk et al. 2003, Viollet et al. 2012, Yang X. et al. 2017).

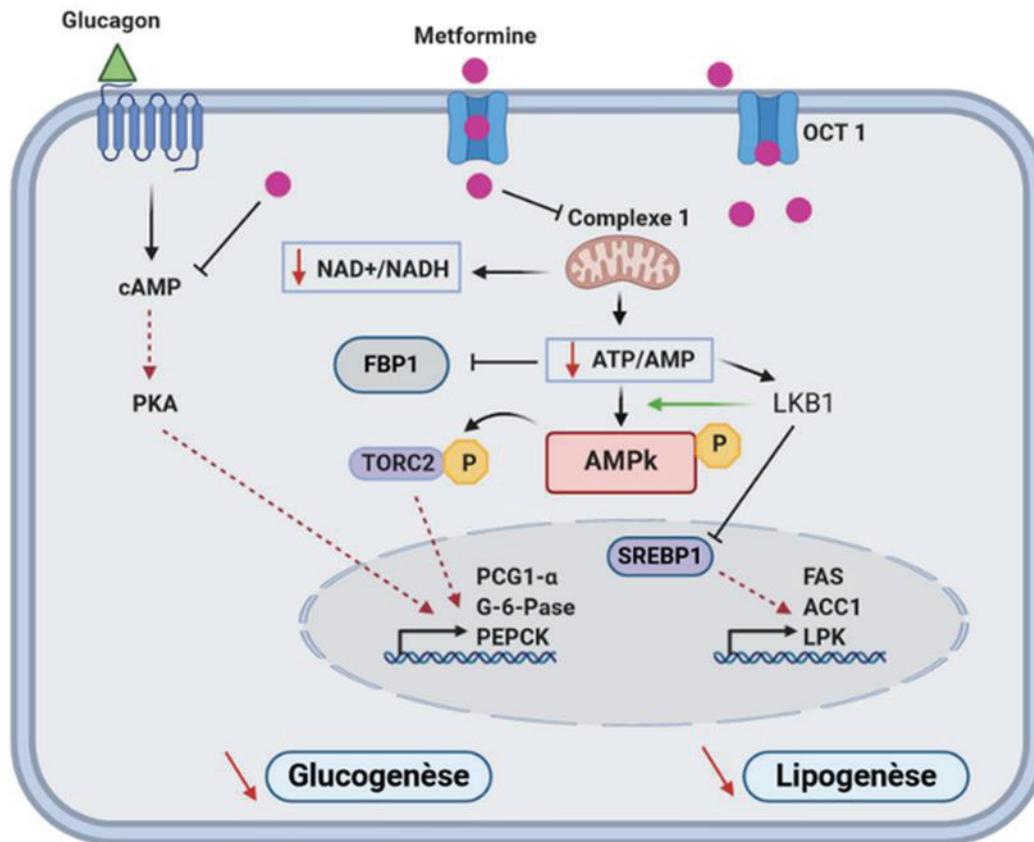


Figure 41. Mécanismes de réduction de la production hépatique de glucose par la metformine

AMPk (Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase) **FAS** (Fatty acid synthase), **ACC1** (Acetyl CoA carboxylase), **LPK** (liver pyruvate kinase), **SREBP-1** (Sterol regulatory element binding protein 1) **PGC1-α** (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α), **G-6-Pase** (glucose-6-phosphatase), **PEPCK** (phosphoenolpyruvate carboxylase), **TORC2** (The target of rapamycin complex 2), **LKB1** (liver kinase B1), **PKA** (protein kinase A), **FBP1** (fructose-1,6-biphosphatase), **OCT1** (Organic cation transporter 1).

Réalisée sur Biorender

3.3.1 Mode d'action de la metformine

3.3.1.1 Réduction de la production hépatique de glucose

La metformine est un activateur de l'AMPk (Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase) connue pour être un véritable senseur cellulaire et régulateur de l'homéostasie énergétique. L'activation de l'AMPk s'effectue par sa phosphorylation généralement en réponse à une diminution intra-cellulaire du ratio ATP/ AMP (Hardie 2014). La metformine est capable d'induire l'activation de l'AMPk en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, réduisant ainsi la production d'ATP (Figure 41) (El-Mir et al. 2000). La metformine participe à la réduction de la gluco-genèse notamment en diminuant l'expression de PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) qui est essentielle à la synthèse d'enzyme comme G-6-Pase (glucose-6-phosphatase) et la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxylase) (Figure 41) (Herzig and Shaw 2018, Koo et al. 2005, Yoon et al. 2011). La phosphorylation de l'AMPk est nécessaire à la phosphorylation du co-activateur TORC2 qui se retrouve séquestré au niveau du cytoplasme et ne peut plus induire la transcription de PGC1- α (Figure 41).

La protéine kinase LKB1 (liver kinase B1) est essentielle à la metformine pour activer l'AMPk et réguler la gluco-genèse au niveau du foie (Figure 41) (Shaw et al. 2005). LKB1, fait partie des enzymes responsables de l'activation de l'AMPk, dans des conditions de stress énergétique et d'accumulation d'AMP. Chez la souris, la délétion de LKB1 au niveau du foie induit une perte quasi-totale de la phosphorylation de l'AMPk et une activation accrue de la gluco-genèse (Just et al. 2020, Shaw et al. 2005). Via LKB1, la metformine est également impliquée dans la réduction de la lipogenèse en réduisant l'expression du facteur de transcription lipogénique SREBP-1, qui permet la transcription de FAS (Fatty acid synthase), ACC1 (Acetyl CoA carboxylase) et L-PK (liver pyruvate kinase) (Figure 41) (Shaw et al. 2005).

Bien que la metformine soit connue pour son effet sur l'activation de l'AMPk, des études montrent qu'elle peut avoir un effet sur la gluco-genèse indépendamment de l'AMPk (Foretz et al. 2010, Hou W. L. et al. 2018, Miller et al. 2013). En effet, en réduisant le ratio NAD⁺/ NADH, la metformine diminue la gluco-genèse au profit de la glycolyse (Figure 41)(Hou W. L. et al. 2018). D'autre part, Miller et al, montrent que la metformine est capable d'inhiber l'accumulation de cAMP induite après la fixation de glucagon à son récepteur (Figure 41) (Miller et al. 2013). Le cAMP active PKA (protein kinase A) qui est responsable de l'expression de gènes impliqués dans la gluco-genèse (PGC1- α , PEPCK et G-6-Pase) (Jiang and Zhang 2003). Enfin, la metformine est capable d'inhiber le FBP1 (fructose-1,6-biphosphatase) en réponse à l'augmentation d'AMP cellulaire (Figure 41) (Hunter et al. 2018).

Or, il est connu que FBP1 catalyse l'hydrolyse du fructose-1,6-biphosphate et participe activement à la glucogénèse, des déficiences en FBP1 conduisent à une hypoglycémie (Pagliara et al. 1972).

La metformine agit donc à de nombreux niveaux de la cellule hépatique de façon dépendante ou non de l'AMPk, afin de diminuer la glucogénèse (Figure 41).

3.3.1.2 Augmentation de la sensibilité à l'insuline

Outre son action au niveau de la production de glucose dans le foie, la metformine est capable d'augmenter la sensibilité des cellules à l'insuline (Cree-Green et al. 2019, Gunton et al. 2003). En effet Cree-Green et al, démontre que 3 mois de traitement à la metformine améliore significativement la sensibilité à l'insuline du corps entier chez des jeunes en surpoids ou obèses atteints de diabète de type II. D'autre part, en l'absence d'insuline, la metformine stimulerait l'activation du récepteur à l'insuline : IR β , dans des hépatocytes humain primaires (Gunton et al. 2003). Zabielski et son équipe montrent que la metformine participerait à améliorer la résistance à l'insuline systémique chez des rats suivant un régime riche en gras, en réduisant la concentration et le taux de synthèse de céramides et de diacylglycérol (Zabielski et al. 2018). Ils identifient ainsi des intermédiaires lipidiques impliqués dans l'induction d'insulino-résistance du foie. Dans le cadre d'un régime riche en gras, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline par la metformine dépendrait de l'augmentation de l'oxydation mitochondriale, ce qui permettrait d'empêcher l'accumulation hépatique de céramides et de diacylglycérol.

3.3.1.3 Augmentation de la fonction des cellules β du pancréas

Comme vu précédemment, le stress oxydatif, les acides gras libres et l'inflammation qui résulte de l'hyperglycémie vont mener à des troubles de la sécrétion d'insuline mais également à l'apoptose des cellules β du pancréas. La metformine atténue le taux de ROS induit par une concentration élevée de glucose ou d'acide palmitique dans les cellules β (Cen et al. 2018, Moon et al. 2017). La metformine est également capable de diminuer le transporteur d'acide gras libres CD36 et ainsi d'inhiber l'afflux d'acide gras dans les cellules pancréatiques (Moon et al. 2017).

La metformine restreint donc le stress oxydatif et du réticulum endoplasmique des cellules β en réponse à la glucolipototoxicité.

3.3.2 Implication de la metformine dans le cancer

Les propriétés pharmacologiques de la metformine permettent d'avoir des effets bénéfiques dans des conditions non diabétiques également. De nombreuses études montrent que cette molécule

exerce un effet important dans des cancers ou encore dans des maladies cardiovasculaires, hépatiques, neuro-dégénératives et rénales.

La metformine joue un rôle direct ou indirect dans le métabolisme cellulaire des cancers. Les effets directs sont dépendants ou non de l'AMPk. Par exemple, l'activation de l'AMPk va mener à une inhibition de mTOR, qui conduit à une diminution de la croissance cellulaire et de la prolifération, permettant ainsi de stopper l'évolution d'une masse tumorale (Gwinn et al. 2008). D'autre part, la metformine va intervenir sur l'expression de p53 qui est un gène suppresseur de tumeur crucial dont la phosphorylation permet de prévenir le développement des cancers (Hollstein et al. 1991). Dans le cas du mélanome, l'activation de l'AMPk par la metformine permet l'activation de p53, limitant ainsi l'invasion cellulaire et les métastases (Cerezo et al. 2013). L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire par la metformine permet la diminution des ROS et diminue ainsi les dommages à l'ADN (Algire et al. 2012). Son rôle indirect dans le cancer passe donc par son rôle premier de diminution du taux de glucose sanguin, ce qui permet de limiter la prolifération des cellules cancéreuses et leur survie (Sui et al. 2015). Ce traitement anti-diabétique aurait également un rôle dans le micro-environnement des tumeurs notamment au niveau immunitaire, vasculaire et angiogénique (Kurelac et al. 2020, Saito et al. 2020). La metformine serait capable de changer le statut immunitaire de cancers colo-rectaux chez des patients diabétiques, en réactivant l'immunité pour permettre à l'organisme de supprimer la tumeur (Saito et al. 2020).

3.3.3 Action dermatologique de la metformine

De récentes études ont montré un intérêt grandissant de l'effet de la metformine sur la peau, notamment dans la gestion de maladie inflammatoires cutanées (Chang and Choi 2020). Ici nous allons surtout nous intéresser aux répercussions cutanées d'un traitement chronique de metformine chez les patients diabétiques.

Si nous prenons pour exemple le psoriasis, il a été montré que les patients avec du psoriasis avaient plus de chance de développer du diabète, et inversement, que les patients diabétiques présentaient un risque accru de développer du psoriasis (Armstrong et al. 2013, Wu et al. 2015). Des études de population ont montré que l'utilisation fréquente de la metformine réduit l'incidence de nouveaux cas de psoriasis chez les personnes diabétiques ou avec des syndromes métaboliques (Singh and Bhansali 2016, Wu et al. 2015).

Cependant il a également été rapporté des effets cutanés néfastes suite à un traitement par la metformine. En effet des patients présentent des dermatoses de type lichen plan ou encore une vasculite d'hypersensibilité qui va provoquer des éruptions tachetées pourpres sur la peau suite à

Type de diabète	Espèce	Dénomination	Nature
Diabète de type I	Souris	Non obèses diabétiques (NOD)	Mutations polygénétiques
Diabète de type I	Rats	BioBreeding (BB)	Mutations polygénétiques
Diabète de type I	Souris	Induction par la Streptozocine (STZ)	Induction chimique
Diabète de type II	Souris	Ob/Ob	Mutation sur le gène de la leptine
Diabète de type II	Souris	Db/Db	Mutation sur le gène du récepteur à la leptine
Diabète de type II	Rats	« Zucker Fatty » diabétiques (ZDF)	Mutation sur le gène du récepteur à la leptine
Diabète de type II	Souris	Obèses Néo-zélandaise	Mutations polygénétiques
Diabète de type II	Souris	KK	Mutations polygénétiques
Diabète de type II	Souris	HFD (Régime riche en gras) / STZ	Régime associé à une induction chimique

Table 3. Différents modèles animaux utilisés pour étudier le diabète

l'inflammation de petits vaisseaux (Azzam et al. 1997, Ben Salem et al. 2006). Les effets secondaires au niveau cutané restent cependant des cas isolés et rares.

Dans notre hypothèse de départ, la metformine serait un bon candidat pour améliorer la cicatrisation des diabétiques par application topique. Mais qu'en est-il des patients diabétiques et de leur cicatrisation, qui sont quotidiennement sous metformine ? Ochoa-Gonzalez et son équipe ont étudié l'effet de la metformine sur l'incidence des amputations ainsi que de l'aire des ulcères du pied. Il montre que l'aire des ulcères du pied est significativement plus grande chez les patients traités avec la metformine. En revanche, de façon surprenante, les patients sous metformine sont moins sujets à l'amputation, la metformine aurait donc un effet protecteur vis-à-vis de l'amputation (Ochoa-Gonzalez et al. 2016). Cette observation pourrait être expliquée par le fait que la metformine est connue pour réduire l'inflammation, la plaie serait donc moins sujette à l'installation d'une inflammation chronique et d'une infection à l'origine d'une amputation (Lee S. Y. et al. 2015).

En dehors du traitement des diabétiques, la metformine pourrait servir à traiter l'acnée, le psoriasis ou encore le suppurativa de Hidradenitis qui est une dermatose accompagnée d'une inflammation des glandes apocrines (Sung et al. 2020).

3.4 Modèles d'études du diabète

3.4.1 In vivo

Il existe de nombreuses façons d'étudier le diabète chez l'animal, seuls quelques modèles seront développés ici (Table 3)

3.4.1.1 Diabète de type I

Le principe des modèles de T1D est basé sur la destruction des cellules β du pancréas pour empêcher la production d'insuline comme cela se produit chez l'homme

3.4.1.1.1 Modèles polygéniques : Souris NOD et Rats BB

Les souris NOD (Non Obese Diabetique) sont les résultats de différents croisements qui ont mené au bout de la 20^{ème} génération à l'installation spontanée d'un diabète de type I auto-immun (Yang Y. and Santamaria 2006). 80 % des femelles développent un diabète contre 40 % des mâles en réponse à des hormones stéroïdes sexuelles (Rosmalen et al. 2001). Au moins 20 loci différents sont mutés et impliqués dans le diabète des NOD (Ikegami et al. 2004). Une diminution de la production d'insuline commence à l'âge de 4-5 semaines et est suivie d'une destruction des cellules β du pancréas. De la

même façon, les rats BB développent un T1D auto-immun spontanément mais avec la même incidence chez les deux sexes, 90 % des rats entre 8 et 16 semaines d'âge.

3.4.1.1.2 Induction chimique

La streptozotocine (STZ) possède une structure similaire au glucose et pénètre préférentiellement les cellules β en se liant au récepteur GLUT2 (Wang Z. and Gleichmann 1998). La STZ est un agent alkylant puissant qui va induire des cassures de l'ADN et des ROS, sa cytotoxicité va provoquer la mort des cellules β du pancréas (Bolzan and Bianchi 2002). Il faut cependant limiter l'effet de la STZ pour le reste de l'organisme et pour ce faire, les animaux devront être à jeun avant l'injection. Une unique dose importante de STZ peut suffire pour induire le diabète de type I (180 mg/kg en intrapéritonéal) mais il est possible d'injecter plusieurs petites doses sur 5 jours (40mg/kg) pour induire une diminution de la sécrétion d'insuline qui implique la destruction des cellules β ainsi qu'une réaction immunitaire comme chez l'homme (Yang Z. et al. 2003b). L'induction de diabète par la STZ est accompagnée d'une perte importante de poids de façon similaire à ce qui est observé chez l'homme.

3.4.1.2 Diabète de type II

3.4.1.2.1 Modèles monogéniques

Alors que l'obésité et le diabète sont rarement dus à une mutation monogénique, ces modèles sont couramment utilisés dans la recherche sur le T2D. Les modèles les plus communs sont basés sur un défaut dans la signalisation de la leptine.

La leptine est un médiateur anorexigène qui réduit l'apport alimentaire et augmente la dépense énergétique en agissant sur son récepteur hypothalamique (OB-Rb) (Shigemura and Ninomiya 2016).

3.4.1.2.1.1 Souris *Ob/Ob*

Les souris *Ob/Ob* présentent une obésité sévère qui dérive d'une mutation spontanée sur le chromosome 6 du gène de la leptine qui a été découverte dans une souche de souris en 1949 (D'Souza A et al. 2016, Ingalls et al. 1950). L'obésité est observable à 2 semaines d'âge, l'hyperglycémie apparaît ensuite entre 7 et 12 semaines et est accompagnée d'une compensation par les cellules β du pancréas et d'une hyperinsulinémie.

3.4.1.2.1.2 Souris *Db/Db*

Les souris *Db/Db* sont homozygotes pour une mutation spontanée sur le gène du récepteur à la leptine. Le récepteur possède une longue région cytoplasmique qui contient un signal de

transduction qui active la voie JAK/STAT. Les souris Db/Db présentent une mutation autosomique récessive qui se situe sur le chromosome 4. L'ARN messager OB-Rb possède une insertion de séquence qui contient un codon stop, conduisant à une forme tronquée du récepteur sans la partie cytoplasmique qui transmet le signal (Smith G. P. 2012). Ces souris sont de bons modèles pour le diabète de type II car elles présentent une obésité importante, une hyperglycémie chronique ainsi qu'une hyper-insulinémie. L'obésité se développe entre 3 et 4 semaines, l'hyperglycémie s'installe entre 4 et 8 semaine (Fang et al. 2019). Contrairement aux souris Ob/Ob, elles développent un diabète plus sévère et ont une espérance de vie plus courte (Srinivasan and Ramarao 2007).

3.4.1.2.1.3 Rat Zucker Fatty diabétiques (ZDF)

Les rats ZDF ont été découvert en 1961 après un croisement et portent une mutation faux-sens sur le récepteur de la leptine. Ils deviennent obèses aux alentours de 4 semaines, ils présentent une obésité amoindrie mais une insulino-résistance plus importante que les Db/Db. Chez ces rats, la compensation de l'hyperglycémie par les cellules β du pancréas est impossible car elles meurent petit à petit par apoptose (Pick et al. 1998). Les rats ZDF sont donc d'abord hyper-insulinémiques puis présentent une diminution du taux d'insuline dû à la mort des cellules β du pancréas autour de 10 semaines.

3.4.1.2.2 Modèles polygéniques

Il existe des souris mimant le diabète de type II qui présentent de multiples mutations génétiques et qui sont donc plus proches de la réalité de la pathologie chez l'homme.

3.4.1.2.2.1 Les souris obèses Néo-zélandaise (NZO)

Des croisements sélectifs sont à l'origine des souris NZO qui développent de l'obésité associée au diabète. L'obésité est médiée par une résistance à la leptine car elles deviennent hyper-leptinémique à l'âge de 9-12 semaines. Seulement 50 % des souris mâles développent une hyperglycémie chronique contre 43 % pour les femelles, il existe donc une variation importante entre les individus quant à l'apparition du diabète (Haskell et al. 2002, Lubura et al. 2015). L'installation de l'hyperglycémie chronique est dépendante de la prise de poids, de la charge en sucre et en gras assimilée dans la première semaine de vie, ce qui s'avère être similaire chez l'homme (Lange et al. 2006). Un régime riche en carbohydrate permet d'induire en plus une destruction des cellules β du pancréas (Jurgens et al. 2007).

3.4.1.2.2.2 *Les souris KK*

Les souris KK viennent d'une souche japonaise qui présentent une obésité relative qui se déclare à l'âge adulte, elles développent une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline importante ainsi qu'une hyper-insulinémie dans le muscle et le tissu adipeux (Nakamura and Yamada 1967). Le taux d'insuline pancréatique est augmenté et associé à une hypertrophie des îlots de Langerhans. Les souris KK sont de bons modèles pour étudier la néphropathie en exprimant des taux importants d'HbA1c (Okazaki et al. 2002).

3.4.1.2.3 *Autres*

Il est possible d'induire le T2D chez des souris via l'utilisation d'un régime riche en matière grasse. La prise de poids est importante menant rapidement à l'obésité qui est associée à une résistance à l'insuline, et à un manque de compensation des cellules β du pancréas avec une intolérance au glucose. Souvent des souris C57BL/6J qui suivent un HFD sont utilisées pour étudier l'intolérance au glucose mais aussi le diabète de type II. Une fois l'intolérance au glucose installée, il est possible d'effectuer une injection intrapéritonéale de STZ à faible dose (30 à 40 mg/kg) chez des rats ce qui provoque une diminution importante de la masse cellulaire β (Skovso 2014). Ce modèle non génétique est intéressant puisqu'il permet d'induire plus lentement l'installation du T2D de façon similaire à ce qu'il se passe chez l'homme, l'ajout de STZ permet d'étudier les phases tardives du T2D où les cellules β commencent à mourir.

3.4.2 *Modèles In vitro*

En réponse à l'hyperglycémie chronique, les diabétiques présentent une glycation accrue et une accumulation d'AGEs dans leur organisme. L'étude de la glycation cellulaire est donc pertinente pour étudier le diabète. Il existe différentes façons d'induire une accumulation d'AGEs *in vitro*.

3.4.2.1 *AGEs-BSA*

Induire la glycation en augmentant le taux de glucose dans le milieu de culture pourrait paraître la méthode la plus simple mais elle est fastidieuse car il faut plusieurs semaines ou mois pour produire des AGEs à partir du glucose, ce qui est trop long la culture *in vitro*. Cependant, une alternative existe et consiste à incuber du sérum d'albumine bovin (BSA) avec du glucose à forte concentration (0,5M) à 37 °C pendant 3 mois afin que les protéines du BSA soient fortement glyquées. Après avoir supprimé l'excédent de glucose dans la solution, les AGEs-BSA peuvent être utilisés en culture cellulaire (Yang P. Y. et al. 2019). Cette méthode permet d'induire une multiplicité de produits de glycation car à partir du glucose les produits intermédiaires et de nombreux types d'AGEs différents ont pu être produits. L'ajout d'AGEs-BSA dans le milieu de culture est très adapté pour étudier l'axe AGE-RAGE, en revanche

il l'est moins pour analyser la glycation des protéines directement produites par le type cellulaire utilisé.

3.4.2.2 Les α -oxoaldéhydes

L'avantage d'utiliser les dicarbonyles pour induire la glycation *in vitro* est la rapidité, en effet ils ont une capacité glycante bien plus supérieure que le glucose, seules quelques heures d'incubation avec les cellules suffisent pour produire des AGEs (Guillon et al. 2021). De plus, le 3DG, le glyoxal et le methylglyoxal sont retrouvés en grande quantité dans le sérum des patients diabétiques ce qui en font des modèles d'étude pertinent pour étudier le diabète (Scheijen and Schalkwijk 2014).

D'autre part, certaines études utilisent des supports de culture avec un revêtement de collagène qui a été préalablement glyqué pendant une nuit avec des α -oxoaldéhydes ou du glucose (Dandia et al. 2019, Loughlin and Artlett 2009, Sassi-Gaha et al. 2010). Cette méthode permet d'analyser la réponse cellulaire induite en fonction de la matrice sur laquelle les cellules reposent. Par exemple, il apparaît que la viabilité et la migration des fibroblastes est diminuée lorsque la matrice extracellulaire a été préalablement glyquée (Loughlin and Artlett 2009, Sassi-Gaha et al. 2010).

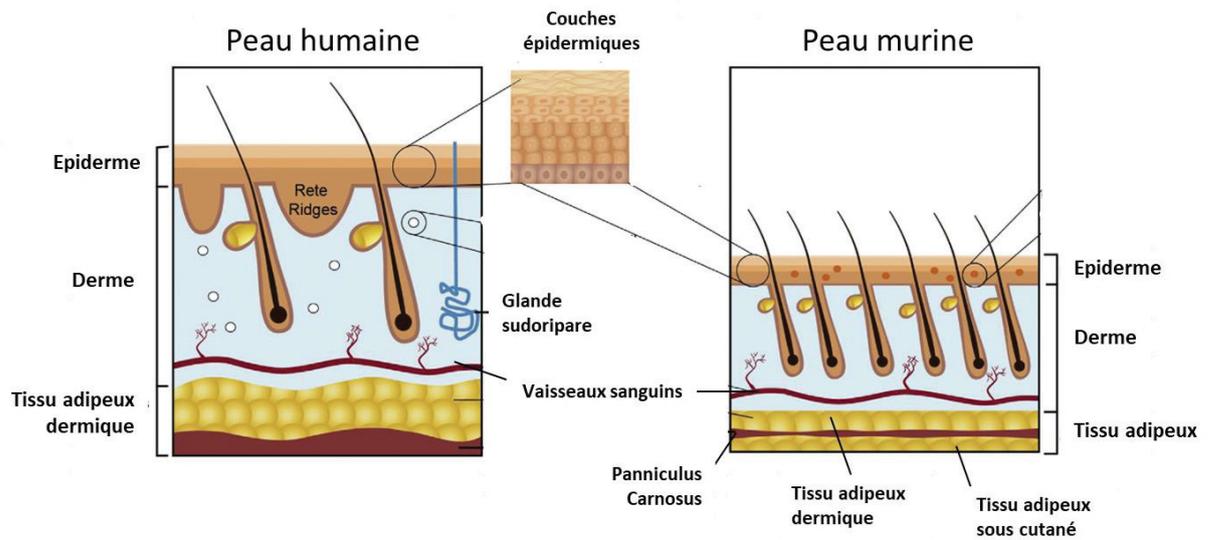


Figure 42. Différences entre peau humaine et peau de souris.

L'épiderme humain est plus épais avec plus de couches épidermiques, la peau humaine présente des glandes sudoripares qui sont absentes de la peau de souris. En plus d'une pilosité importante, la peau de souris présente un muscle absent chez l'homme : le panniculus carnosus qui sépare le tissu adipeux dermique du tissu adipeux sous cutané.

D'après (Zomer and Trentin 2018)

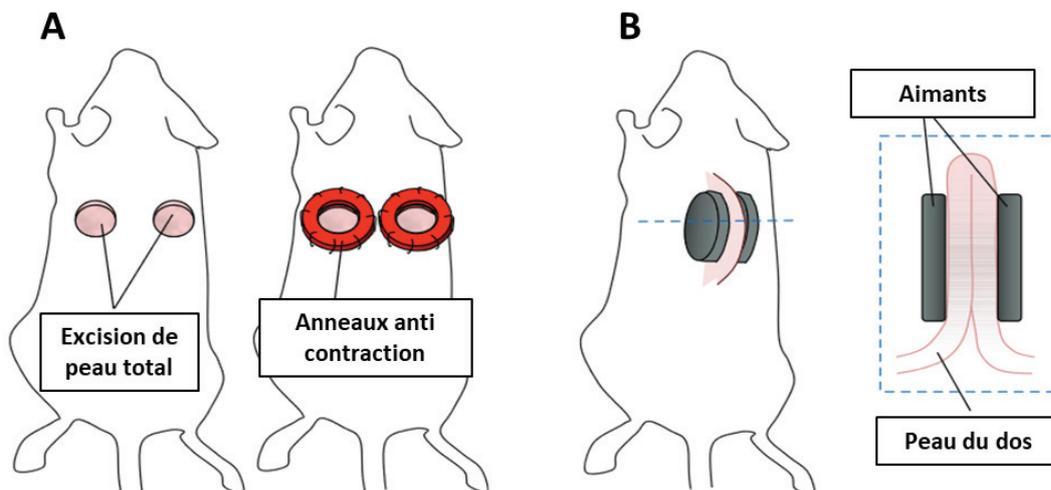


Figure 43. Modèles de lésion chez la souris

A/ Plaie d'excision **B/** Plaie de pression.

D'après (Wong et al. 2011)

3.5 Modèle d'étude de la cicatrisation

La souris est un modèle très utilisé en recherche et notamment pour les études de la peau. Les modèles murins ont contribué à notre compréhension de la dermatologie et des maladies cutanées mais aussi de la cicatrisation, c'est pourquoi il est important de connaître les similitudes et les différences entre la peau humaine et murine (Figure 42)

3.5.1 Différences peaux humaine et murine

Bien que la peau de souris se compose de 3 couches comme la peau humaine (épiderme, derme et hypoderme), des différences importantes existent dans l'anatomie et la physiologie de chaque couche (Figure 42). La première différence est la présence importante de poil chez la souris, comparé à l'homme. Le cycle est le même que chez l'homme (phases anagène, catagène et télogène) mais celui de la souris est de 3 semaines alors que pour l'homme il est de plusieurs années (Porter 2003). L'épaisseur de la peau varie également, elle est plus épaisse chez l'homme que chez la souris ($\pm 100 \mu\text{m}$ versus $25 \mu\text{m}$) (Zomer and Trentin 2018). Cette différence vient notamment du fait que l'épiderme présente 5 à 10 couches chez l'homme contre seulement 2 ou 3 chez la souris (Pasparakis et al. 2014). D'autre part, alors que nous retrouvons des crêtes épidermiques et des papilles dermiques chez l'homme, celles-ci sont absentes dans la peau de souris, tout comme les glandes sudoripares apocrines.

Enfin, comme expliqué plus tôt dans l'introduction, la limite entre tissu adipeux dermique et tissu adipeux sous cutané n'existe pas chez l'homme. Au contraire, la souris présente une fine couche musculaire, le panniculus carnosus, qui sépare ces deux types de tissu adipeux.

La présence de ce tissu musculaire est très importante pour la cicatrisation car si chez l'homme la fermeture des plaies se fait en majorité par la formation d'un tissu de granulation et par re-épithélialisation, chez la souris c'est surtout l'action du muscle qui va induire une contraction pour rapprocher les berges de la plaie.

3.5.2 Modèles de lésions cutanées

Il existe plusieurs modèles de lésion chez les animaux comme le porc le rat ou encore la souris. Ici nous développerons les deux modèles les plus utilisés chez la souris pour étudier la cicatrisation (Figure 43). Les modèles de souris diabétiques cités en 3.4.1 et 3.4.2 peuvent être utilisés pour mimer les plaies chroniques retrouvées chez le patient diabétique. Premièrement, il est possible d'effectuer une plaie excisionnelle à l'aide d'un punch pour créer une lésion profonde de la peau totale qui s'étend jusqu'au panniculosus carnosus (Figure 43. A). Afin de limiter l'action de la

contraction de la plaie par le muscle cutané présent chez la souris, il est possible d'installer des anneaux au niveau des berges de la plaie pour éviter le phénomène de contraction (Galiano et al. 2004). La cicatrisation est ensuite suivie en prenant des photos jusqu'à la fermeture complète de la plaie. Ce premier modèle de lésion est le plus couramment utilisé du fait de sa praticité en termes d'accès à la lésion pour tester des molécules et de facilité d'étude de la ré-épithélialisation ainsi que du tissu de granulation. En revanche, ce modèle ne permet pas de mimer la pression et la répétition de cycles ischémie-reperfusion qui participent à l'installation des plaies chez les diabétiques.

C'est pourquoi un modèle de pression a été développé sur peau complète chez la souris à l'aide d'aimants positionnés de part et d'autre de la peau du dos de la souris (Figure 43. B) (Stadler et al. 2004). C'est un modèle qui est aujourd'hui peu utilisé mais qui permet de reproduire pleinement les conditions de développement des DFU (Remoué 2020). Il est facilement applicable et modulable, car il est possible de faire varier la taille des aimants ainsi que le temps et/ou le nombre d'applications. Il est également possible d'implanter une plaque métallique sous la peau et d'apposer un aimant à la surface de la peau pour provoquer une ischémie (Peirce et al. 2000).

OBJECTIFS DU **TRAVAIL DE THESE**

Les patients diabétiques présentent un risque accru de développer des plaies chroniques, le plus souvent au niveau du pied pouvant mener jusqu' à l'amputation. Les causes de ce défaut de cicatrisation sont encore mal connues. Il a cependant été montré que les diabétiques en conséquence de l'hyperglycémie, accumulaient, au niveau de la peau, des produits terminaux de glycation comme le CML.

L'objectif de ce travail de thèse a été de mettre en évidence les effets de la glycation au niveau cutané afin de mieux comprendre les défauts de cicatrisation des diabétiques. L'efficacité de la metformine *in vitro* et sur des plaies chroniques induites chez la souris diabétique Db/Db, a été étudiée

La première problématique à laquelle nous avons voulu répondre est comment modéliser le diabète *in vitro*. Nous savons que les dicarbonyles contribuent fortement aux complications observées chez les diabétiques. Ici, nous avons choisi d'utiliser le glyoxal comme agent glyquant car il est retrouvé en grande quantité dans le plasma des patients diabétiques et est à l'origine de la production de CMLs qui sont fortement présents dans le derme et l'épiderme des patients.

De par ses nombreuses capacités pharmaceutiques présentées dans l'introduction, nous avons souhaité tester la metformine comme molécule thérapeutique pour améliorer la cicatrisation des diabétiques.

Afin de mettre en évidence les paramètres de la cicatrisation altérés par le glyoxal, nous avons effectué différentes expériences *in vitro* sur les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes en culture.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du glyoxal sur le comportement de fibroblastes dermiques humains. La prolifération, la migration, la production de matrice extracellulaire et le métabolisme des lipides ont été analysés. Nous avons ensuite cherché à comprendre l'effet du glyoxal et de la metformine sur les kératinocytes et cellules endothéliales dans un environnement complexe. Pour ce faire, un modèle de derme vascularisé, une peau totale et un modèle de cicatrisation 3D ont été réalisés. Enfin, un pansement à base de metformine a été testé sur un modèle de plaies chroniques chez la souris diabétiques afin d'étudier son efficacité dans un modèle *in vivo*.

MATERIELS ET **METHODES**

Nom	Type	Localisation de l'explant de peau	Sexe	Age
NHDF 1	Fibroblastes	Mammaire	Féminin ♀	23 ans
NHDF 2	Fibroblastes	Mammaire	Féminin ♀	21 ans
NDHF 3	Fibroblastes	Mammaire	Féminin ♀	18 ans

Table 4. Fibroblastes utilisés en 2D

1 Culture cellulaire 2D

1.1 Préparation des solutions

Le **glyoxal** (Ref.50649 Sigma) est dilué avec de l'eau à 0,6 M puis stérilisé via un filtre de 0,22 µm. A cette concentration le glyoxal est conservé jusqu'à 15 jours à 4°C. Le glyoxal est dilué dans le milieu de culture selon la concentration finale désirée.

La **metformine** (IPCA lot.4314 et lot. 5200 Ref.ML2RMI) est diluée à 700 mM dans de l'eau puis est stérilisée via un filtre de 0,22µm. A cette concentration la metformine est aliquotée par 500 µl et conservée à - 20°C. La metformine est diluée dans le milieu de culture selon la concentration finale souhaitée.

L'**acide ascorbique** est préparé extemporanément à 10 mg/ml dans du milieu de culture. Il est ensuite dilué au 200^{ème} pour atteindre une concentration finale au contact des cellules de 50 µg/ml. Après filtration, l'acide ascorbique est conservé maximum 6h à 4°C à l'abri de la lumière.

FPS-ZM1 (4-Chloro-N-cyclohexyl-N-(phenylmethyl)benzamide) (Ref. ab235552 Abcam) est solubilisé dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) puis dilué à 500 mM dans du milieu de culture. Le milieu est ensuite stérilisé à l'aide d'un filtre 0,22 µm.

1.2 Fibroblastes

Des fibroblastes primaires issus de 3 donneurs différents sont utilisés entre les passages 2 et 10 (Table 4). Les cellules sont cultivées en milieu DMEM Low Glucose (1g/l) (Ref.31885049 Thermofisher) supplémenté avec 10 % SVF et 1% Zellshield (Ref.13-0150 Cliniscience) à 37 °C et 5% CO₂ en milieu humide.

1.2.1 Analyse des protéines matricielles déposées et sécrétées

Les cellules sontensemencées à raison de 30 000 cellules par cm² dans des boîtes de 100 mm et cultivées pendant 48h pour atteindre la confluence. 50 µg/ml d'acide ascorbique sont ajoutés ainsi que 0,6 mM de glyoxal. Après 6 jours, les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS 1X et 5ml de DMEM low glucose 1% Zellshield et 0% SVF sont ajoutés. Le SVF est éliminé dans le but d'analyser les protéines du surnageant. Le 8^{ème} jour post-confluence, le surnageant est récupéré. Aux 5 ml de milieu sont rajoutés 200 µl d'inhibiteur de protéase 25 X (Ref.5056489001 Merck) et 125 µl d'EDTA 0,2 M puis les milieux sont congelés à -80 °C. Les cellules restées sur le fond de la boîte sont rincées 2 fois avec du PBS 1X et congelées à sec à -80°C pour une extraction ultérieure.

1.2.2 Analyse de la migration par scratch test / Time lapse

Les cellules sontensemencées à raison de 30 000 cellules par cm² dans des plaques 24 puits et cultivées pendant 48h pour atteindre la confluence. Un scratch est ensuite réalisé avec un cône p20 au centre de chacun des puits. 3 rinçages doux avec du PBS 1X sont effectués. Afin de réduire la prolifération des fibroblastes la concentration en SVF est abaissée à 1%. 1ml de DMEM low glucose 1% SVF ; 1% Zellshield est ajouté en présence de 0,6 mM de glyoxal et/ou 7 mM de metformine. Des photos sont ensuite prises toutes les 10 min pendant 48h grâce à un microscope time lapse inversé (Zeiss AxiObserver Z1) à 37°C et 5% CO₂ à l'aide d'un objectif 10. L'aire non refermée est quantifiée via Image J toutes les 6 heures. La quantification de la fermeture est effectuée sur 6 puits par condition en calculant la moyenne de 2 zones d'un puits.

1.2.3 Cytométrie en flux

Les fibroblastes sontensemencés dans des flasques 75 cm² à raison de 3x10⁵ cellules par flasque. Après 3 jours, 0,6 mM de glyoxal et/ou la metformine à 7, 2,1 et 0,7 mM sont ajoutés dans le milieu de culture pendant 24h. Après trypsination et centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 500 µl (2x10⁶ cellules / mL) de tampon de fixation (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, and 0.75 mM MgCl₂). Une solution de 2.5 mM CaCl₂, 5 µL Annexin V-APC (BD Biosciences #550474), et 2.5 µg/mL iodure de propidium (Roche # 11348639001) est préparée et ajoutée à 100 µl de suspension cellulaire. Après 10 min sur glace à l'abri de la lumière, les cellules sont traitées par cytométrie en flux (BD Biosciences FACS Melody). Le signal est analysé avec le logiciel Flow Jo. Un minimum de 30 000 cellules par échantillons est analysé. Les cellules Annexin V-/PI- sont considérées comme viable et non apoptotiques, les cellules Annexin V+/PI- en apoptose précoce et les cellules Annexin V+/PI+ en apoptose tardives.

1.2.4 Analyse de la morphologie cellulaire et des forces mécaniques.

Les fibroblastes sont cultivés selon le protocole de Guillon et al 2021. La société Bioméca a ensuite réalisé les mesures du module élastique qui est inversement proportionnel à la rigidité ce qui permet d'estimer la force de traction comme décrit dans l'article Guillon et al 2021. Concernant la morphologie cellulaire elle est estimée via le logiciel image J. La circularité est calculée grâce au ratio : $4\pi \times \text{surface} / \text{périmètre}$. La solidité correspond au rapport : l'aire de la cellule / l'aire de l'enveloppe convexe. Enfin, l'aspect ratio est calculé par le rapport : axe majeur / axe mineur.

Réactifs Agilent	Volume à ajouter	Concentration finale
Seahorse XF DMEM Medium pH 7,4 Ref.103575-100	48,5 ml	
Seahorse XF Glucose (1 M) Ref.103577-100	500 µl	10 mM
Seahorse XF Pyruvate (100 mM) Ref.103578-100	500 µl	1 mM
Seahorse XF L-Glutamine (200 mM) Ref.103579-100	500 µl	1 mM

Table 5. Réactifs et quantités utilisés pour le Seahorse

Solution Stock	Volume de drogue à prélever	Volume de milieu d'essai à prélever	Volume à ajouter dans le port	Port	Concentration finale dans le port
Oligomycin 1,5 mM Sigma Ref.O4876	30 µl	2970 µl	55 µl	A	1,5 µM
FCCP 1 mM Sigma Ref.C2920	90 µl	2910 µl	62 µl	B	3 µM
Rotenone 500 µM Sigma Ref.R8875 + Antimycin A 500 µM Sigma Ref.A8674 Sigma	60 µl	2940 µl	69 µl	C	1 µM

Table 6. Préparation des drogues pour le Seahorse

1.2.5 Analyse du métabolisme cellulaire par la technologie Seahorse

Les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits Seahorse (Agilent, Ref.100777-004) à raison de 40 000 cellules par puits dans 1 ml. Le lendemain, soit 24h avant l'analyse, le milieu est changé en ajoutant 0,6 mM de glyoxal. De plus, la cartouche 24 puits (Agilent, Ref.102340-100) qui va servir de capteur le jour suivant, est hydratée avec 1ml de calibrant (Agilent, Ref.103059-000) par puits. La cartouche est placée toute la nuit à 37°C sans CO₂. Le lendemain, 50 ml de milieu d'essai DMEM sont préparés selon la Table 5

La plaque avec les cellules est retournée sur un papier pour éliminer complètement le milieu de culture et 1 ml de milieu d'essai est ajouté dans chacun des puits. La plaque est placée 1h à 37°C sans CO₂. En attendant les drogues sont préparées et ajoutées dans les ports selon la Table 6.

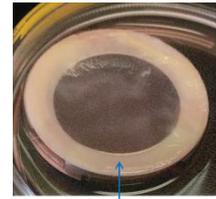
Après avoir rempli les ports, la calibration de la cartouche peut être lancée via le Seahorse en suivant le protocole « cell mito stress » du logiciel Wave. En parallèle la morphologie des cellules est vérifiée par microscopie à contraste de phase. La plaque de culture est de nouveau retournée sur un papier pour éliminer tout le milieu d'essai et 500 µl de milieu d'essai sont ajoutés dans chacun des puits.

A la fin de la calibration la plaque avec le calibrant est retirée et la plaque de culture est ajoutée dans le Seahorse. La mesure peut commencer selon le programme suivant :

Programme de mesure du Seahorse

- Calibration : 20 à 30 min
- 3 mesures du niveau basal de respiration : 3 cycles (3 min de mix / 2 min de pause / 3 min de mesure)
- Injection Oligomycin (Port A)
- 3 cycles de mesure (3 min de mix / 2 min de pause / 3 min de mesure)
- Injection FCCP (Port B)
- 3 cycles de mesure (3 min de mix / 2 min de pause / 3 min de mesure)
- Injection Roténone / Antimycin A (Port C)
- 3 cycles de mesure (3 min de mix / 2 min de pause / 3 min de mesure)

Une fois l'analyse terminée, la plaque de culture est retournée sur un papier pour éliminer le milieu. 100 µl de DAPI (2 µg/ml) sont ajoutés dans chacun des puits pour permettre la coloration des noyaux. Après 15 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les cellules sont observées le nombre de noyaux est automatiquement compté. Via le logiciel Wave, une normalisation est effectuée à partir du compte de noyaux par puits. Le taux de consommation d'oxygène est représenté en pmol/min/40 000 cellules.



Ancrage en whatman

	Plaque 12 puits	Plaque 6 puits
Taille perforateur extérieur (cm)	2,2	3,16
Taille perforateur intérieur (cm)	1,6	2,2
Volume de solution à ajouter par puit (ml)	0,5	1,5

Table 7. Taille de perforateur à utiliser pour les ancrages des éponges

Eponge Chitosan / Collagène Bovin	Recette (375 ml)
Chitosan II	0,9375 g
Collagène bovin type I-III	3,375 g
Acide acétique glacial 0.1%	375 ml

Table 8. Produits à utiliser pour fabriquer une éponge de collagène bovin / chitosan

2 Culture d'un modèle de peau 3D

2.1 Fabrication des éponges

Afin de pouvoir manipuler les éponges, des ancrages sont préparés avec du papier whatman. Les ancrages vont permettre d'éviter que l'éponge se contracte trop. Des perforateurs ronds de deux tailles différentes sont utilisés afin d'obtenir un cercle de papier whatman. La dimension des perforateurs à utiliser diffère en fonction de la taille de l'éponge souhaitée et du support utilisé (Table 7.)

Les ancrages sont placés au fond des puits des plaques avant la distribution de la solution de collagène bovin / chitosan.

De l'acide acétique glacial 0,1% est préparé en ajoutant 500 µl d'acide acétique glacial pur à 374,5 ml d'eau apyrogène (Table 8).

Préparation du collagène bovin :

262,5 ml d'acide acétique glacial 0,1% sont placés dans un bécher d'1L avec un agitateur magnétique à 37°C. Il est impératif que la température soit de 37 °C sinon le collagène aura de la difficulté à se dissoudre et si la température est supérieure à 40°C, le collagène va se dénaturer. Le collagène est ajouté dans le bécher et la solution est laissée sous agitation constante à 37°C pendant 1 heure (Table 8).

En parallèle, le chitosan est préparé de la façon suivante :

Sous une hotte chimique, le chitosan est dissout dans 75ml d'acide acétique glacial 0,1 %, sous agitation constante dans un bécher de 250 ml (Table 8). Pour aider à la dissolution, 10 gouttes d'acide acétique glacial pur sont additionnés. Cette étape est réitérée toutes les 5/10 min jusqu'à dissolution complète. La solution est maintenue sous agitation lorsqu'elle devient claire et sans morceaux de chitosan.

Le chitosan est alors progressivement versé dans le collagène, jusqu'à la formation d'un petit siphon. L'agitation est ensuite prolongée 30 min à 37°C. Pour finir, la solution est complétée avec le reste d'acide acétique glacial 0,1%. Le mélange est maintenu à 37°C pendant la distribution dans les puits. Si des bulles se forment, il est important de les éliminer. Les éponges sont lyophilisées et peuvent être conservées à température ambiante pendant plusieurs mois.

2.1.1 Stérilisation

La stérilisation des éponges est effectuée par le remplissage complet des plaques (puits et espaces entre ces derniers) avec de l'éthanol 70% pendant 24h à 4°C. Par la suite, l'éthanol est enlevé par aspiration en conditions stériles (sous hotte à flux laminaire), puis les puits sont rincés avec du milieu DMEM. Les puits sont ensuite remplis avec 3 ml de milieu de culture DMEM, 300 U /ml de pénicilline G, 75 µg/ml de gentamicine et 1,5 µg/ml de fungizone (soit 3 fois la dose d'antibiotiques habituellement utilisée) et incubés à 37°C, 8 % CO₂ pendant 24h. Le milieu est alors changé pour du DMEM sans antibiotiques et les plaques sont incubées à 37°C, 8 % CO₂, afin de vérifier s'il y a présence d'une contamination microbiologique.

Nom	Type	Localisation	Sexe	Age
NHDF 4	Fibroblaste	Mammaire	Femme ♀	55 ans
NHDF 5	Fibroblaste	Mammaire	Femme ♀	38 ans
HDMEC	Endothéliale	Prépuce	Homme ♂	54 jours
NHEK-GFP	Kératinocyte	Prépuce	Homme ♂	12 jours
NHEK	Kératinocyte	Mammaire	Femme ♀	55 ans
NHEK	Kératinocyte	Abdominale	Homme ♂	38 ans

Table 9. Cellules utilisées pour les expériences en 3D

2.2 Culture cellulaire

2.2.1 Fibroblastes

Les NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) (Table 9) sont cultivés entre les passages 4 et 6 dans du DMEM supplémenté avec du SVF 10%, 100U /ml de pénicilline et 25 µg/ml de gentamicine.

2.2.2 Cellules endothéliales

Les HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells) (Table 8) sont cultivées dans des flasques 75 cm² gélatinées entre les passages 4 et 6. Pour ce faire, de la gélatine 0,1% est préparée à partir de la gélatine 1% stérile stockée à 4°C. La gélatine 1% est chauffée au bain marie à 37 °C. Le volume nécessaire d'eau apyrogène est ajouté pour une concentration finale de 0,1% et la solution est stérilisée par passage sur un filtre 0,22 µm. 10 ml de la solution de gélatine 0,1% sont ajoutés dans des flasques 75 cm² et il faut s'assurer que toute la surface soit bien recouverte. Les flasques sont laissées à 4°C entre 12 et 30 h bien à plat. Les flasques sont posées à la verticale et le surplus de gélatine est aspiré. Les flasques peuvent être conservées à 4°C pendant plusieurs mois.

Les HDMECs sont cultivées dans le milieu « Endothelial Cell Growth Medium MV2 » (Promocell, Ref.C-22121) supplémenté avec les additifs du « Supplement pack » (Promocell, Ref.C-39221). 100 U/ml de pénicilline et 25 µg/ml de gentamicine sont ajoutés. Les cellules sont trypsinées à 90 % de confluence.

2.2.3 Kératinocytes

Les NHEK (Normal Human Epidermal Keratinocyte) (Table 8) sont utilisés entre les passages 2 ou 3. Du milieu DMEM HAM (DH) est supplémenté avec 5 % de sérum de veau reconstitué FetalClone II de hyclone (Fisher scientific, Ref.SH3006603), 100 U/ml de pénicilline, 25 µg/ml de gentamicine, 0,4 µg/ml d'hydrocortisone, 5 µg/ml d'insuline, 10 ng/ml d'EGF (Epidermal Growth Factor) et de l'Isoprotérénol. Une couche nourricière humaine de fibroblastes (CNH) va permettre la culture des kératinocytes. Des fibroblastes sont préalablement irradiés (Québec, CANADA), ils n'ont alors plus la capacité de proliférer mais sont capables de sécréter les facteurs nécessaires à la prolifération et participent à la survie des kératinocytes. 0,6 millions de CNH sontensemencés par flasque 75 cm² et 20 ml de milieu DH sont ajoutés. Le milieu est changé une semaine plus tard. Afin de conserver les facteurs sécrétés par les CNH, le milieu ne doit pas avoir été changé depuis minimum 24h lorsque les kératinocytes sontensemencés. 0,3 millions de ses derniers sont alors ajoutés par flasque dans les 20 ml de milieu des CNH. Les cellules sont trypsinées à 90 % de confluence.

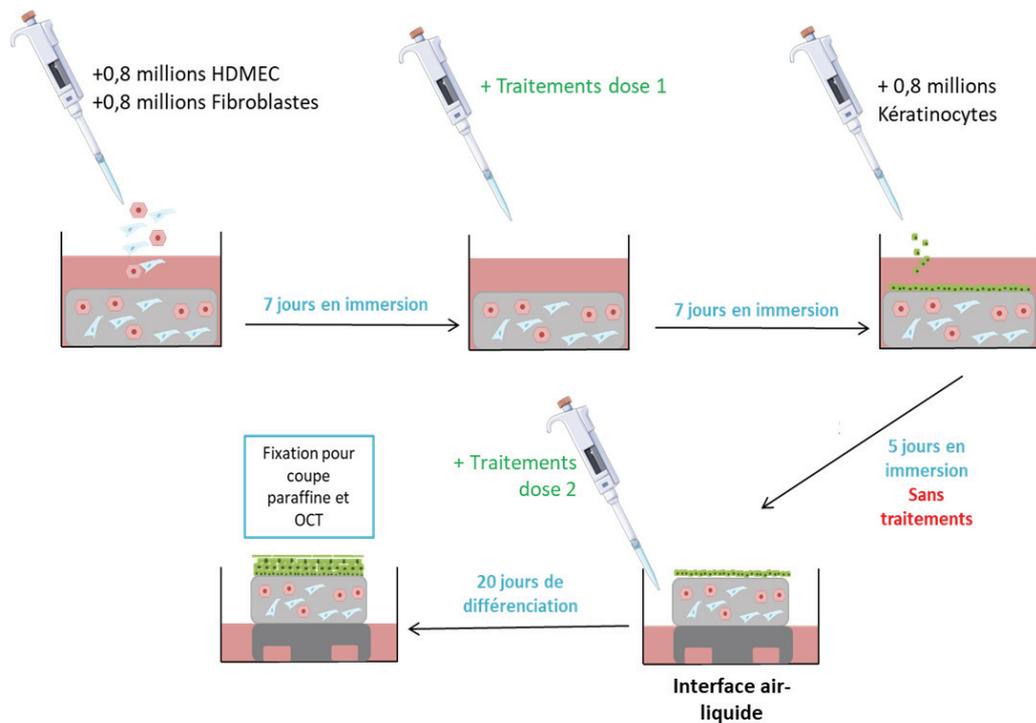


Figure 44. Protocole de culture des dermes vascularisés et des peaux complètes 3D

Traitement Dose 1 : Derme	Traitement Dose 2 : Epiderme (Interface air-liquide)
Contrôle : Non traité	Contrôle : Non traité
Glyoxal 0,5 mM	Glyoxal 0,2 mM
Metformine 0,7 mM	Metformine 0,07 mM
Metformine 2,1 mM	Metformine 0,38 mM
Metformine 0,7 mM + Glyoxal 0,5 mM	Metformine 0,07 mM + Glyoxal 0,2 mM
Metformine 2,1 mM + Glyoxal 0,5 mM	Metformine 0,38 mM + Glyoxal 0,2 mM

Table 10. Concentrations utilisées pour les peaux 3D

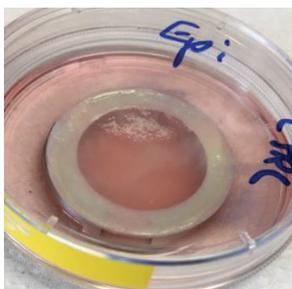


Figure 45. Photo d'une peau 3D élevée à l'interface air-liquide

2.3 Modèle de dermes vascularisés et de peaux complètes 3D

Des éponges stérilisées en plaque 12 puits sont utilisées. Le milieu des éponges est éliminé pour procéder à leur ensemencement. Une suspension cellulaire est préparée avec 0,8 millions de cellules endothéliales et 0,8 millions de fibroblastes dans 50 μ l. Pour ce faire, un mélange volume pour volume des deux milieux de culture est utilisé pour resuspendre et ensemercer les cellules. 50 μ l de la suspension sont déposés de façon homogène à la surface des éponges (Figure 44). Afin de permettre aux cellules d'adhérer, les éponges sont laissées au moins 2h dans l'incubateur à 37 °C et 8% CO₂. Un milieu volume à volume de milieu pour fibroblastes et cellules endothéliales avec 25 μ g/ml d'acide ascorbique est préparé (on considère que le milieu pour cellule endothéliale contient déjà de l'acide ascorbique). 3 ml par puits sont ajoutés et le milieu est changé tous les 2 jours pendant 7 jours en laissant l'éponge en immersion. Les traitements correspondants à la dose 1 sont ensuite ajoutés dans le milieu (Table 10) et maintenus pendant 7 jours avec l'éponge en immersion (Figure 44). Au bout de 14 jours certaines éponges sont fixées en PFA 4% pour obtenir des modèles de dermes vascularisés. Sur d'autres éponges, des kératinocytes sont ensemencés sur les dermes pour obtenir un modèle complet de peaux reconstruite. Pour ce faire, les éponges sont placées en plaques 6 puits et des anneaux correspondant au diamètre de l'éponge sont positionnés sur les éponges. 2 ml de milieu DH complet + 50 μ g/ml acide ascorbique, sont ajoutés autour de l'anneau. Il faut bien vérifier l'étanchéité de l'anneau et s'assurer que le milieu autour ne passe pas au centre de l'anneau au niveau de l'éponge. Une suspension de 0,8 millions de kératinocytes / 500 μ l bien homogène est préparée Et 500 μ l de cette suspension sont ajoutés au centre de l'anneau et laissés à 37°C et 8% CO₂ pendant 5 h. L'anneau peut ensuite être retiré délicatement et le volume par puits est ajusté à 5 ml. Les éponges sont gardées en immersion pendant 5 jours sans aucun traitement et uniquement en présence de milieu DH complet avec acide ascorbique 50 μ g/ml pour permettre aux kératinocytes de proliférer et de former la couche basale (Figure 44). Les éponges sont ensuite placées à l'interface air-liquide (le derme au contact du milieu et l'épiderme au contact de l'air). Un support permet la surélévation des éponges tout en favorisant la circulation du milieu sous l'éponge (Figure 45). Le milieu de culture utilisé à partir de ce moment est un milieu DH dépourvu d'EGF pour favoriser la différenciation des kératinocytes. Les traitements sont également ajoutés d'après la dose 2 décrite dans la Table 10. Les concentrations de tous les traitements sont diminuées une fois les kératinocytes ajoutés car ils sont plus sensibles que les fibroblastes et les cellules endothéliales. 4 ml de milieu sont ajoutés par puits, le milieu doit atteindre le niveau de l'éponge sans l'immerger. Le milieu est changé tous les 2 jours pendant 20 jours à l'interface air-liquide en présence des traitements correspondant à la dose 2. Les éponges sont ensuite fixées au PFA 4%.

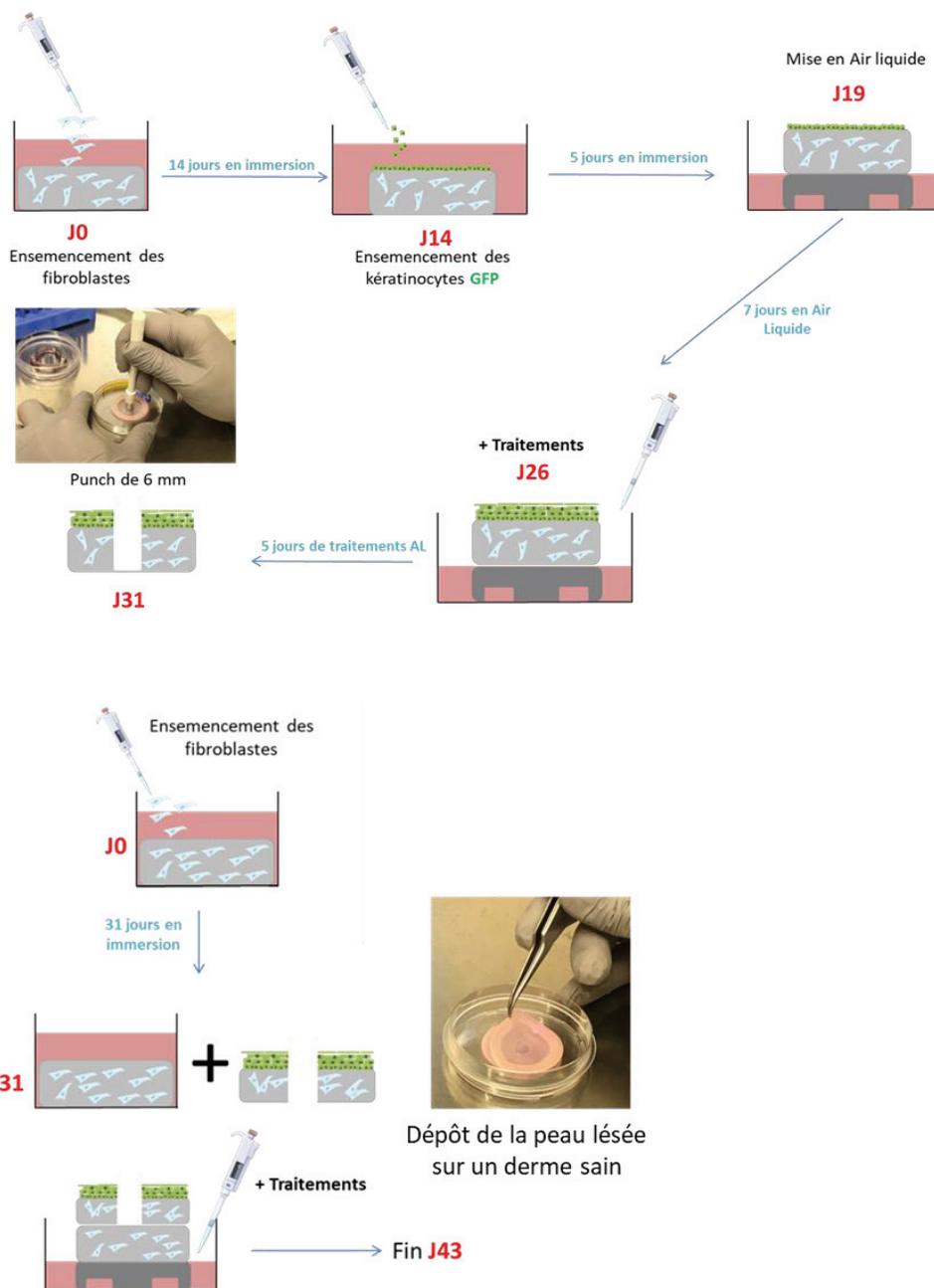


Figure 46. Protocole de culture pour le modèle de cicatrisation 3D

Traitement Epiderme
Contrôle : Non traité
Glyoxal 0,3 mM
Metformine 0,07 mM
Metformine 0,38 mM
Metformine 0,07 mM + Glyoxal 0,3 mM
Metformine 0,38 mM + Glyoxal 0,3 mM

Table 11. Concentrations utilisées pour le modèle de cicatrisation 3D

2.4 Modèle de cicatrisation 3D

Des éponges stérilisées en plaque 6 puits sont utilisées. Le milieu des éponges est éliminé pour procéder à l'ensemencement des cellules. Une suspension cellulaire avec 0,8 millions de fibroblastes dans 200 µl est préparée. 200 µl de cette suspension sont déposés de façon homogène à la surface des éponges et laissés au moins 2h dans l'incubateur à 37 °C et 8% CO₂. 5 ml de DMEM complet avec 50 µg/ml d'acide ascorbique sont ensuite ajoutés. Attention, il faut préparer le double de derme avec fibroblastes par rapport au nombre de modèle de cicatrisation souhaité *in fine*.

La moitié des dermes est cultivée pendant 31 jours en immersion avec DMEM complet + acide ascorbique 50 µg/ml/. L'autre moitié est destinée à l'ensemencement des kératinocytes GFP. Au bout de 14 jours en immersion, les éponges sont transférées dans des boîtes de pétri 65 mm. Des anneaux correspondant au diamètre de l'éponge sont positionnés sur les éponges. 4 ml de milieu DHC + AA 50 µg/ml sont ajoutés en périphérie de l'anneau. Après s'être assuré de l'étanchéité de l'anneau, 2 millions de kératinocytes GFP (réalisé par le LOEX en amont de mon séjour de recherche sont obtenus par transfection de lentivirus) dans 500 µl sont ensemencés au centre des anneaux et laissés à 37°C et 8% CO₂ pendant 5 h. L'anneau peut ensuite être retiré délicatement et le volume par puits est ajusté à 10 ml. Les éponges sont gardées en immersion pendant 5 jours sans aucun traitement et uniquement en présence de milieu DH complet avec de l'acide ascorbique à 50 µg/ml pour permettre aux kératinocytes de proliférer et de former la couche basale. Comme décrit précédemment, les éponges sont ensuite placées à l'interface air-liquide (Figure 46). Le milieu est changé pour un milieu DH dépourvu en EGF. L'épiderme est maintenu pendant 7 jours à l'interface air-liquide pour lui permettre de se différencier avec 6 ml de milieu. Les traitements sont ensuite ajoutés dans le milieu de culture (Table 11) et renouvelés dans le milieu tous les 2 jours pendant 5 jours. Le 31^{ème} jour le milieu est retiré et le dessous de l'éponge est délicatement placé sur une compresse stérile pour enlever un maximum d'humidité. Un punch de 6 mm de diamètre est réalisé (Figure 46). Le milieu des dermes cultivés pendant 31 jours est retiré, la partie supérieure de l'éponge est cette fois-ci placée sur une compresse stérile quelques secondes. Le derme est déposé au fond d'une nouvelle p65 avec la partie séchée vers le haut. L'épiderme est déposé sur le derme en veillant à ne pas faire de bulles (Figure 46). A l'aide d'une pince à clips de chirurgie et de 3 clips, le derme est fixé à l'épiderme. Pendant 2 heures à 37°C et 8% CO₂ le montage est laissé à sec afin de permettre l'adhésion des dermes entre eux. Le montage est positionné sur un support air-liquide et 6 ml de milieu DH sans EGF en présence des différents traitements sont ajoutés.

La première photo est prise le lendemain avec une caméra lumina qui va permettre de révéler la fluorescence des kératinocytes. La fermeture de la plaie est ensuite suivie par prise de photos tous

Tampon d'extraction	2 ml
Na₂HPO₄, 2H₂O à 0.5 M pH 7.7 ou 8	64 µl
Urée 8M	1500 µl
NP-40 10%	100 µl
Inhibiteur protéase 25X	80 µl
EDTA 0.2 M	50 µl
Eau double distillée	206 µl

Tampon de dilution	4 ml
Na₂HPO₄, 2H₂O à 0.5M pH7.7 ou 8	128 µl
Inhibiteur protéase 25X	160 µl
EDTA 0.2 M	100 µl
Eau	3612 µl

Table 12. Composants des tampons d'extraction et de dilution présents utilisés pour extraire la matrice extracellulaire

les deux jours pendant 12 jours. L'aire non refermée est quantifiée via Image J. Une moyenne sur 5 éponges est réalisée.

3 Technique de biochimie

3.1 Extraction des protéines

3.1.1 Extraction des protéines intracellulaires

Les cellules cultivées dans des boîtes 100 mm sont rincées 2 fois avec du PBS 1X. 184 µl de tampon T-PER (Ref.78510 Thermofisher) + 8 µl d'inhibiteur de protéase 25X (Ref.5056489001 Merck) + 8 µl d'inhibiteur de phosphatase (5 mM NaF; 50 mM βGlycerol phosphate; 1 mM Na₃NO₄) sont ajoutés par condition. Le lysat est placé sur glace et est vortexé toutes les 5 min pendant 30 min. Une centrifugation à 14 000 g pendant 10 min à 4°C, permet d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est conservé à -20°C à court terme et à -80°C à plus long terme.

3.1.2 Extraction des protéines de la matrice extracellulaire

La veille de l'extraction, la quantité souhaitée de tampon d'extraction et de dilution est préparée suivant la Table 12.

Dans le cas où elles ont été congelées, les cellules sont décongelées sur glace pendant 10 min. 2 ml de tampon d'extraction froid sont ajoutés pour lyser les cellules pendant au moins 2 h à 4°C sous agitation douce. Un volume de tampon de dilution froid est ajouté pour récupérer le lysat après avoir gratter les cellules à l'aide d'un grattoir. La boîte est ensuite rincée avec un nouveau volume de tampon de dilution afin de récupérer un maximum du lysat. La concentration en urée de 2M est alors idéale pour la précipitation. L'ADN et les débris cellulaires sont éliminés après une centrifugation de 5 min à 4°C et 20000g. Les protéines du surnageant obtenues, sont précipitées en ajoutant du TCA pour une concentration finale de 10 %. La précipitation se poursuit en laissant les protéines 20 min sur glace. Les protéines sont culotées et le surnageant est éliminé après une centrifugation de 10 min à 10 000 g et 4°C. Le culot est rincé et rapidement vortexé avec 1ml d'acétone à -20°C. Après 10 min de centrifugation à 10 000 g et 4°C, le culot est séché sous la hotte. Les culots sont resuspendus dans 288 µl de tampon RIPA avec 12 µl d'inhibiteur de protéase 25X (Ref.5056489001 Merck). Les culots étant très denses, une étape de sonication est nécessaire. La sonication est réalisée 3x3 sec à une amplitude de 40-50 Hz à l'aide d'un sonicateur. Les échantillons sont placés à nouveau sur de la glace et cette étape est réitérée jusqu'à la dissolution complète du culot. Les protéines sont ensuite prêtes à être dosées.

3.1.3 Extraction des protéines du surnageant

S'ils avaient été congelés, les milieux sont décongelés à 4°C puis centrifugés 5 min à 100g afin d'éliminer le culot. Les protéines sont précipitées en ajoutant 100 µl de Triton X100 1% et 140 µl de TCA (6,1N) (Trichoroacide)/ 5ml. Afin de mixer et d'optimiser la précipitation, le tube est inversé 8 fois et incubé 20 min sur glace. Les protéines sont culotées et le surnageant est éliminé après une centrifugation de 20 min à 19 000g et 4°C. Le culot est lavé et rapidement vortexé à l'éthanol absolu froid. Une centrifugation de 10 min à 19 000g et 4°C est effectuée. Le culot est de nouveau lavé en renouvelant la dernière étape. Le surnageant est éliminé et 1 ml d'acétone froid est ajouté. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 10 min à 19 000g et 4°C. Le culot est séché 15 min à température ambiante puis resuspendu dans 200 µl de tampon RIPA en présence de 8 µl d'inhibiteur de protéase 25X.

3.2 Immunofluorescence

3.2.1 BODIPY 493/503-Perilipin-2

Réalisation d'un tampon de microscopie (d'après le protocole de Listenberger) : 5g d'albumine de sérum bovin (BSA) ; 0,5g saponine, QSP 500 ml de PBS 1X sans calcium et sans magnésium. Le tampon est filtré à l'aide d'un filtre 0,22 µm. Une solution de 0,5 mg/ml de BODIPY 493/503 est préparée en dissolvant la poudre dans de l'éthanol. Les aliquots de 500 µl peuvent être conservés 1 an à -20 °C. Une fois la culture terminée, le milieu de culture est éliminé et sans rinçage, 2ml de PBS 1X-formaldéhyde 2% sont ajoutés dans les puits pour fixer les cellules pendant 20 min n à température ambiante. 4 rinçages avec 2 ml de PBS 1X sont réalisés. Afin de perméabiliser et bloquer les sites aspécifiques, 2 ml du tampon de microscopie sont ajoutés pour 1h d'incubation à température ambiante. L'anti Perilipin-2 (Santa Cruz Biotechnology, Ref.sc-377429) et le BODIPY 493/503 (0,5 mg/ml) sont dilués au 200^{ème} dans du tampon de microscopie. 150 µl sont ajoutés par lamelle et le tout est incubé la nuit à 4°C en chambre humide. 4 rinçages avec 2 ml de PBS 1X sont réalisés. L'anticorps secondaire est dilué au 1000^{ème} dans le tampon de microscopie et 150 µl sont ajoutés par lamelle. Après 4 rinçages de 2 ml avec du PBS 1X, les noyaux sont colorés au DAPI 2 µg/ml pendant 10 min à température ambiante. 4 derniers rinçages au PBS 1X sont requis avant monter les lamelles sur lame à l'aide d'une goutte de Permafluor.

3.2.2 Immunofluorescence et coloration HES

Le milieu des éponges est aspiré et les supports air liquide, si présents, sont retirés. Les éponges sont fixées avec du PFA 4% à température ambiante pendant 30 min. Après 3 rinçages au PBS 1X, du sucrose 30 % est ajouté pour une incubation sur la nuit à 4°C. Après un rinçage au PBS 1X, les éponges sont

découpées et partagées en 2 à l'aide d'un scalpel et d'une pince. Chaque moitié est coupée en trois : un tiers est destiné au montage des blocs paraffines et les deux tiers sont destinées au montage des blocs OCT.

Montage des blocs OCT : Des blocs OCT englobant les échantillons sont réalisés à l'aide d'azote liquide. Les coupes, la coloration HES (Hématoxyline Eosine Safran) et les immunofluorescences ont ensuite été effectuées par la société Novotec. Les références utilisées sont les suivantes : CD31 (Abcam 26364), K1 (Abcys VMA1612), Ki67 (Abcam ab15580), Loricrine (Abcam ab85679).

3.2.3 Sur éponge complète pour observer le réseau vasculaire

Cette méthode permet d'effectuer une immunofluorescence sur l'éponge dans sa globalité sans coupe. Le but est d'observer le réseau vasculaire au travers de l'éponge par une vue du dessus par microscopie confocale. Pour ce faire, après fixation, des petits carrés des éponges dermiques sont découpés et placés dans des plaques 24 puits. 300 µl de milieu de blocage sont ajoutés : PBS 1X + Triton X100 0,3% + sérum d'âne 5%. Après 20 min d'agitation à température ambiante, les anticorps primaires PECAM 1 (R&D system AF806) et NG2 (BD Biosciences 554275) sont dilués dans le milieu de blocage au 400^{ème} et 200 µl sont ajoutés par puits. Une incubation toute la nuit sous agitation à 4°C est effectuée. Le lendemain, les éponges sont rincées 3 fois 2 ou 3 min, avec du PBS 1X + Triton X100 0,3%. Les anticorps secondaires sont dilués dans le milieu de blocage. 200 µl sont ajoutés par puits. Incuber 1h à température ambiante sous agitation. Les éponges sont rincées

Gel de séparation : pour 1 gel de 1,5 mm (10 ml)		
Acryl./bis Acryl %	6	10
Eau (milliQ) (ml)	5.24	4.015
Tris pH 8.8 (ml)	2.5	2.5
SDS 10% (µl)	100	100
TEMED (µl)	10	10
A.Bis Acryl 30/0.8% (ml)	2	3.33
APS 20% (µl)	100	100

Gel de concentration (10 ml)	
Acryl./bis Acryl %	4
Eau (milliQ) (ml)	6.1
Tris pH 6.8 (ml)	2.5
SDS 10% (µl)	100
TEMED (µl)	10
A.Bis Acryl 30/0.8% (ml)	1.3
APS 20% (µl)	100

Table 13. Protocole d'un gel de western blot 6 et 10 %

Anticorps I ^{aire}	Origine	Blocage	Dilution
Anti-Carboxymethyl-Lysine Abcam ab27684	Lapin	BSA 5%	1/500 ème
Anti-AMPKa Cell signaling #2532	Lapin	BSA 5%	1/1000 ème
Anti-Phospho-AMPKα (Thr172) Cell signaling #2535	Lapin	BSA 5%	1/1000 ème
Anti-collagène I Novotec 20111	Lapin	BSA 5%	1/1000 ème
Anti-Actine Merck 6A2910	Souris	BSA 5%	1/5000 ème

Table 14. Anticorps utilisés en Western-Blot

2 fois au PBS 1X Triton X00 0,3% et une fois avec du PBS 1X seul. Les lamelles sont montées sur lame avec du milieu de montage en s'assurant que le haut de l'éponge est au contact de la lamelle.

3.3 Western blot

Les protéines sont dosées d'après les recommandations du fournisseur avec le kit Pierce BCA Assay Kit (Thermofisher, Ref. 23225).

Le gel de séparation est préparé (Table 13) avec un pourcentage d'acrylamide choisi en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt à analyser. Le gel de concentration est également préparé, toujours à 4 % d'acrylamide dans les études présentées.

Les protéines sont dénaturées dans du tampon Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Bromophenol Blue 0,01%; glycérol 10%; SDS 2%; DTT 50 mM) à 95 °C pendant 5 min. Après dépôt sur gel, la migration est effectuée dans un tampon TG-SDS 1X à 90 V pendant 20 min puis à 150V jusqu'à la fin de la migration. Une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) est activée 30 sec dans de l'éthanol. Le montage pour transfert liquide est réalisé. Le transfert est effectué à 4°C à 220 mA pendant 1h minimum. La présence des protéines sur la membrane est vérifiée après coloration pendant 2 min au rouge ponceau. Une solution de TBS-1X- tween 20 0,1% est utilisée comme solution de lavage et de dilution. Le blocage est réalisé à l'aide de BSA 5% dilués dans TBS-Tween pendant 1h à température ambiante sous agitation. Les anticorps primaires sont dilués dans TBS-Tween BSA 5% (Table 14) et sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation. Après 3 lavages, l'anticorps secondaire diluée au 10000^{ème} (goat anti-rabbit HRP conjugate, BioRad #1706515 ou goat anti-mouse HRP conjugate BioRad #1706516) est incubé 1h à température ambiante sous agitation. 5 lavages de 5 min sont effectués avant d'incuber la membrane à l'ECL (Thermofisher, #34080) pendant 5 min avant la révélation par chimioluminescence via la caméra fusion.

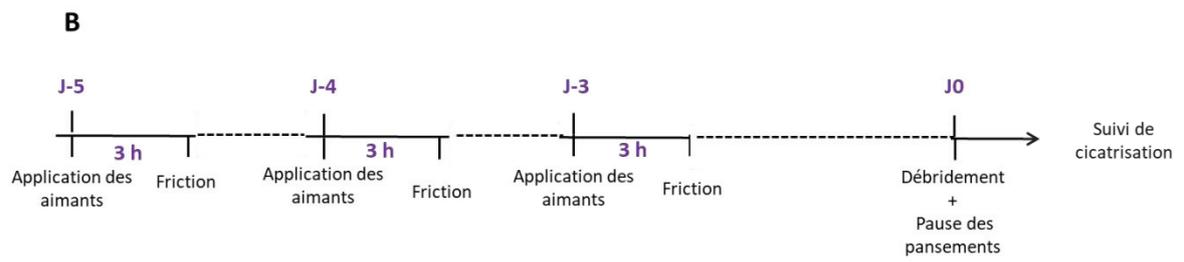


Figure 47. Induction de la plaie de compression chez la souris

4 Expériences *in vivo*

Les expérimentations ont été réalisées sur souris diabétiques (BKS-Leprdb/db/JOrLrJ) mâles (Janvier Labs). Il s'agit de souris diabétiques congéniques mutantes pour le récepteur à la leptine (Leprdb) dites Db/Db. Dès leur arrivée, les souris sont réparties de façon aléatoire dans des cages à raison de 2 animaux/cage avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture dans une animalerie respectant un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux étaient âgés de 12 semaines au début des expérimentations avec 4 semaines de diabète (vérifié par Janvier Labs).

Les expérimentations ont été réalisées conformément à la réglementation en rigueur sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques. Un dossier de demande d'autorisation à l'expérimentation animale décrivant les procédures a été soumis et approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale de Lyon (numéro d'enregistrement CECCAPP_IBCP_2020-004) puis par le Ministère de la Recherche – Service Autorisation de projet.

4.1 Dépilation

48h avant les expérimentations, les souris sont dépilées afin de pouvoir étudier la peau et induire des plaies sans le poil dense et épais de ces souris. Les souris sont d'abord anesthésiées sous isoflurane (OSALIA) avec une induction à 4% puis à 2% au masque sur une plaque chauffée à 35°C. Les poils sont rasés à l'aide d'un rasoir électrique puis de la crème Veet[®] est étalée sur le dos de la souris. Après 30 sec, la crème est éliminée avec une compresse sèche puis avec une compresse avec de l'eau tiède pour éliminer tous les poils. La peau est ensuite séchée avec une compresse sèche.

4.2 Induction de l'ulcère de pression

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (4% puis 2% au masque sur plaque chauffée à 35°C. Le dos de la souris et les aimants sont désinfectés à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool 70%. En effectuant un pli de peau au milieu du dos, les aimants sont positionnés de part et d'autre (Figure 47. A). L'animal est replacé dans sa cage pendant 3h. La souris est de nouveau anesthésiée sous isoflurane, les aimants sont retirés et la peau est remise à plat. Des frictions sont appliquées à l'aide d'un coton-tige : 10 allers-retours de gauche à droite et 10 aller-retour de haut en bas.

24h et 48h après le début de la compression les étapes sont répétées afin d'obtenir 3 compressions de 3h sur 3 jours (Figure 47. B). 4 jours après la plaie est nettement visible, un débridement est donc réalisé afin d'enlever la croûte qui s'est installée. Une fois le débridement effectué, les différents pansements prédécoupés à la taille des plaies sont disposés sur le dos des souris. Afin de maintenir

les pansements en place pendant 2 jours des bandes de Tegaderm[®] d'une largeur de 1,5 cm font le tour du corps de la souris. Le pansement est changé et une photo est prise tous les 2 ou 3 jours jusqu'à la fin de la cicatrisation.

RESULTATS

1 Résultats 2D *in vitro*

1.1 La glycation par le glyoxal induit de profonds changements dans le comportement des fibroblastes dermiques.

L'étude de l'effet du glyoxal sur le comportement des fibroblastes a fait l'objet d'une publication dans le journal « BMJ Open Diabetes Research & Care » en 2021.

Glycation by glyoxal leads to profound changes in the behavior of dermal fibroblasts

Cécile Guillon,^{1,2} Sandra Ferraro,² Sophie Clément,¹ Marielle Bouschbacher,¹ Dominique Sigauco-Roussel,² Christelle Bonod ²

To cite: Guillon C, Ferraro S, Clément S, *et al*. Glycation by glyoxal leads to profound changes in the behavior of dermal fibroblasts. *BMJ Open Diab Res Care* 2021;**9**:e002091. doi:10.1136/bmjdr-2020-002091

► Supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjdr-2020-002091>).

DS-R and CB are joint senior authors.

Parts of this study were presented at the '7th Skin Physiology International Meeting' in France in 2020 and at 'Club de Recherches Cliniques du Québec' in Estérel, Canada in 2019.

Received 22 December 2020
Revised 17 March 2021
Accepted 21 March 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

¹Urgo Research Innovation and Development, Chenôve, France
²Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LBTI UMR 5305, Lyon, France

Correspondence to
Dr Christelle Bonod;
christelle.bonod@ibcp.fr

ABSTRACT

Introduction Diabetes is a worldwide health problem that is associated with severe complications. Advanced Glycation End products (AGEs) such as Nε-(carboxymethyl) lysine, which result from chronic hyperglycemia, accumulate in the skin of patients with diabetes. The effect of AGEs on fibroblast functionality and their impact on wound healing are still poorly understood.

Research design and methods To investigate this, we treated cultured human fibroblasts with 0.6 mM glyoxal to induce acute glycation. The behavior of fibroblasts was analyzed by time-lapse monolayer wounding healing assay, Seahorse technology and atomic force microscopy. Production of extracellular matrix was studied by transmission electronic microscopy and western blot. Lipid metabolism was investigated by staining of lipid droplets (LDs) with BODIPY 493/503.

Results We found that the proliferative and migratory capacities of the cells were greatly reduced by glycation, which could be explained by an increase in fibroblast tensile strength. Measurement of the cellular energy balance did not indicate that there was a change in the rate of oxygen consumption of the fibroblasts. Assessment of collagen I revealed that glyoxal did not influence type I collagen secretion although it did disrupt collagen I maturation and it prevented its deposition in the extracellular matrix. We noted a pronounced increase in the number of LDs after glyoxal treatment. AMPK phosphorylation was reduced by glyoxal treatment but it was not responsible for the accumulation of LDs.

Conclusion Glyoxal promotes a change in fibroblast behavior in favor of lipogenic activity that could be involved in delaying wound healing.

INTRODUCTION

Diabetes is a metabolic disease and a major public health problem: it affected more than 460 million people in the world in 2019 (International Diabetes Federation). Chronic hyperglycemia is the main feature of type I and type II diabetes, which leads to microvascular, neuropathic, and skin complications. Indeed, 6.3% of diabetics suffer from a substantial delay in wound healing, which results in chronic ulcers that can lead to foot amputation. Approximately one million

Significance of this study

What is already known about this subject?

- Advanced Glycation End products (AGEs) accumulate over time in the skin of patients with diabetes.
- Collagen is one of the first targets of glycation, and this leads to the disruption of the dermis, thereby potentially contributing to the skin complications in diabetes.
- The accumulation of AGEs leads to impaired wound healing and the formation of chronic ulcers.

What are the new findings?

- There have been few studies to date of the phenotype of dermal fibroblasts in the presence of glyoxal, and our research shows that AGEs alter key properties of fibroblasts.
- Exposure to glyoxal reduced fibroblast proliferation and migration.
- We demonstrate that although collagen was being synthesized, it was not being deposited in the extracellular matrix.
- For the first time, we show that glycation can induce ectopic lipid accumulation through increased expression of PLIN2 in dermal fibroblasts, independently of the AMPK pathway.

How might these results change the focus of research or clinical practice?

- Treatment of fibroblasts with glyoxal reproduces some of the modifications found in the skin of diabetics.
- This model could be used to study the impaired wound healing in patients with diabetes and to test new therapeutic molecules and approaches.

patients with diabetes undergo toe or foot amputations every year.¹

Advanced glycation end products (AGEs) are one of the key factors involved in hyperglycemia-related complications. AGEs are the result of the chemical reaction of glucose with protein amino acid residues, which then initiates a complex process through a non-enzymatic reaction called the Maillard reaction.^{2,3} Common reaction products are

members of the α -oxoaldehyde family, which comprise glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone (3-DG).² Mera *et al* reported that the formation of AGEs in vivo is highly dependent on α -oxoaldehyde and may contribute to diabetic complications.⁴ Glyoxal is found in large quantities in the plasma of patients with diabetes and it is responsible for the formation of N ϵ -(carboxymethyl) lysine (CML).^{3,5-7} Proteins with a slow turnover rate such as collagen are particularly subject to glycation and can be cross-linked by glyoxal.⁵ Thus, diabetes results in the accumulation of AGEs in skin as collagen-CML which may contribute to the disruption of skin integrity, as indicated by the high rate of impaired wound healing in patients with diabetes.⁸⁻¹⁰ A wound that does not heal after 3 months is called a chronic wound. This generally occurs when the inflammatory, the proliferative, and the remodeling phases of the wound healing process are prolonged and/or altered.¹¹

The proliferation phase involves fibroblasts from the non-injured areas that start to proliferate and migrate towards the center of the wound.^{12,13} At this time, the fibroblasts secrete mainly collagen III and they can differentiate into myofibroblasts that have contractile capacities to reach the wound edges. At the same time, neoangiogenesis results in vascularization of the dermis, and re-epithelialization closes the epidermis. Then, the purpose of the remodeling phase of the extracellular matrix (ECM) is to replace the scar tissue with a physiological matrix. During this phase, the fibroblasts produce mainly collagen I in order to restore a matrix that resembles uninjured tissue.¹⁴ Here, we wanted to study the behavior of fibroblasts in a context of increased glycation, as is the case in patients with diabetes. Many studies have shown that α -oxoaldehyde-modified collagen affects fibroblast viability.^{15,16} However, the neosynthesis of collagen by fibroblasts and their capacities to migrate and proliferate in the presence of AGEs remain unclear.

In addition, it is known that glyoxal can mimic the cellular metabolic stresses in diabetes.¹⁷ Indeed, diabetes is linked with ectopic fat accumulation in non-adipose tissue, including skeletal muscle and liver, associated with insulin resistance and cell dysfunction.^{18,19} An increase in lipid droplets (LDs) and their associated protein perilipin-2 (PLIN2) are associated with metabolic diseases such as diabetes or obesity.^{20,21} Here, we investigated whether glycation by glyoxal could result in impaired lipid metabolism, with an accumulation of LDs, as observed in patients with diabetes.

The aim of this study was to investigate how increased glycation can affect the dermis during diabetes in order to obtain a better understanding of the impaired wound healing in patients with diabetes. We focused on the behavior of fibroblasts treated with an acute dose of glyoxal to mimic the accumulation of AGEs that occurs with diabetes. Our results could be used to study related skin diabetic complications and test new therapeutic molecules for their ability to improve skin healing.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Cell culture

Normal human dermal fibroblasts were obtained from breast biopsies of women who were between 18 and 23 years of age and who had signed an informed consent form. One biopsy was provided by the 'Hospice civils de Lyon' (DC-2008-162 delivered to the Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon), while the other two cell samples were generated by PromoCell (Lot numbers #401Z028.2 and #428Z014.2). The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (1g/L) (Thermo Fisher Scientific, #31885049) supplemented with 1% ZellShield (Minerva Biolabs, #130050) and 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and the cells were used between the fourth and the eighth passage. To study the ECM, 50 μ g/mL of ascorbic acid was added once the cells had reached confluency.

Flow cytometry

Flasks (75 cm²) were seeded with 3×10^5 cells, and after 3 days, 0.6 mM glyoxal (Sigma-Aldrich, #50649) was added to the proliferating fibroblasts for 24 hours. After trypsinization and centrifugation, the cells were resuspended in 500 μ L (2×10^6 cells per mL) of binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, and 0.75 mM MgCl₂). A working solution of 2.5 mM CaCl₂, 5 μ L Annexin V-APC (BD Biosciences #550474), and 2.5 μ g/mL propidium iodide (Roche # 11348639001) was added to 100 μ L of cell suspension and incubated for 10 min on ice in the dark. The stained cells were subjected to flow cytometry using a BD Biosciences FACS Melody, using a minimum of 30 000 cells for each sample, and the flow cytometry signal was analyzed with Flow Jo software. Annexin V⁻/PI⁻ cells were considered to be non-apoptotic and viable, Annexin V⁺/PI⁻ cells were considered to be in late apoptosis, and Annexin V⁺/PI⁺ cells were considered to be in early apoptosis.

Proliferation test

Fibroblasts (9.5×10^3) were seeded into 6-well sterile plates. After 24 hours, 0.6 mM glyoxal was added for a further 24 hours and the cells were counted using a Malassez counting chamber over the course of 5 days in the presence of trypan blue.

Time-lapse monolayer wounding healing assay

Fibroblasts (5.7×10^4) were seeded into 24-well sterile plates and cultured until confluent. Monolayer wound healing assays were performed by scraping the confluent cells, as previously described by Viglio *et al*, with a 20 μ L pipette tip.²² DMEM low glucose with 1% FCS was added to reduce cell proliferation, with or without 0.6 mM glyoxal. Pictures of the monolayer wounds were taken every 10 min for 48 hours using an inverted microscope at 37°C and 5% CO₂. Image J software was used to measure the area not covered by cells (the non-healed area) every 6 hours from 0 hours to 48 hours. The percentage

monolayer wound healing was quantified by calculating: $\frac{\text{Area at time 0} - \text{Area at time x}}{\text{Area at time 0}} \times 100$.

Atomic force microscopy

Fibroblasts (16×10^4) were seeded into 35 mm Petri dishes. After 1 day, ascorbic acid (50 µg/mL) was added for another 4 days in order to produce collagen fibers, and 0.6 mM glyoxal was then added for a further 24 hours. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. The subsequent measurements and analyses were carried out by BioMeca SAS (Lyon, France). A Bioscope Resolve device (Bruker) in PeakForce QNM (Quantitative Nanomechanical Mapping) mode was used for the atomic force microscopy (AFM), with a probe that had a stiffness constant of 0.35 N/m and a radius of curvature <10 nm. The force measurements were performed in 1x Phosphate-Buffered Saline (PBS). Acquisition of the force volume of 10 µm × 10 µm was performed on the collagen at the edge of the fibroblasts. Each force volume included 4096 measurement points. Each measurement point corresponded to an indentation force curve, from which the elastic modulus (E_a) was then extracted. Quantification of the elastic modulus from the raw force curves was performed using BioMeca Analysis processing software.

Extracellular matrix and supernatant protein extraction for determination of collagen I expression

Fibroblasts (1.68×10^6) were seeded and cultured in 100 mm Petri dishes until confluent and then treated with 50 µg/mL ascorbic acid, with or without 0.6 mM glyoxal. Six days later, the cells were washed with PBS and FCS-free medium was added. The medium was collected 2 days later.

The proteins in the medium were precipitated with 0.02% Triton X-100 and 35% trichloroacetic acid and incubated for 20 min on ice. The samples were centrifuged at 19000× g for 20 min at 4°C, and the supernatants were removed. The pellets were washed with cold absolute ethanol. After centrifugation at 19000× g for 10 min at 4°C, the pellets were washed with cold acetone. Finally, after another centrifugation at 19000× g for 10 min at 4°C, the pellets were resuspended in Radio-immunoprecipitation Assay (RIPA) buffer containing a protease inhibitor cocktail.

In order to extract proteins from the cells and the ECM, extraction buffer (0.5 M Na_2HPO_4 pH 7.7, 8 M Urea, 10% NP-40, protease and phosphatase inhibitors, and 0.2 M EDTA) was then added to the Petri dishes for 2 hours at 4°C. The proteins were diluted fourfold in 0.5 M Na_2HPO_4 , 0.2 M EDTA containing protease and phosphatase inhibitors. After centrifugation at 20000× g for 5 min at 4°C, the supernatants were removed and the proteins precipitated with 10% trichloroacetic acid. The pellets were washed with cold acetone after centrifugation at 10000× g for 10 min at 4°C and then resuspended in RIPA buffer (Sigma #R0278) containing a protease inhibitor cocktail (Merck #5056489001).

Intracellular protein extraction for determination of AMPK expression

Fibroblasts (5.6×10^5) were seeded into 100 mm Petri dishes and after 24 hours, 0.6 mM glyoxal was added for a further 24 hours. The cells were lysed with Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) buffer (Thermo Fisher Scientific, #78510) containing a proteases inhibitor cocktail (Merck, #5056489001) and phosphatase inhibitors (5 mM NaF, 10 mM β-glycerol phosphate, and 1 mM Na_3VO_4) for 30 min at 4°C. After centrifugation at 14000× g, the supernatants were collected.

Western blotting

The total protein concentration was determined using a Pierce BCA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, #23225) according to the manufacturer's recommendations. The absorbance at 560 nm was measured. The proteins were denatured for 5 min at 95°C in Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% bromophenol blue, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 50 mM 1,4-dithiothreitol (DTT)), separated by polyacrylamide gel electrophoresis according to the protein size in 1x tris-glycine SDS buffer. The proteins were then electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, #IPVH00010) in TG-20% ethanol for between 1h30 and 3h00 at 220 mA at 4°C. The PVDF membranes were then blocked for 1 hour with 1x tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat milk or bovine serum albumin (BSA) depending on the antibodies to be used. The primary antibodies were diluted in 1x TBS containing 0.1% Tween and nonfat milk (2%) or BSA (5%) and incubated overnight at 4°C: rabbit polyclonal anti-type I collagen (Novotec, #20111, 1:1000), rabbit polyclonal anti-carboxymethyl-lysine (Abcam, #ab27684, 1:500), rabbit polyclonal anti-AMPK (cell signaling #2532, 1:1000), rabbit monoclonal anti-P-AMPK (Thr172) (cell signaling #2535, 1:1000), mouse monoclonal anti-actin (Merck, #6A2910, 1:5000). The membranes were incubated for 1 hour at room temperature with goat anti-rabbit HRP conjugate (BioRad #1706515) or goat anti-mouse HRP conjugate (BioRad #1706516) diluted 1:5000 in 1x TBS, 0.1% Tween 20. The membranes were then incubated for 5 min with ECL reagent (Thermo Fisher Scientific, #34580), and the antigens detected by chemiluminescence. The signal was recorded using a Fusion Fx system. Protein signals were evaluated using GelAnalyzer software.

Indirect immunofluorescence staining

Fibroblasts (3.8×10^4) were seeded onto 12 mm coverslips. After 24 hours, 0.6 mM glyoxal, 1 mM AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) (Sigma #A9978), or both, were added for a further 24 hours and the cells were then fixed with 2% formaldehyde for 20 min. BODIPY 493/503 (Thermo Fisher Scientific, #D3922) and anti-perilipin-2 staining (Santa Cruz Biotechnology, #sc-377429) were performed

according to the protocol of Listenberger *et al.*²³ The coverslips were then incubated for 1 hour at room temperature with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:1000) (Thermo Fisher Scientific, #A11034). The nuclei were labeled with 2 µg/mL 4',6-diaminido-2-phenylindole (DAPI) and the coverslips were then mounted with PermaFluor (Thermo Fisher Scientific, #TA-030-FM). Images were acquired with a Nikon ECLIPSE Ti-E microscope and NIS-Element software.

Transmission electron microscopy

Fibroblasts (2.7×10^6) were seeded into 35 mm Petri dishes and cultured until confluent, followed by treatment with 50 µg/mL ascorbic acid, with or without 0.6 mM glyoxal, for a further 8 days. The cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.3 for 1 hour at 37°C. The cells were then rinsed three times with 0.2 M sodium cacodylate buffer pH 7.3 and stored at 4°C. All of the samples were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 hour at room temperature and embedded in epoxy resin (50% epon A/50% epon B). Ultrathin sections (80 nm) were contrasted with 7% uranyl acetate and lead citrate and examined using a Philips CM 120 electron microscope (Centre Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France).

Seahorse extracellular flux analysis of mitochondrial respiration

Cells (4×10^4) were seeded on a Seahorse XFe24 microplate (Agilent, #100777-004) and after 24 hours 0.6 mM glyoxal was added for a further 24 hours. A Seahorse XFe24 Sensor Cartridge (Agilent, #102340-100) was incubated with XF calibrant (Agilent, #103059-000) solution overnight at 37°C in a non-CO₂ humidified incubator. Seahorse XF DMEM assay medium pH 7.4 (Agilent, #103575-100) was complemented the day of the experiment with 10 mM glucose (Agilent, #103577-100), 1 mM pyruvate (Agilent, #103578-100), and 2 mM L-glutamine (Agilent, #103579-100). The cells were then washed with assay medium and placed for 1 hour in a non-CO₂ humidified incubator. Just prior to the assays, the cells were washed again. The assays were performed with an Agilent Seahorse XFe24 analyzer with controller after calibration of the cartridge. Oligomycin (1.5 µM), Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) (3 µM), and rotenone/antimycin A (1 µM) were then added sequentially with three cycles of measurement (mix 3 min, wait 2 min, and measure 3 min). Seahorse Wave software was used to analyze the Seahorse measurements.

Statistical analysis

The results are expressed as means ± SD. The statistical tests were performed using GraphPad Prism software. Mann-Whitney or *t*-tests were used to compare the means of two groups. Multiple *t*-tests were used to compare two groups independently of other conditions. One-way

analysis of variance (ANOVA) was used to compare different groups between each other. Two-way ANOVA with multiple comparisons was used for the intergroup and intragroup comparisons at different time points. Significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

Glyoxal treatment resulted in CML production but no changes in metabolism or viability

We first of all used Western blotting to confirm the production of CML by fibroblasts after 24 hours of treatment with glyoxal (figure 1A). Flow cytometry assessment of apoptosis was used to verify whether glyoxal exposure induced cell death after a 24 hours of treatment. More than 90% of the cells were negative for annexin V and propidium iodide staining (figure 1B), indicating that glyoxal did not induce a preapoptotic phenotype. The innovative Seahorse technology allowed real-time analysis of cell function by quantification of the oxygen consumption rate. We found that glyoxal exposure did not alter the mitochondrial respiration rate, as the cells were metabolically active after 24 hours of glyoxal treatment (figure 1C). These results showed that 0.6 mM glyoxal induced CML production without affecting the viability or the mitochondrial respiration of the fibroblasts.

Glyoxal treatment impaired fibroblast proliferation and migration

Next, we examined the impact of glyoxal exposure on cell behavior and particularly on cell proliferation and migration. The proliferation rate of the fibroblasts treated with glyoxal started to decrease at day 2, and it was significantly different from the fourth day until day 5 (figure 2A). We also investigated the migration of the fibroblasts in the presence and absence of glyoxal using an *in vitro* monolayer wounding healing assay (figure 2B). Compared with the rapid wound healing in the controls, the treated cells required more than 2 days to close the wound (figure 2B,C). The percentage wound closure was significantly reduced from 18 hours up to 48 hours for the cells treated with glyoxal compared with the control cells, and it reached a plateau at 30 hours (figure 2C). In an effort to shed further light on the impaired fibroblast migration in patients with diabetes, we used AFM to analyze the mechanical forces exerted on neo-collagen by cells exposed to glyoxal for 24 hours. To estimate the tensile strength of the fibroblasts, we measured the elastic modulus of the collagen at the edge of cells (figure 2D). This elastic modulus is proportional to the deformation of the collagen network, which stretches in response to the traction exerted by the fibroblasts. We demonstrated that the tensile strength was significantly increased in the presence of glyoxal, going from 500 kPa for the control to approximately 1200 kPa for the glycated cells (figure 2E). An increase in cell contraction was also noted by measurement of the cell area in the presence of glyoxal (online supplemental figure S1).

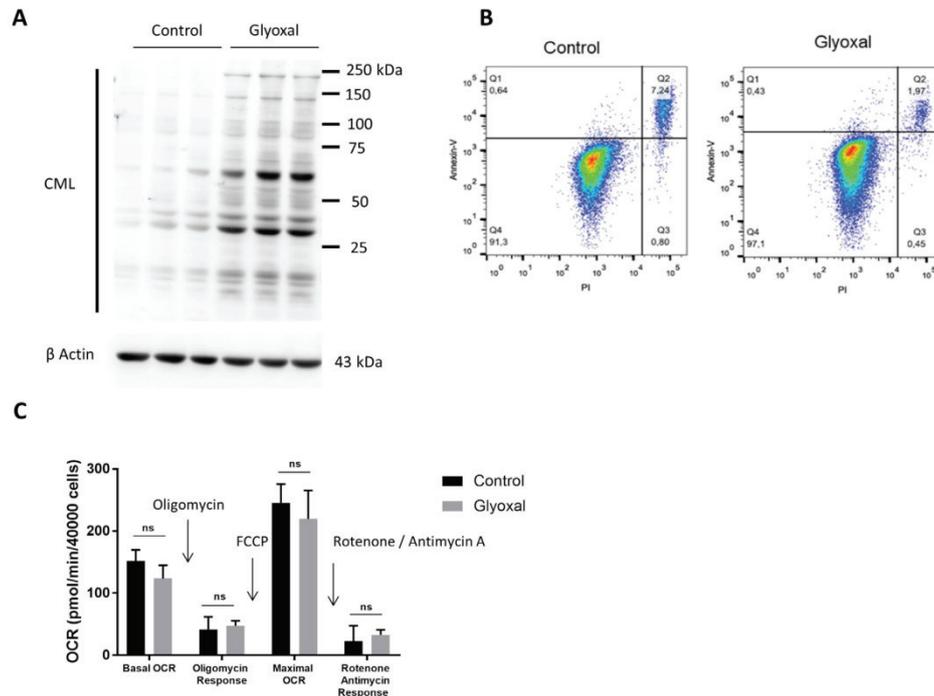


Figure 1 Glyoxal-induced CML production without induction of apoptosis or an effect on mitochondrial respiration. Fibroblasts were treated with or without 0.6 mM glyoxal for 24 hours. Control: untreated cells; glyoxal: 0.6 mM. (A) Western blot analysis of CML and β actin. The assays were performed on fibroblasts from three different donors. (B) Annexin V-APC and PI flow cytometry analysis of the fibroblasts. (C) Oxygen consumption rate measurement using Seahorse technology. Quantification of cell reactivity to drugs. Oligomycin (1.5 μ M), FCCP (3 μ M), and rotenone/antimycin A (1 μ M) were added sequentially. The average of three measurements after drug injection is represented for each treatment. Two-way ANOVA of the control vs glyoxal treatment is indicated, ns=non-significant. The data represent the means \pm SD. ANOVA, analysis of variance; CML, N ϵ -(carboxymethyl)lysine; PI, propidium iodide.

Taken together, these mechanical parameters demonstrate that the glyoxal-treated fibroblasts adhered more strongly to the ECM than the untreated cells.

Glyoxal treatment did not influence type I collagen secretion, but it did impair collagen I cleavage and maturation and it prevented deposition of extracellular matrix components

To verify whether the dermal fibroblasts were able to produce and secrete ECM components, we used Western blotting to evaluate the amount of type I collagen in the cell supernatants in the presence and absence of glyoxal (figure 3A). There appeared to be no difference between the treated and the untreated cells in terms of the amount of pro-collagen I, thus indicating that the glyoxal treatment did not affect the secretion of type I collagen (figure 3B). Nonetheless, the level of cleaved and matured type I collagen was reduced by the glyoxal treatment (figure 3B). Extraction of the ECM proteins, which yields the deposited forms, revealed the presence of pro-collagen I, mature collagen I, intermediate forms, and cross-linked forms in the controls (figure 3C). Following glyoxal treatment, we detected only a small amount of mature collagen I, but no cross-linked forms

(figure 3D), thus indicating that the cells were unable to produce normal collagen under the glycating conditions.

Transmission electron microscopy allowed us to visualize the organization of the collagen fibers in the ECM. The untreated cells were able to produce numerous spatially organized collagen fibers with characteristic striations. In contrast, the glyoxal treatment resulted in no deposition of collagen fibers in the extracellular environment (figure 3E). Altogether, these results demonstrated that the glyoxal treatment did not affect collagen I secretion but it did appear to block its cleavage, maturation, and/or deposition.

Since the accumulation of lipid vesicles is implicated in the cellular and functional alteration of non-fat tissues in patients with diabetes, we examined their presence in dermal fibroblasts in response to glyoxal treatment. We found that there were empty white vesicles, characteristic of LDs, in the cytosol (yellow arrow, figure 3E). Staining with BODIPY 493/503 allowed us to determine that these white vesicles were indeed LDs (online supplemental figure S2A). On average, the diameter of the LDs was 660 nm in presence of glyoxal and \pm 480 nm in its absence (online supplemental figure S2B). LDs were observed

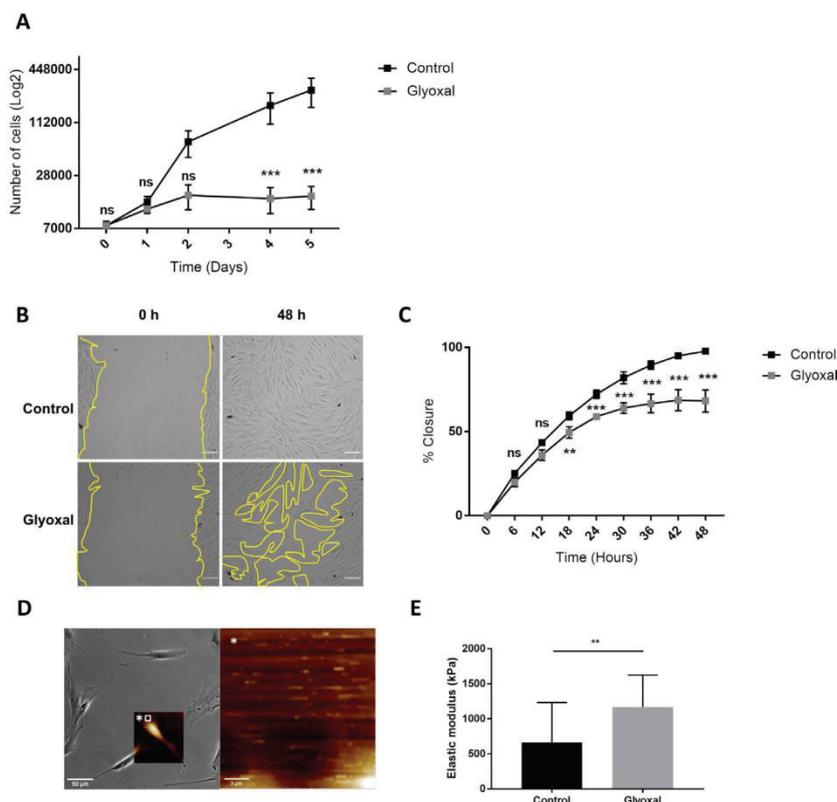


Figure 2 Glyoxal reduced proliferation and migration but enhanced cell contraction. The assays were carried out on fibroblasts from three different donors. Control: untreated cells; glyoxal: 0.6 mM. (A) Proliferation of the fibroblasts was estimated by daily counting of the cells for 5 days. (B) Images of the monolayer wounding at 0 hour (immediately after the monolayer wound was made) and healing 48 hours later in the presence or absence of glyoxal. The yellow lines represent an example of the measured area (scale bar=100 μ m). (C) Migration of the fibroblasts, quantified as the percentage wound closure. The unclosed areas were quantified every 6 hours for 48 hours in six different wells for each donor. (D) Example of the location of the elastic modulus measured by AFM (white square). The white star represents a magnification of the white square. (E) The elastic modulus (kPa) of the collagen on the edge of the fibroblasts represents the tensile strength exerted by the cells as measured by AFM in the absence and presence of glyoxal (five fibroblasts in three different wells from one donor). Two-way ANOVA of the control vs glyoxal treatment is indicated in (A,B). A Mann-Whitney test of the control vs glyoxal treatment is indicated in (C). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=non-significant. The data represent means \pm SD. AFM, atomic force microscopy; ANOVA, analysis of variance.

in both conditions. Nevertheless, a strong accumulation of these vesicles was noted in the cytosol as a result of glyoxal treatment (figure 3E).

Glyoxal treatment led to accumulation of lipid vesicles and PLIN2 independently of AMPK phosphorylation

The expression of AMPK α and its phosphorylation on Thr¹⁷² can be used as a sensor of cellular energy and lipid metabolism. By Western blotting, we found that 24 hours of glyoxal treatment reduced the P-AMPK/AMPK α ratio (figure 4A).

To determine whether exposure to glyoxal could rapidly lead to enhanced LD formation, we used BODIPY staining to determine the number of LDs. Without glyoxal treatment, there were very few LDs present in the cytosol of cells and we found that these LDs colocalized with PLIN2 (figure 4B). It appeared that 24 hours of

glyoxal treatment was enough to induce extensive accumulation of LDs. This was associated with an increase in PLIN2, which appeared to fully colocalize with the LDs (figure 4B). On average, 17 vesicles per fibroblast were present without any treatment but the average number of LDs per cell reached 36 after 24 hours of glyoxal treatment (figure 4C). To verify whether the LD accumulation was dependent on AMPK α , we used AICAR to induce its phosphorylation. AICAR was able to increase the level of P-AMPK in the presence or absence of glyoxal (online supplemental figure S3). Similar to the untreated cells, there was an average of 23 LDs per cell after 24 hours of AICAR treatment (figure 4B,C). On the other hand, following glyoxal treatment, there was an average of 39 LDs per cell. Thus, AICAR did not appear to block the accumulation of LDs induced by glyoxal treatment

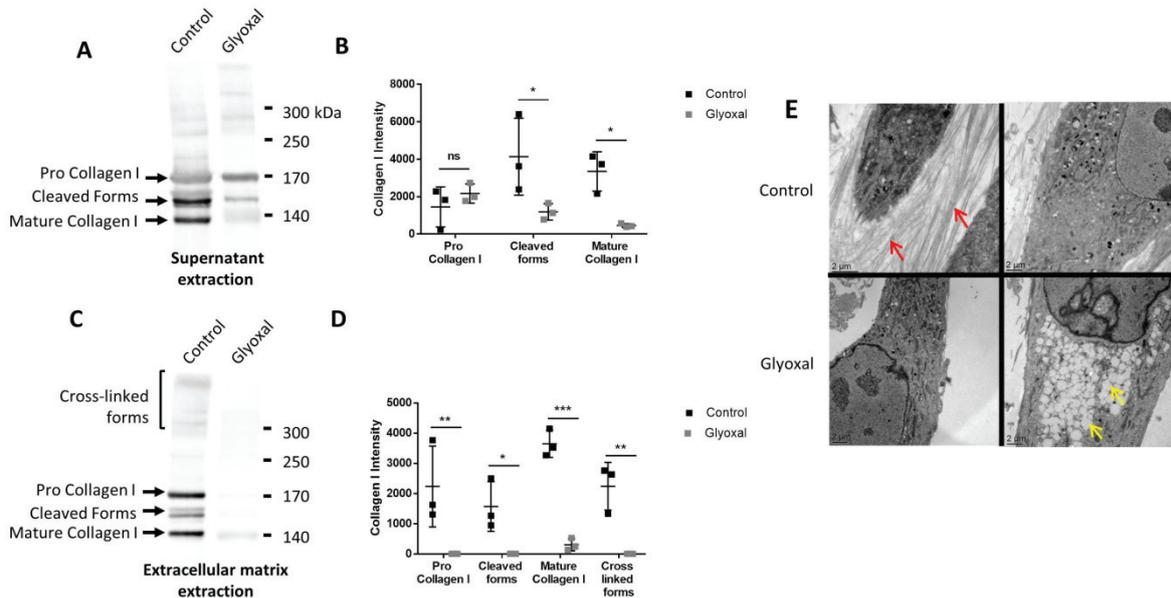


Figure 3 Type I collagen secretion and extracellular matrix deposition are reduced in the presence of glyoxal. The assays were performed on fibroblasts from three different donors. Control: untreated cells; glyoxal: 0.6 mM. (A) Representative Western blot analysis of secreted type I collagen. For each condition, 10 μ g of protein was loaded. (B) Quantification of secreted type I collagen. (C) Representative Western blot analysis of type I collagen deposited in the extracellular matrix. (D) Quantification of collagen I deposited in the extracellular matrix. (E) Analysis of the fibroblast ultrastructure and extracellular matrix by transmission electronic microscopy. The red arrows indicate collagen fibers. The yellow arrows indicate lipid droplets. The scale bar is indicated in each image. Two-way ANOVA of the control vs glyoxal treatment is indicated as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=non-significant. The data represent means \pm SD. ANOVA, analysis of variance.

(figure 4B,C). In the same way, PLIN2 was associated with this accumulation (figure 4B). All of these results show that glyoxal decreased AMPK phosphorylation, although this was not responsible for the lipid accumulation in cytosol of the fibroblasts.

DISCUSSION

The present study sheds light on the effect of glycation on dermal fibroblast behavior in wound healing context. Glyoxal exposure reduced fibroblast proliferation and migration, altered the mechanosturctural organization of cells, and blocked collagen deposition. These results are evidence of the pronounced effect of glycation on wound healing and skin quality (figure 5). For the first time, we show that the accumulation of LDs in dermal fibroblasts is independent of AMPK phosphorylation.

Glyoxal is one of the highly reactive dicarbonyl species formed during glycation. Most studies use methylglyoxal or 3-DG to analyze the in vitro formation of AGEs.^{24 25} But glyoxal is known to produce CML,⁶ which is found in large quantities in the urine and serum of patients with diabetes.^{3 26 27} As CML is a good biomarker of diabetes, glyoxal is one of the best glycating agents for in vitro studies of glycation. We found that 0.6 mM of glyoxal induced CML production after 24 hours of treatment and that it did not induce cell death. The level of glyoxal and

methylglyoxal increases in mitochondria under hyperglycemic conditions, affecting mitochondrial respiration alteration.²⁸⁻³⁰ Seahorse technology allowed us to undertake real-time analysis of cell function, and we demonstrated that the fibroblasts were metabolically active after 24 hours of glyoxal treatment. Exposure to glyoxal did not appear to result in altered mitochondrial respiration, as occurs in diabetics.²⁸⁻³⁰ It has been shown that glyoxal levels of less than 1 mM do not alter fibroblast morphology and they do not induce apoptosis,³¹ which is in accordance with our results.

Chronic ulcers in patients with diabetes can be due to defective fibroblast functions, such as proliferation and migration as a result of the accumulation of AGEs, and we have shown that glyoxal altered both of these behaviors. Our study examined the characteristics of fibroblasts from diabetic feet,³² and our results are concordant with those of Yoshihara *et al* who reported a decrease in proliferation between 3 and 5 days in culture when fibroblasts were treated with similar glycated products.³³ Furthermore, using AFM, we showed that the tensile strength of the fibroblasts was greatly increased in the presence of glyoxal, thus indicating a modification of the cell mechanical properties. The fibroblasts appeared to adhere more to the ECM due to glycation, which may have reduced their ability to migrate during wound

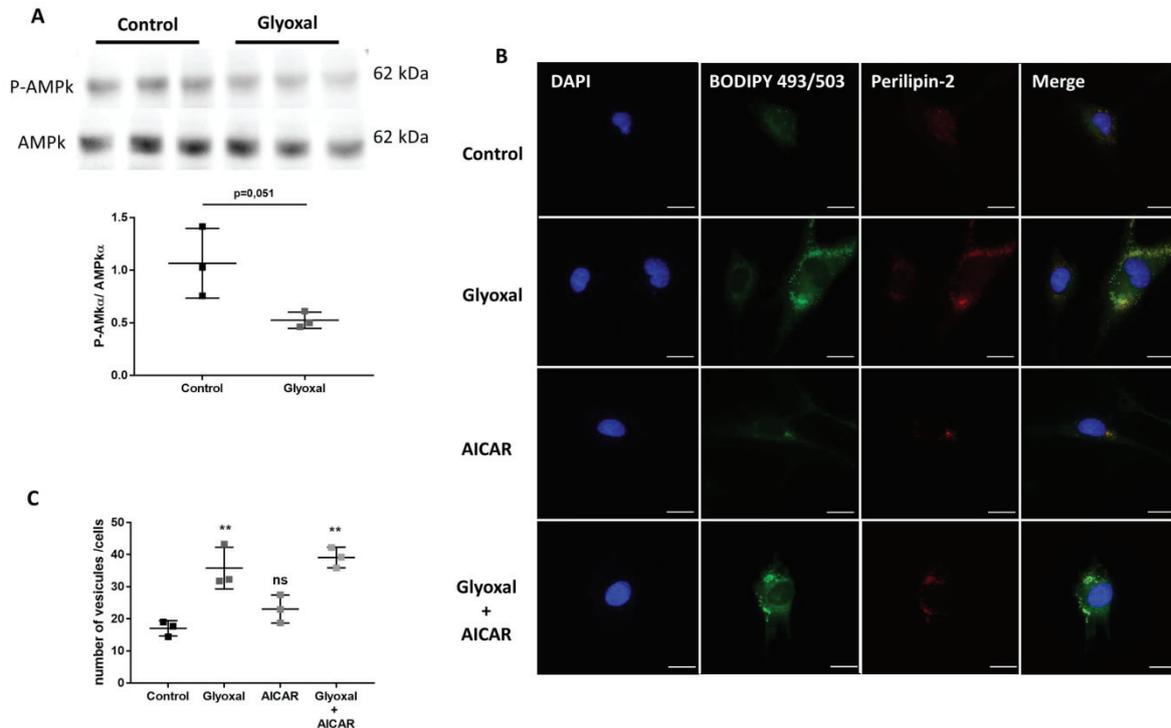


Figure 4 Glyoxal treatment leads to lipid vesicle accumulation independently of AMPK. The assays were performed on fibroblasts from three different donors. Control: untreated cells; glyoxal: 0.6 mM; AICAR: 1 mM; glyoxal+AICAR: 0.6 mM glyoxal+1 mM AICAR. (A) Western blot analysis of AMPK α and P-AMPK α and measurement of the P-AMPK α /AMPK α ratio. (B) BODIPY 493/503 fluorescence in green, anti-PLIN2 staining in red, and nuclear DAPI staining in blue (scale bare=20 μ m). (C) The mean number of lipid vesicles per cell for each fibroblast donor. The LDs were counted randomly (≥ 50 cells were counted per condition). A *t*-test is indicated in (A). One-way ANOVA is indicated in (C). ***p*<0.01; ns=non-significant. The data represent means \pm SD. AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamideribonucleotide; ANOVA, analysis of variance; DAPI, 4',6-diaminido-2-phenylindole; LD, lipid droplet.

healing. The literature indicates that fibroblasts cultured on 3-DG-treated collagen were less effective at wound closure and failed to extend filopodia during migration.²⁵ Moreover, the expression of focal adhesion kinase, which is a protein involved in cell migration, was downregulated in fibroblasts cultured on glycated collagen, thus supporting our results.²⁵

The ECM plays an essential role in efficient wound healing and also in tissue remodeling. Collagens are the most abundant proteins in the dermis and give rise to the resistance capacities of tissues. In vitro, fibroblasts start to produce ECM when they reach confluency, and the formation of ECM readily be observed 8 days postconfluency. We hence decided to treat confluent fibroblasts with glyoxal to analyze the consequences on ECM production, maturation, and organization, as well as the effects of the presence of ascorbic acid, which allows proline hydroxylation and collagen triple helix formation. We found that under these conditions, glyoxal did not influence collagen I secretion but it appeared to reduce its maturation. Glyoxal also appeared to greatly reduce collagen deposition because no collagen fibers were present in the

extracellular environment, unlike in the untreated cells. The data in the literature regarding collagen modulation according to the cell type and the induction of glycation^{24 34 35} are not consistent. Serban *et al*³⁴ demonstrated upregulation of type I and type III collagen at the protein and gene levels after exposure of fibroblasts to AGEs-BSA. By contrast, another study found inhibition of human vaginal fibroblast proliferation in the presence of AGEs associated with a decrease in the collagen I protein level,³⁵ which is in keeping with our results.

Transmission electronic microscopy allowed us to determine that there was pronounced accumulation of LDs in the cytosol of fibroblasts treated with glyoxal compared with control cells. Cellular lipid homeostasis is driven by LDs found in all types of mammalian cells.³⁶ LDs are comprised of a monolayer of phospholipids that stores triacylglycerol and sterol ester. These vesicles neutralize the toxic effects of free fatty acids by converting them into neutral lipids. Fibroblasts can accumulate LDs that are 0.1–5 μ m in size, and primary adipocyte LDs can reach more than 100 μ m in size.³⁷ Glyoxal affect lipid metabolism by inducing a pronounced and

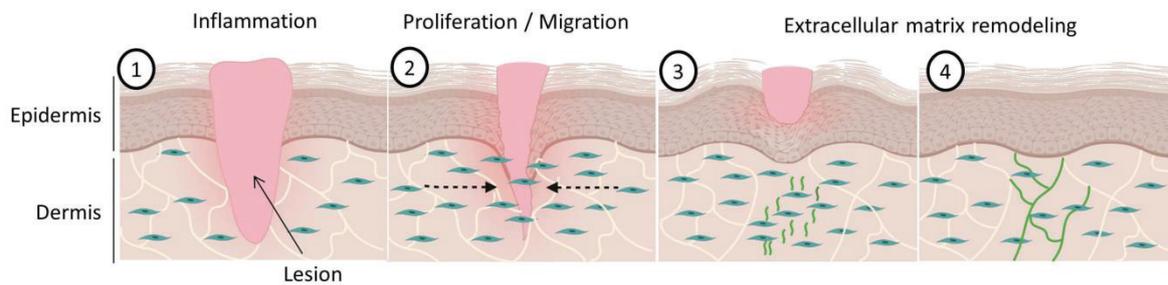
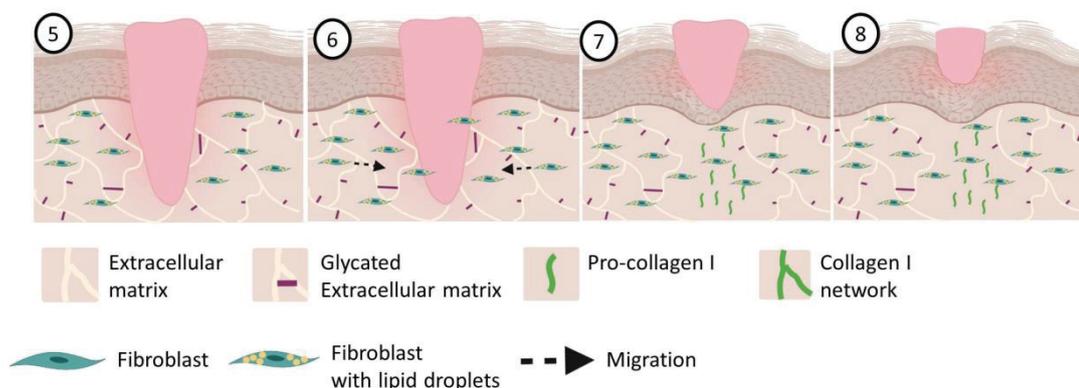
Wound healing in normal skin :Wound healing in glycated skin after glyoxal exposure :

Figure 5 Wound healing of normal and glycated skin. During dermal wound healing following a lesion (1), fibroblasts multiply and migrate towards the center of the wound to participate in the wound closure during the proliferation phase (2). Thereafter, during the remodeling phase, the fibroblasts produce pro-collagen I (3), which matures and is deposited as a cross-linked form in the dermis to restore the skin (4). With hyperglycemia and increased glycation in diabetics, the dermal extracellular matrix becomes highly glycated (5). Our model shows that exposure to glyoxal leads to the accumulation of lipid droplets in fibroblasts, with impaired proliferative and migratory capacities (6). During the remodeling phase, pro-collagen I is produced correctly (7) but it does not mature properly and it cannot induce the formation of new collagen fibers (8).

rapid LDs accumulation in 24 hours. We demonstrated that the accumulation of LDs by glyoxal treatment was associated with an increase in PLIN2. The expression of GFP-PLIN2 enhances LD levels in fibroblasts independently of adipocytes and lipogenic specific genes.³⁸ PLIN2-null mice counteract insulin resistance and diet-induced obesity by increasing physical activity and by modulating food intake.^{20, 21} Moreover, long-term treatment of 3T3-L1 fibroblasts with CML has been reported to result in extensive accumulation of LDs and to induce increased expression of miR-103 and miR-143, which are implicated in lipid accumulation.³⁹ Yuan *et al* found that Oil Red O staining was enhanced in HK-2 cells in the presence of CML.⁴⁰ All of these studies are fully concordant with our results. Our cellular model perfectly reproduces ectopic fat accumulation in cells from non-adipose tissue, which is a distinctive feature in metabolic damage such as diabetes.¹⁸

There have been limited studies to date regarding the link between the accumulation of LDs and impaired migration or proliferation. Mouse 3T3 fibroblasts have

been shown to contain more LDs when they proliferate compared with when they are quiescent,⁴¹ which is inconsistent with our results. But Cao *et al* showed that renal carcinoma cells exhibited enhanced migration and invasion on PLIN-2 knockdown.⁴² Moreover, in injured liver hepatic stellate cells, depletion of LDs led to a higher proliferative activity and they transformed into myofibroblast-like cells to repair the tissue.⁴³ Thus, PLIN2 appears to be a very good therapeutic target for enhancement of migratory and proliferative capacities.

Numerous studies have shown that AMPK activity is central to the formation and turnover of lipid vesicles. Our results indicate that lipid accumulation in dermal fibroblasts is independent of AMPK phosphorylation. Phosphorylation of AMPK has been shown to be required for the formation of LDs by oleic acid degradation following PLIN2 activation.⁴⁴ Chen *et al* showed that adipogenesis can be regulated through AMPK-dependent or independent mechanisms.⁴⁵ For the first time, we show that glycation can induce ectopic lipid accumulation by increasing

PLIN2 in dermal fibroblasts, independently of the AMPK pathway.

Glycation is one of the main factors involved in impaired wound healing in patients with diabetes. Taken together, our results highlight that glyoxal promotes a change in fibroblast phenotype in favor of lipogenic activity that could be involved in delaying wound healing. In the context of wound healing, our study shows that glycation by glyoxal could act at the different phases of wound healing of the dermis (figure 5). The proliferative and migratory capacities of fibroblasts that accumulate lipid vesicles are altered, which may slow down wound closure and participate in the establishment of chronic wounds. In the ECM remodeling phase, glycated fibroblasts would be able to produce pro-collagen I, but cannot then mature normally to induce the formation of a new collagen I network. These observations could to a certain extent explain the skin fragility observed in patients with diabetes.

In vitro, glyoxal treatment of fibroblasts could be an excellent cell model for studying skin complications related to diabetes and it could help with testing new therapeutic approaches to improve wound healing. It would be interesting to select therapeutic molecules that may enhance key properties of fibroblasts such as proliferation, migration, collagen production, and lipid metabolism.

Acknowledgements The flow cytometry experiments were performed with the help Remy Pépin at the LOEX (Research center of University Hospital Center of Québec—Laval University, Québec City, Canada). We thank Christophe Chamot at the PLATIM (SFR Biosciences, Gerland, Lyon, France) for his technical assistance with the time-lapse experiments. We are grateful to the BioMeca SAS (Lyon, France) and particularly to Julien Chlasta and Anna Catte-Drillat for performing the AFM experiments and for their excellent analysis and advice. The TEM experiments were performed by Christelle Fabrer-Boule at the CTµ (Centre Technologique des Microstructures, Villeurbanne, France). Last, we also thank Laurence Canaple at the Plateau de Recherche Expérimentale en Criblage In Vivo (SFR Biosciences, Lyon, France) for her excellent technical assistance.

Contributors DS-R, MB, SC, CB, and CG designed the research project. CG, CB, and SF performed the experiments. CG, CB, SF, MB, SC, and DS-R contributed to analysis and interpretation of the data. CG and CB wrote the paper, and DS-R, MB, SC, and SF edited the manuscript.

Funding Urgo Research Innovation and Development (URID, Chenôve, France) supported the study.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available on reasonable request. All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplemental information.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which

permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iD

Christelle Bonod <http://orcid.org/0000-0002-7180-2727>

REFERENCES

- Mishra SC, Chhatbar KC, Kashikar A, *et al*. Diabetic foot. *BMJ* 2017;359:j5064.
- Ott C, Jacobs K, Haucke E, *et al*. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014;2:411–29.
- Brings S, Fleming T, Freichel M, *et al*. Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention. *Int J Mol Sci* 2017;18. doi:10.3390/ijms18050984. [Epub ahead of print: 05 May 2017].
- Mera K, Takeo K, Izumi M, *et al*. Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin. *J Pharm Sci* 2010;99:1614–25.
- Kinoshita S, Mera K, Ichikawa H, *et al*. N^ω-(Carboxymethyl)arginine Is One of the Dominant Advanced Glycation End Products in Glycated Collagens and Mouse Tissues. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:1–14.
- Nevin C, McNeil L, Ahmed N, *et al*. Investigating the Glycating effects of glucose, glyoxal and methylglyoxal on human sperm. *Sci Rep* 2018;8:9002.
- Han Y, Randell E, Vasdev S, *et al*. Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with type 1 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2007;305:123–31.
- Kouidrat Y, Zaitouni A, Amad A, *et al*. Skin autofluorescence (a marker for advanced glycation end products) and erectile dysfunction in diabetes. *J Diabetes Complications* 2017;31:108–13.
- Paolillo FR, Mattos VS, de Oliveira AO, *et al*. Noninvasive assessments of skin glycated proteins by fluorescence and Raman techniques in diabetics and nondiabetics. *J Biophotonics* 2019;12:e201800162.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, *et al*. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;91:2463–9.
- Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2015;173:370–8.
- Löffek S, Schilling O, Franzke C-W. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011;38:191–208.
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835–70.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinze B, *et al*. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349–63.
- Nowotny K, Castro JP, Hugo M, *et al*. Oxidants produced by methylglyoxal-modified collagen trigger ER stress and apoptosis in skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2018;120:102–13.
- Loughlin DT, Artlett CM. Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. *PLoS One* 2010;5:e11093.
- Bulteau AL, Verbeke P, Petropoulos I, *et al*. Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *J Biol Chem* 2001;276:45662–8.
- Hong ES, Lim C, Choi HY, *et al*. Plasma fibroblast growth factor 21 levels increase with ectopic fat accumulation and its receptor levels are decreased in the visceral fat of patients with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2019;7:e000776.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:281–7.
- Varela GM, Antwi DA, Dhir R, *et al*. Inhibition of ADRP prevents diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G621–8.
- McManaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, *et al*. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res* 2013;54:1346–59.
- Viglio S, Zoppi N, Sangalli A, *et al*. Rescue of migratory defects of Ehlers-Danlos syndrome fibroblasts in vitro by type V collagen but not insulin-like binding protein-1. *J Invest Dermatol* 2008;128:1915–9.

- 23 Listenberger LL, Studer AM, Brown DA, *et al.* Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Curr Protoc Cell Biol* 2016;71:31–14.
- 24 Sassi-Gaha S, Loughlin DT, Kappler F, *et al.* Two dicarbonyl compounds, 3-deoxyglucosone and methylglyoxal, differentially modulate dermal fibroblasts. *Matrix Biol* 2010;29:127–34.
- 25 Loughlin DT, Artlett CM. 3-Deoxyglucosone-collagen alters human dermal fibroblast migration and adhesion: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *Wound Repair Regen* 2009;17:739–49.
- 26 Wautier MP, Massin P, Guillausseau PJ, *et al.* N(carboxymethyl)lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2003;29:44–52.
- 27 Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF. Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol* 2011;21:48–54.
- 28 Rosca MG, Monnier VM, Szweda LI, *et al.* Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F52–9.
- 29 Pun PBL, Logan A, Darley-Usmar V, *et al.* A mitochondria-targeted mass spectrometry probe to detect glyoxals: implications for diabetes. *Free Radic Biol Med* 2014;67:437–50.
- 30 Wang Y, An H, Liu T, *et al.* Metformin improves mitochondrial respiratory activity through activation of AMPK. *Cell Rep* 2019;29:e1515:1511–23.
- 31 Sejersen H, Rattan SIS. Glyoxal-induced premature senescence in human fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:518–23.
- 32 Liang L, Stone RC, Stojadinovic O, *et al.* Integrative analysis of miRNA and mRNA paired expression profiling of primary fibroblast derived from diabetic foot ulcers reveals multiple impaired cellular functions. *Wound Repair Regen* 2016;24:943–53.
- 33 Yoshihara K, Okumura T, Yoshida T, *et al.* Inhibitory effect of peptide-free forms of advanced glycation end products on the proliferation and extracellular matrix protein production of cultured cells. *J Health Sci* 2001;47:296–301.
- 34 Serban AI, Stanca L, Geicu OI, *et al.* RAGE and TGF- β 1 cross-talk regulate extracellular matrix turnover and cytokine synthesis in aged exposed fibroblast cells. *PLoS One* 2016;11:e0152376.
- 35 Chen Y-S, Wang X-J, Feng W, *et al.* Advanced glycation end products decrease collagen I levels in fibroblasts from the vaginal wall of patients with POP via the RAGE, MAPK and NF- κ B pathways. *Int J Mol Med* 2017;40:987–98.
- 36 Sztairyd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862:1221–32.
- 37 Fujimoto T, Parton RG. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3. doi:10.1101/cshperspect.a004838. [Epub ahead of print: 01 Mar 2011].
- 38 Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, *et al.* Adiponectin stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E775–83.
- 39 Holik A-K, Lieder B, Kretschy N, *et al.* N(ϵ)-Carboxymethyllysine Increases the Expression of miR-103/143 and Enhances Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells. *J Cell Biochem* 2016;117:2413–22.
- 40 Yuan Y, Sun H, Sun Z. Advanced glycation end products (AGEs) increase renal lipid accumulation: a pathogenic factor of diabetic nephropathy (dn). *Lipids Health Dis* 2017;16:126.
- 41 Diaz G, Batetta B, Sanna F, *et al.* Lipid droplet changes in proliferating and quiescent 3T3 fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2008;129:611–21.
- 42 Cao Q, Ruan H, Wang K, *et al.* Overexpression of PLIN2 is a prognostic marker and attenuates tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2018;53:137–47.
- 43 Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:3–15.
- 44 Kaushik S, Cuervo AM. Ampk-Dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy* 2016;12:432–8.
- 45 Chen SC, Brooks R, Houskeeper J, *et al.* Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 2017;440:57–68.

ONLINE SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental figure 1. Surface area of fibroblasts was decreased after glyoxal addition

Assay was made on 5 fibroblasts on 3 different wells from 1 donor. Measure of cellular area in μm^2 . Mann-Whitney test control versus glyoxal is indicated ** $p < 0.01$. Data represent the mean \pm SD.

Supplemental figure 2. Post confluent fibroblasts accumulated larger lipid vesicles

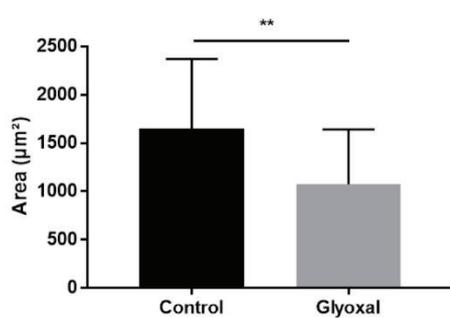
Assays were made on 8 days post confluence fibroblasts from three different donors. Control: untreated cells; Glyoxal: (0,6 mM). **A/** Immunofluorescence of BODIPY 493/503 in green, and DAPI for nucleus in blue (Scale bare, 20 μm). **B/** Quantification of lipid droplets diameter (nm). Mann-Whitney test control versus glyoxal is indicated *** $p < 0.001$. Data represent the mean \pm SD.

Supplemental figure 3. AICAR 1mM induced an important phosphorylation of AMPK

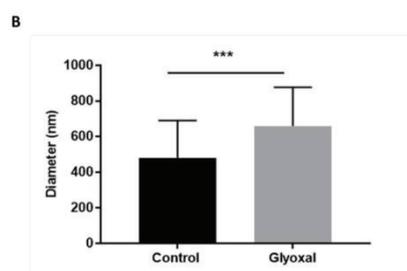
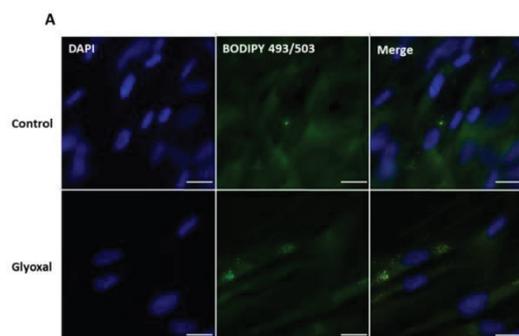
Assays were made on fibroblasts from three different donors. Control: untreated cells; Glyoxal: (0,6 mM); AICAR (1 mM); Glyoxal+AICAR: (0.6 mM glyoxal+1 mM AICAR). **A/** Western-blot analysis of AMP α and P-AMP α . **B/** Quantification of P-AMP α / AMP α ratio. Multiple t test is indicated ** $p < 0.01$; ns = non-significant. Data represent the mean \pm SD.

SUPPLEMENTAL FIGURES

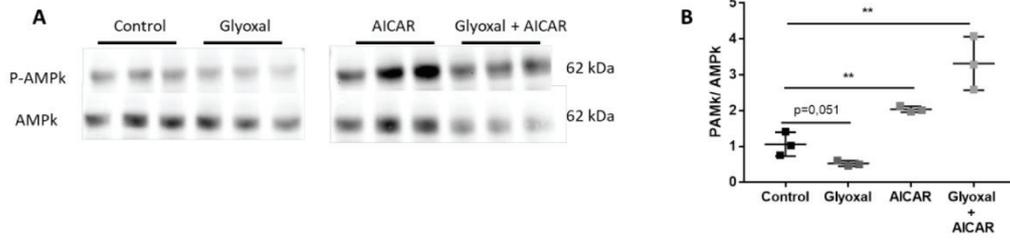
Supplementary figure 1.



Supplementary figure 2.



Supplemental figure 3.



En complément de cet article, nous avons effectué des expériences supplémentaires sur les fibroblastes en 2D, sur des modèles de peaux 3D mais également *in vivo* sur des souris diabétiques pour mieux comprendre le retard de cicatrisation chez les diabétiques. De plus, nous avons testé la metformine dans ces différents modèles et conditions puisqu'elle présente de nombreuses capacités pharmacologiques intéressantes.

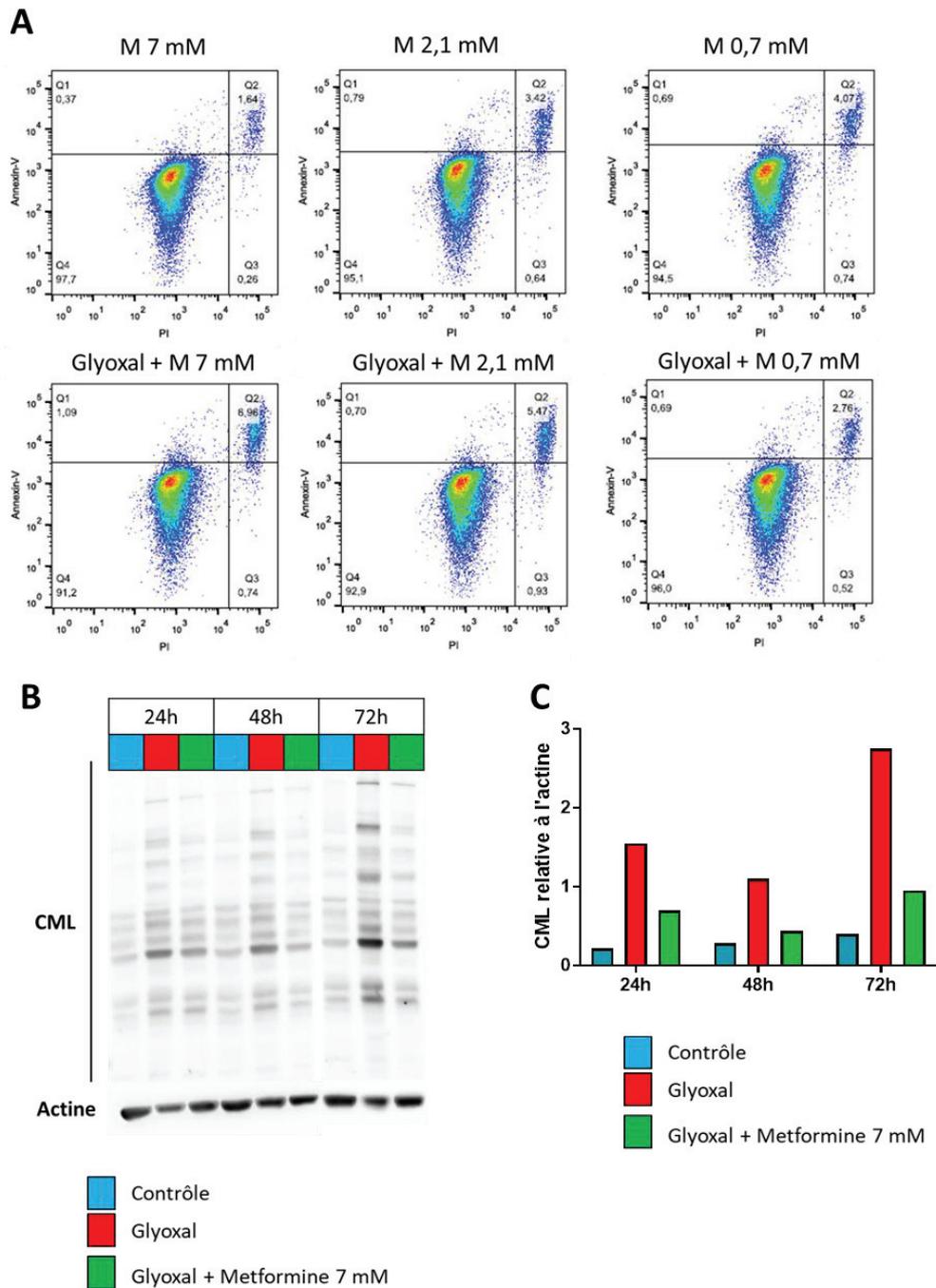


Figure 48. Effet de la metformine sur la viabilité des fibroblastes et la présence de CML
 Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,6 mM) et M : Metformine. Les expériences ont été réalisées sur des fibroblastes issus d'un seul donneur.
A/ Analyse en cytométrie en flux de l'annexin V-APC et de l'iodure de propidium des fibroblastes. **B/** Western blot dirigé contre les CMLs et l'actine. **C/** Quantification de la présence de CMLs par rapport à l'expression de l'actine.

1.2 La metformine diminue la production de CMLs dans les fibroblastes sans induire de toxicité

Des essais préliminaires à ma thèse avaient été effectués dans les laboratoires URGO et m'ont permis de sélectionner la dose de 0,6 mM comme étant correcte afin d'induire la glycation dans les fibroblastes. La toxicité du glyoxal à 0,6 mM pendant 24h a été testée grâce à la cytométrie en flux et au Seahorse (Guillon et al. 2021). Concernant la metformine, nous avons testé différentes concentrations et effectué une analyse en cytométrie en flux avec l'Annexin V et l'iodure de propidium (Figure 48. A). Il apparaît que la metformine n'induit pas l'entrée des fibroblastes en apoptose entre 7 et 0,7 mM, il en est de même en présence de Glyoxal 0,6 mM, en effet plus de 90 % des fibroblastes sont Annexin V et Iodure de propidium négatives (Figure 48. A). Nous avons donc choisi de tester la metformine à 7 mM pour les fibroblastes afin d'analyser ses capacités anti-glycation. Pour ce faire un Western-blot anti-CML a été réalisé (Figure 48. B). Comme démontré précédemment, le traitement au glyoxal induit une accumulation de CML après 24h de traitement et il apparaît ici qu'il en est de même après 48h et 72h de traitement au glyoxal (Figure 48. C). D'autre part, il semblerait que la metformine soit capable de diminuer cette surproduction de CML, à 24, 48 et 72h (Figure 48. C). Pour les prochaines expériences décrites ici, les fibroblastes seront donc traités avec 7 mM de metformine.

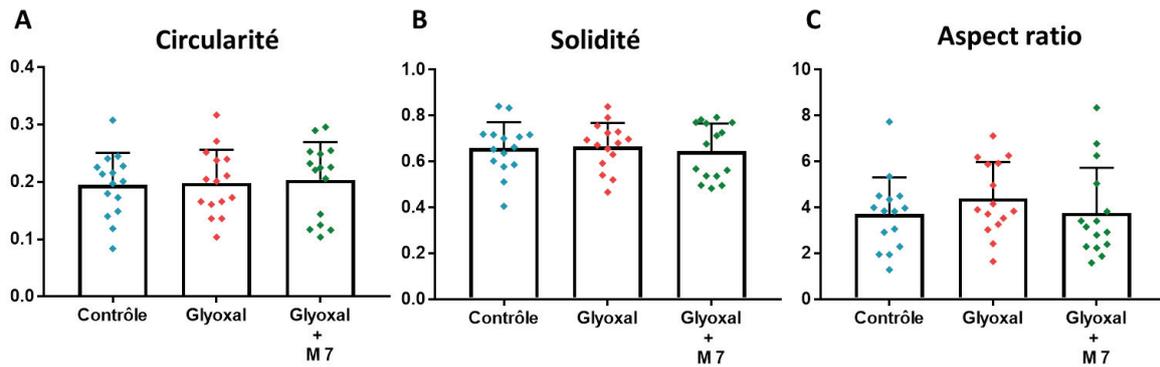


Figure 49. Morphologie des cellules en réponse au glyoxal et à la metformine

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,6 mM) et M7 : Metformine 7mM. L'expérience a été réalisée 3 fois et 5 cellules sont mesurées par conditions : n=15

A/ La circularité est calculée grâce au ratio : $4\pi \times \text{surface} / \text{périmètre}$. **B/** La solidité est le rapport : l'aire de la cellule / l'aire de l'enveloppe convexe. **C/** L'aspect ratio est calculé par le rapport : axe majeur / axe mineur. Des tests Mann-Whitney ont été réalisés pour comparer les groupes (Aucune différence significative n'a été révélée). Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

1.3 Le glyoxal et la metformine, ne modifient pas la morphologie cellulaire

Différents paramètres ont été mesurés pour estimer l'impact des traitements sur la morphologie des fibroblastes. Tout d'abord, nous avons mesuré la circularité qui, plus elle est élevée, plus la cellule est ronde et inversement, plus elle est faible, plus la forme de la cellule est aléatoire avec des prolongements cytoplasmiques. Il apparaît que le glyoxal n'induit pas de modifications de la circularité tout comme le traitement metformine avec glyoxal (Figure 49. A). D'autre part, la solidité estime si la cellule a une forme plus concave ou convexe, et nous avons montré que, dans notre cas, aucun traitement ne modifie ce paramètre (Figure 49. B). Enfin l'aspect ratio caractérise l'aspect plus ou moins allongé des cellules et de nouveau aucune différence n'est mise en évidence avec les traitements (Figure 49. C). D'une manière générale, nous pouvons dire que 24h de glyoxal avec ou sans metformine n'impacte pas la morphologie cellulaire.

1.4 La metformine semble contrecarrer les effets du glyoxal sur la force de traction exercée par les fibroblastes sur la matrice extracellulaire

Par la suite, dans les mêmes conditions, le module élastique de différentes régions cellulaires et extracellulaire a été mesuré par microscopie à force atomique (AFM), pour estimer leur rigidité, plus le module élastique est élevé plus la zone étudiée est rigide. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec la société BioMéca. Plus le module élastique est élevé plus la zone étudiée est rigide. Il est connu que l'accumulation d'AGEs ou la formation de cross-links entre des protéines peuvent être corrélées à une augmentation de la rigidité. La limite d'étude par l'AFM est l'espacement entre les cellules : les cellules ne doivent pas être confluentes mais relativement espacées. Pour rappel, les fibroblastes commencent à produire de la matrice extracellulaire une fois qu'ils sont à confluence et en présence de vitamine C. Ici, nous avons pallié à cette difficulté en ensemençant les fibroblastes à faible densité puis de la vitamine C a été ajoutée pendant 5 jours afin de forcer la production de collagène par les fibroblastes.

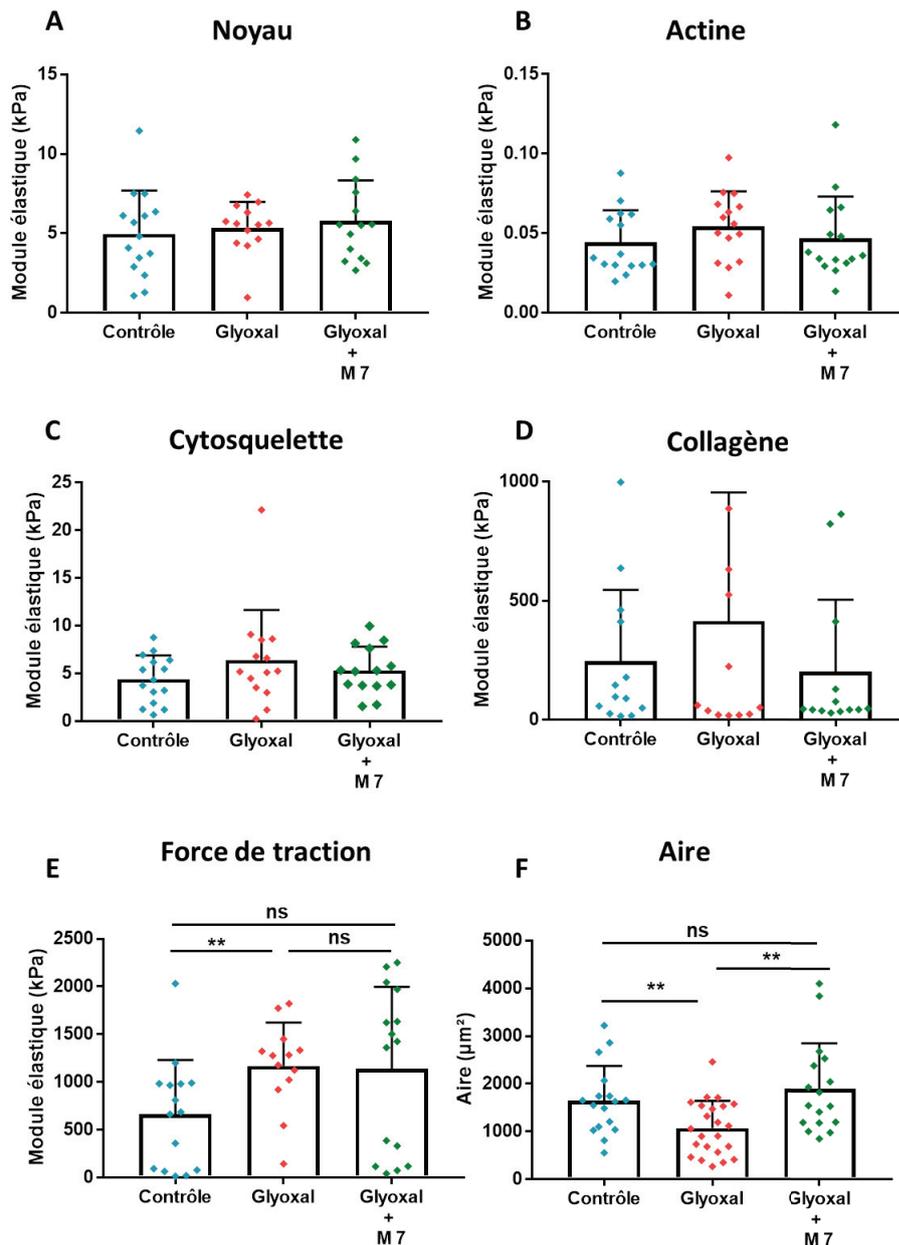


Figure 50. Analyse mécanique des fibroblastes

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,6 mM) et M7 : Metformine 7mM. L'expérience a été réalisée 3 fois et 5 cellules ont été mesurées par conditions : n=15. Les modules élastiques (kPa) du noyau (A/), de l'actine (B/), du cytosquelette (C/) et du collagène (D/) ont été mesurés. E/ La force de traction est estimée en mesurant le module élastique (kPa) du collagène au bord des cellules. F/ Mesure de l'aire des cellules en μm^2 .

Des tests Mann-Whitney ont été réalisés pour comparer les groupes (Aucune différence significative n'a été révélée). Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD).

Lors des dernières 24h, les différents traitements ont été ajoutés, puis la présence de collagène I a été vérifiée par immunofluorescence (non montré ici). Les caractéristiques mécaniques des cellules, du collagène néo-formé et la force exercée par les cellules sur la matrice ont été mesurées par la société Bioméca.

Lorsque l'on analyse le module élastique du noyau, de l'actine et du cytosquelette, aucune différence de rigidité n'est à souligner après 24h de traitement au glyoxal, il est en de même pour la condition glyoxal + metformine (Figure 50. A-C). Concernant le collagène, le glyoxal semble induire une légère augmentation de sa rigidité (± 415 kPa) non significative par rapport au contrôle (± 245 kPa). L'écart type étant très important, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour valider ou non cette observation (Figure 50. D). Nous pouvons également remarquer une tendance à la diminution de cette rigidité lorsque les cellules glyquées sont traitées à la metformine (± 202 kPa) (Figure 50. D). Pour aller plus loin et mieux comprendre le délai de migration des fibroblastes observés chez les patients diabétiques, nous avons estimé la force de traction exercée par les fibroblastes sur le collagène néoformé. Comme expliqué dans notre article (Guillon et al. 2021), le module élastique du collagène au niveau des bordures des fibroblastes a été mesuré. Ce module élastique est proportionnel à la déformation du collagène qui se tend en réponse à la traction et à la contraction exercée par les fibroblastes. Nous avons démontré que le glyoxal induisait une augmentation de la force de traction exercée par les fibroblastes après 24h de traitement par rapport aux cellules non traitées (± 1200 kPa versus 500 kPa) (Guillon et al. 2021) (Figure 50. E). Nous avons ensuite testé la capacité de la metformine à contrecarrer les effets du glyoxal. La force de traction est de ± 1100 kPa en présence de metformine et glyoxal, et ne présente aucune différence par rapport au groupe glyoxal seul (Figure 50. E). Cependant nous pouvons noter que les mesures pour le traitement metformine + glyoxal sont séparés en deux groupes distincts, ce qui tend à montrer que l'effet du glyoxal est en partie limité par la metformine (Figure 50. E). Ici encore, il faudrait augmenter le nombre de mesures. L'aire des cellules peut donner une information sur leur état de contraction, à savoir que plus les cellules sont petites, plus elles sont contractées et tirent sur la matrice extracellulaire. De façon cohérente avec les précédents résultats sur la force de traction, l'aire des cellules traitées avec le glyoxal est significativement plus petite que les cellules non traitées ($\pm 1000 \mu\text{m}^2$ versus $\pm 1700 \mu\text{m}^2$) (Figure 50. F). Cependant, les cellules traitées avec de la metformine en plus du glyoxal présentent une aire similaire aux cellules non traitées ($\pm 1800 \mu\text{m}^2$) (Figure 50. F). La metformine est capable de diminuer l'effet de contraction induit par le glyoxal et pourrait rejoindre la possible diminution de force de traction observée sur la Figure 50. E.

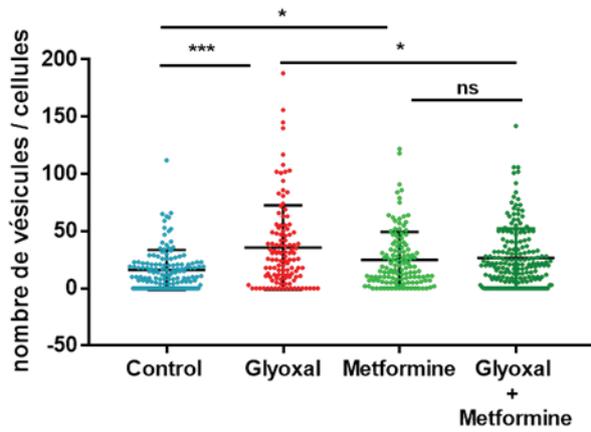


Figure 51. Metformine et vésicules lipidiques

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,6 mM) et Metformine (7mM). L'expérience a été réalisée sur 3 donneurs de fibroblastes différents et ≥ 50 cellules ont été comptées par condition. Une ANOVA 1 a été effectuée pour comparer les groupes : * $p < 0,05$; *** $p < 0.001$; ns = non-significatif. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD).

1.5 La metformine évite l'accumulation de vésicules lipidiques en présence de glyoxal

Avec la capacité d'activer la phosphorylation de l'AMPK mais également de capter le glyoxal, la metformine est une molécule prometteuse pour éviter l'accumulation des vésicules lipidiques. De la même manière que dans l'article, une immunofluorescence BODIPY 493/503 dirigée contre les vésicules lipidiques (LDs) (Figure 51) a été réalisée. Nous avons démontré que la metformine était capable de diminuer significativement le nombre de vésicules lipidiques en présence de glyoxal, (± 26) par rapport aux cellules traitées avec le glyoxal seul (± 36 vésicules) (Figure 51). Il est important de noter que la metformine seule (7 mM) induit une petite accumulation de vésicules avec ± 26 par rapport aux cellules non traitées avec ± 17 (Figure 51). Cependant il n'existe pas de différences entre les cellules traitées avec la metformine et le glyoxal ou la metformine seule avec ± 26 vésicules dans les 2 cas (Figure 51).

Ces résultats démontrent que même si la metformine induit une légère augmentation du nombre de vésicules lipidiques, elle est capable de prévenir l'action du glyoxal.

2 Résultats *in vitro* 3D

Afin de mieux comprendre la glycation de la peau dans un modèle plus intégré, nous avons choisi de tester l'effet du glyoxal et de la metformine sur 3 modèles différents de peau 3D : un modèle de derme vascularisé, un modèle de peau complète avec un épiderme différencié ainsi qu'un modèle de cicatrisation 3D. Ces modèles ont été réalisés au LOEX à Québec au Canada dans le cadre de la bourse de mobilité internationale IDEX Lyon 1, que j'ai obtenu en 2019 pour une durée de 8 mois.

Dans ce cas, il a fallu adapter les doses utilisées pour les traitements car les modèles 3D comportent des fibroblastes, des cellules endothéliales et des kératinocytes qui ont leur propre sensibilité aux différents traitements. Le LOEX avait déjà mis au point la concentration de glyoxal à utiliser pour les différents modèles de peaux 3D avant mon arrivée. Lors de mon séjour de recherche, j'ai donc testé 3 concentrations différentes de metformine, je ne présenterai ici que 2 doses testées, car la concentration la plus élevée s'est révélée néfaste pour les kératinocytes et la formation de l'épiderme.

Les concentrations utilisées sont référencées dans la Table 10 du matériel et méthodes. Lors de l'élaboration du derme, les concentrations des traitements sont plus élevées puisque les fibroblastes et cellules endothéliales sont moins sensibles que les kératinocytes.

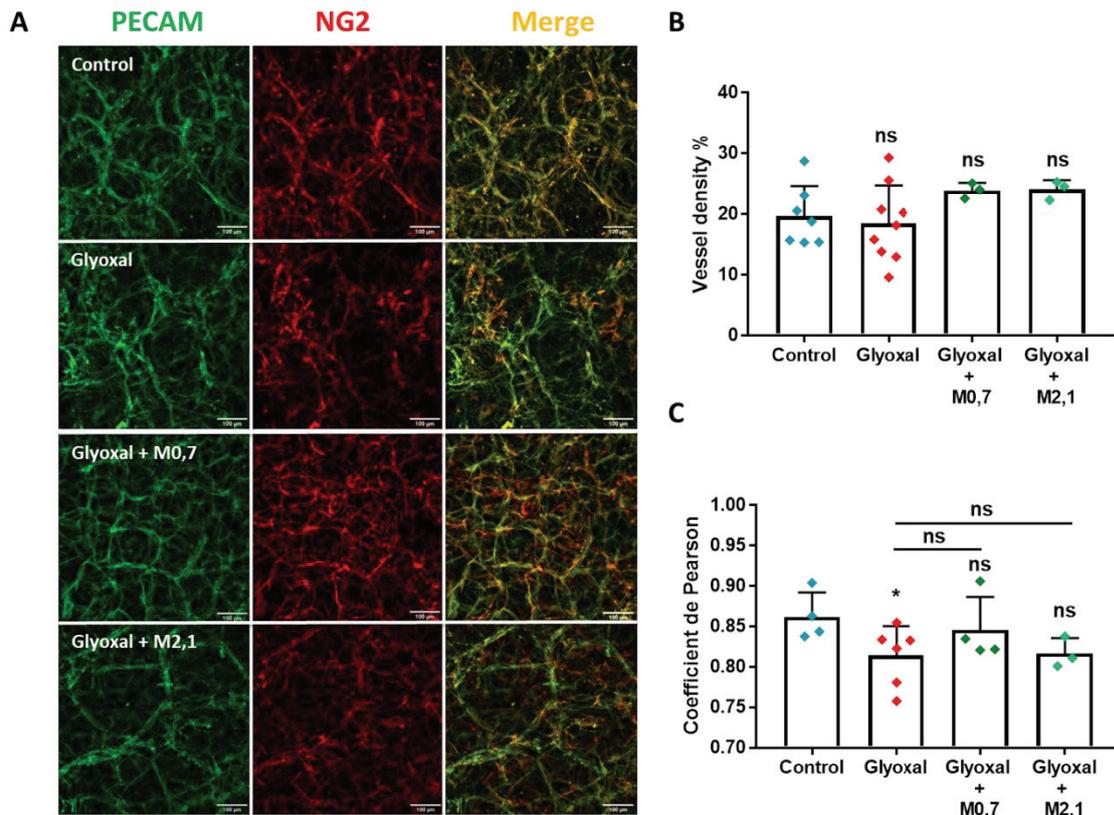


Figure 52. Vascularisation du derme reconstruit : Immunofluorescence de PECAM et NG2
 Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,6 mM), M0,7 : Metformine 0,7 mM et M2,1 : Metformine 2,1 mM. Un minimum de 3 dermes par condition a été analysé.
A/ Imagerie confocale de l'immunofluorescence dirigée contre PECAM 1 (vert) et NG2 (rouge). Barre d'échelle = 100 μ m. **B/** % de densité vasculaire calculée via le marquage PECAM 1 (Air de fluorescence / l'aire totale). **C/** Coefficient de Pearson calculé via le plugin Jacop sur Fiji correspondant à la colocalisation de la fluorescence de PECAM et de NG2.
 Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD). Des tests Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les groupes entre eux : * $p < 0,05$ ns = non-significatif. Barre d'échelle= 100 μ m

2.1 La glycation compromet la maturité et la stabilité des vaisseaux dans un modèle de derme vascularisé

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet du glyoxal et de la metformine sur le réseau vasculaire. Pour ce faire, nous avons développé un modèle de derme vascularisé en ensemençant des fibroblastes et des cellules endothéliales dans des éponges de collagène bovin et chitosan utilisées en routine au LOEX. Après 1 semaine de prolifération des cellules à l'intérieur de l'éponge, nous avons ensuite ajouté le glyoxal à 0,5 mM avec ou sans metformine à 0,7 mM et 2,1 mM pendant 7 autres jours. En raison de la durée importante des expériences en 3D, nous n'avons pas pu effectuer les dermes avec la metformine seule.

L'éponge de collagène bovin et chitosan permet aux fibroblastes de produire de la matrice extracellulaire humaine supplémentaire. Cette matrice complexe va permettre aux cellules endothéliales de former des vaisseaux et de s'organiser en un véritable réseau vasculaire. Au bout de 14 jours de culture nous avons été capables de visualiser ce réseau en observant le derme du dessus dans sa totalité au microscope confocale. Nous avons réalisé un marquage de PECAM 1 qui permet de marquer les cellules endothéliales et donc les vaisseaux qu'elles ont formés (Figure 52. A). En sélectionnant uniquement le marquage PECAM 1, nous avons estimé la densité vasculaire en calculant le ratio : aire du marquage PECAM 1 / aire totale (Figure 52. B). Il en résulte que 7 jours de traitement au glyoxal avec ou sans metformine, ne modifie pas la densité vasculaire bien que nous pouvons noter une plus faible variabilité en présence de metformine (Figure 52. B). Nous avons ensuite effectué un marquage des péricytes qui sont les cellules qui entourent les vaisseaux matures, grâce à l'immuno-marquage NG2. Les péricytes sont synonymes de maturité et de stabilité des vaisseaux, nous avons donc mesuré la co-localisation de NG2 et de PECAM 1 grâce au coefficient de Pearson : plus celui-ci est élevé, plus les marqueurs co-localisent (Figure 52. C). Nous pouvons remarquer une diminution de la co-localisation entre NG2 et PECAM 1 en présence de glyoxal. Les vaisseaux seraient donc moins matures et stables du fait d'une diminution de la présence de péricytes (Figure 52. A-C). Les dermes traités avec de la metformine en plus du glyoxal présentent une co-localisation similaire aux dermes non traités (Figure 52. C). Cependant aucune différence n'est à souligner entre les groupes glyoxal seul ou avec de la metformine (Figure 52. C). La metformine à 0,7 mM avec le glyoxal semble présenter des valeurs de co-localisation supérieures au groupe glyoxal seul, une tendance plus élevée est à souligner (Figure 52. C). Il faudrait cependant augmenter le nombre d'échantillons pour valider ou non cette observation.

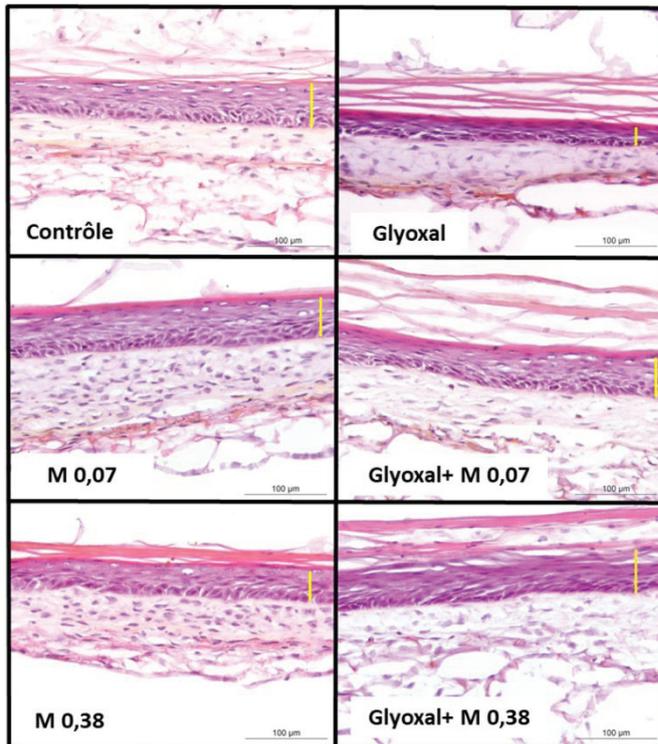
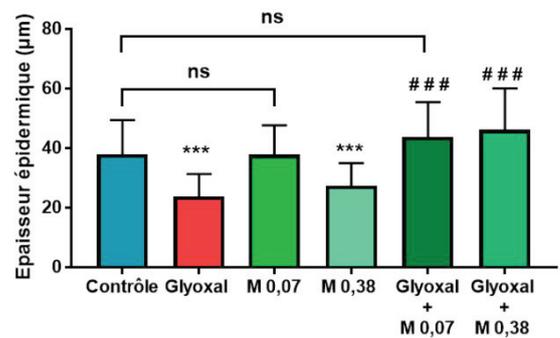
A**B**

Figure 53. Epaisseur de l'épiderme reconstruit en réponse au glyoxal et à la metformine

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,2 mM), M0,07 : Metformine 0,07 mM et M 0,38 : Metformine 0,38 mM. **A/** Images des peaux 3D colorées au HES. Le trait jaune correspond à un exemple de mesure de l'épaisseur de l'épiderme excluant la couche cornée. **B/** Graphique représentant l'épaisseur de l'épiderme en µm.

Les graphiques représentent la moyenne de 200 à 300 mesures indépendantes (4 à 6 peaux/condition et 50 mesures/peau, les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD). Des tests Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les groupes entre eux : *** $p < 0.001$ (versus contrôle) ; ### (versus glyoxal) ; ns = non-significatif. Barre d'échelle= 100 µm.

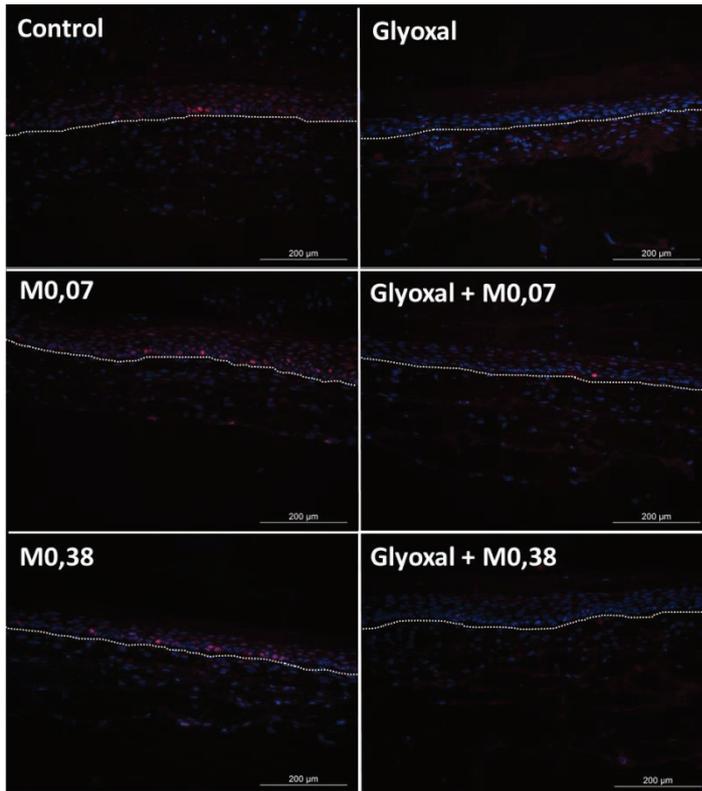
2.2 Le glyoxal perturbe la différenciation épidermique dans un modèle de peaux reconstruites complètes, la metformine présente des effets bénéfiques sur l'homéostasie de l'épiderme

Les dermes vascularisés produits, servent ensuite de base pour l'ensemencement des kératinocytes et la production d'un épiderme différencié. Les kératinocytes sont ensemencés et laissés en immersion pendant 5 jours sans aucun traitement, pour leur permettre de proliférer. La peau est ensuite placée à l'interface air-liquide pendant 21 jours pour permettre la différenciation des kératinocytes et la formation d'un épiderme pluristratifié. Les kératinocytes sont des cellules bien plus sensibles aux traitements que les fibroblastes et les cellules endothéliales, c'est pourquoi les concentrations des traitements utilisées ont été diminuées. Ici la concentration de glyoxal est de 0,2 mM et de metformine est de 0,07 ou de 0,38 mM (Table 10). Lorsque les dermes ont été traités à 0,7 mM de metformine, la dose 2 utilisée pour le développement de l'épiderme est de 0,07 mM et lorsque les dermes ont été traités avec 2,1 mM de metformine, la dose 2 utilisée est de 0,38 mM (Table 10).

2.2.1 La metformine permet de rétablir l'épaisseur de l'épiderme en présence de glyoxal

Grâce à une coloration HES, nous avons été capables de mesurer l'épaisseur de l'épiderme obtenu (Figure 53). L'épaisseur de la couche cornée sur des coupes de peaux reconstruites est très variable car des artéfacts de coupes peuvent venir déchirer les cornéocytes et fausser les mesures, c'est pourquoi nous avons mesuré l'épaisseur de l'épiderme depuis la couche basale jusqu'au début de la couche cornée. Nous pouvons voir que le glyoxal semble induire une désorganisation de l'épiderme avec une perte de la couche basale dans laquelle les cellules ne sont pas jointives et cubiques (Figure 53. A). Cette désorganisation en présence de glyoxal est corrélée à une diminution importante de l'épaisseur de l'épiderme avec un nombre de couches très inférieure à celui des contrôles (Figure 53. B). La metformine seule à 0,07 mM n'induit aucune modification de l'épiderme en termes d'épaisseur et d'organisation (Figure 53. A et B). Au contraire la metformine à 0,38 mM induit une diminution significative de l'épaisseur de l'épiderme, avec un nombre de couche inférieur au contrôle (Figure 53. A et B). Lorsque la metformine à 0,07 mM est ajoutée en même temps que le glyoxal, nous pouvons observer une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme par rapport au glyoxal seul, l'épaisseur est similaire au contrôle et l'organisation de l'épiderme semble également rétablie (Figure 53. A). La metformine à 0,38 mM en présence de glyoxal, ne semble pas rétablir une organisation similaire à l'épiderme du contrôle (Figure 53. A), mais permet d'augmenter l'épaisseur de l'épiderme par rapport au glyoxal (Figure 53. B). Il existe cependant une différence d'épaisseur entre le contrôle et les peaux traitées avec du glyoxal et de la metformine à 0,38 mM (Figure 53. B).

A



B

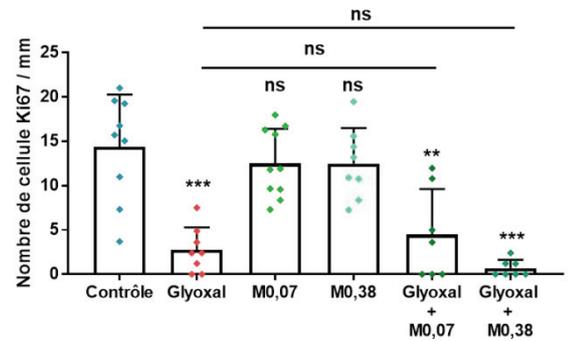


Figure 54. Expression de Ki67 en réponse au glyoxal et à la metformine dans le modèle de peau 3D
 Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,2 mM), M 0,07: Metformine 0,07 mM et M 0,38 : Metformine 0,38 mM. 2 peaux 3D par conditions ont été analysées avec 3 coupes par peaux (n=6)
A/ Images de l'immunofluorescence dirigée contre Ki67 (rouge), les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). La ligne en pointillée blanche représente la limite entre le derme et l'épiderme. **B/** Graphique représentant le nombre de noyaux rapporté à la longueur des peaux 3D en mm.
 Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD). Des tests Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les groupes entre eux : ** p<0.01; *** p<0.001; ns = non-significatif. Barre d'échelle= 200 µm.

Nous montrons donc, que la metformine à 0,07 mM est capable de contrecarrer l'effet du glyoxal en termes d'épaisseur et d'organisation de l'épiderme. A 0,38 mM, la metformine seule semble délétère à une différenciation correcte des kératinocytes.

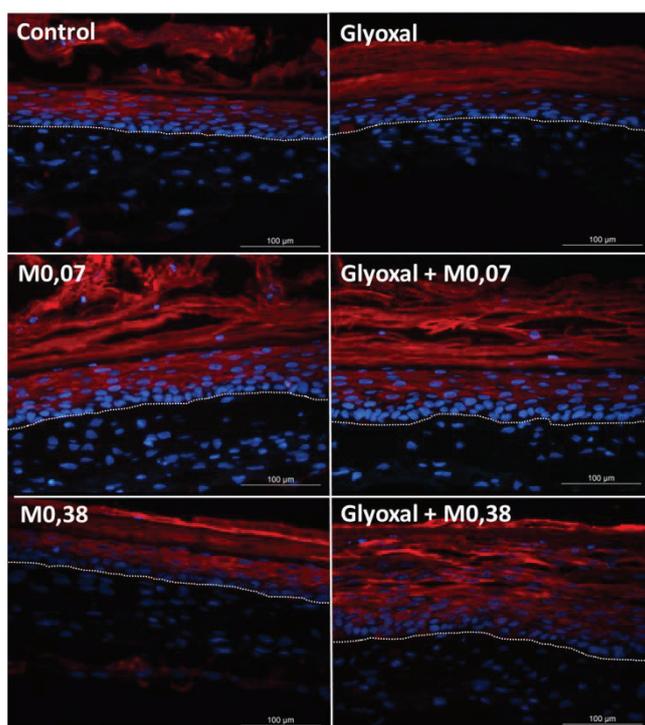
Pour aller plus loin en termes d'organisation et de différenciation de l'épiderme, nous avons effectué des immunofluorescences avec des marqueurs spécifiques des différentes strates de l'épiderme.

2.2.2 La glycation diminue la capacité de prolifération des kératinocytes

Un marquage Ki67 en immunofluorescence a d'abord été effectué pour pouvoir analyser la capacité proliférative des kératinocytes de la couche basale (Figure 54. A). Nous avons pu effectuer un comptage des noyaux positifs au Ki67 et ce nombre a été rapporté à la longueur totale des peaux 3D (Figure 54. B). Les peaux non traitées présentent ± 14 kératinocytes basaux en prolifération par mm (Figure 54. A et B). Le glyoxal semble induire une diminution importante de la capacité de prolifération, puisque seulement quelques cellules apparaissent positives pour Ki67 (± 2 /mm) (Figure 54. B). Nous avons ensuite analysé l'effet de la metformine et nous montrons qu'à 0,07 mM et 0,38 mM, la prolifération des kératinocytes n'est pas modifiée (± 12 /mm pour les 2 concentrations) (Figure 54. B). D'autre part, en présence de glyoxal, la metformine à 0,07 mM permet une légère augmentation du nombre de cellules prolifératives (± 4 /mm) qui n'est pas significative (Figure 54. B). Au contraire lorsque la concentration de metformine est élevée à 0,38 mM en présence de glyoxal, aucun effet bénéfique n'est à souligner avec $\pm 0,5$ cellules positives pour Ki67 /mm (Figure 54. B).

La metformine seule n'a pas d'effet sur la prolifération des kératinocytes basaux, en revanche en présence de glyoxal, à trop forte concentration, son effet peut être délétère. Une légère amélioration de la prolifération des kératinocytes en présence de glyoxal est à noter avec 0,07 mM de metformine.

A



B

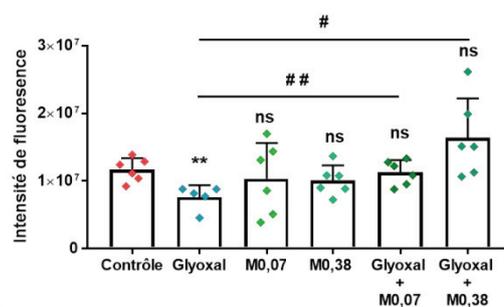


Figure 55. Expression de K1 en réponse au glyoxal et à la metformine dans le modèle de peau 3D
 Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,2 mM), M 0,07 : Metformine 0,07 mM et M 0,38 : Metformine 0,38 mM. 2 peaux 3D par conditions ont été analysées avec 3 coupes par peaux (n=6)
A/ Images de l'immunofluorescence dirigée contre K1 (rouge), les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). La ligne en pointillée blanche représente la limite entre le derme et l'épiderme. **B/** Graphique représentant l'intensité de fluorescence de K1 calculée via image J en excluant la couche cornée. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD). Des tests Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les groupes entre eux : ** p<0.01 et ns = non-significatif (versus contrôle) et # p<0,05 ; ## p<0,01 (versus glyoxal). Barre d'échelle= 100 µm.

2.2.3 La couche épineuse est altérée en présence de glyoxal, la metformine permet de rétablir son équilibre

Par la suite, la différenciation précoce des kératinocytes via l'expression de la kératine 1 (K1) a été analysée. Comme nous pouvons le voir sur les peaux contrôles non traitées, l'expression de K1 est absente de la couche basale et commence à s'exprimer au niveau de la couche épineuse (Figure 55. A). Nous avons quantifié l'intensité de fluorescence de l'épiderme en excluant la couche cornée qui apporte beaucoup de variabilité puisque les coupes au cryostat et l'inclusion en OCT retire souvent d'importantes parties de la couche cornée qui desquame (Figure 55. B). La localisation de l'expression de K1 est similaire en présence de glyoxal au contrôle (Figure 55. A), cependant son intensité est significativement diminuée par rapport au contrôle (Figure 55. B). La metformine seule à 0,07 mM et 0,38 mM n'induit pas de différence d'expression et de localisation de K1 (Figure 55).

D'autre part l'ajout de metformine (0,07 mM et 0,38 mM) en présence de glyoxal permet de retrouver une intensité de fluorescence similaire au contrôle et significativement plus élevée que la condition glyoxal (Figure 55. B). Cependant, il est important de noter des valeurs très élevées d'intensité de K1 lorsque le glyoxal est en présence de metformine à 0,38 mM (Figure 55. B). De plus, K1 semble présent dans la couche basale des épidermes pour cette condition (Figure 55. A). A trop forte concentration en présence de glyoxal la metformine est donc néfaste puisqu'elle induit une augmentation de la différenciation précoce des épidermes.

Nous avons donc montré qu'à 0,07 mM, la metformine contrecarre l'effet du glyoxal sur l'expression de K1.

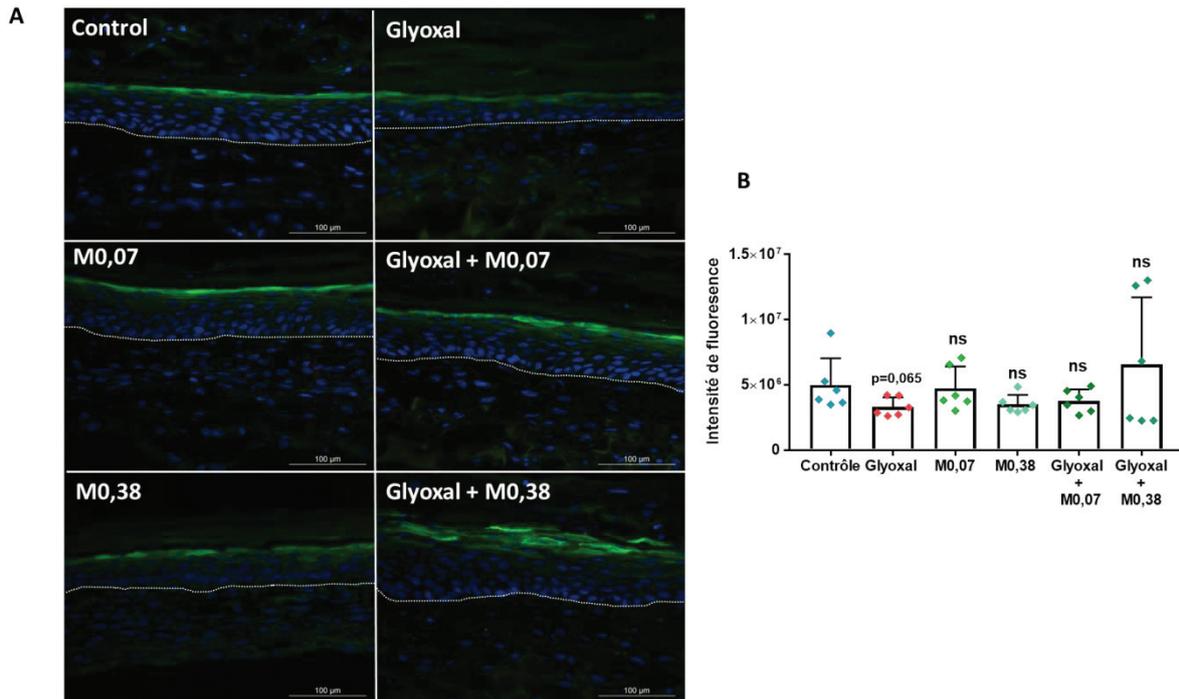


Figure 56. Expression de la loricrine en réponse au glyoxal et à la metformine dans le modèle de peau 3D

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,2 mM), M 0,07 : Metformine 0,07 mM et M 0,38 : Metformine 0,38 mM. 2 peaux 3D par conditions ont été analysées avec 3 coupes par peaux (n=6)

A/ Images de l'immunofluorescence dirigée contre la loricrine (vert), les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). La ligne en pointillée blanche représente la limite entre le derme et l'épiderme. **B/** Graphique représentant l'intensité de fluorescence de la loricrine calculée via image J en excluant la couche cornée.

Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD). Des tests Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les groupes entre eux : ns = non-significatif (versus contrôle et versus glyoxal). Barre d'échelle= 100 μm.

2.2.4 La différenciation terminale des kératinocytes est perturbée en présence de glyoxal

Afin de déterminer l'effet du glyoxal et de la metformine sur la différenciation tardive des kératinocytes, nous avons ensuite effectué une immunofluorescence dirigée contre la loricrine qui se trouve sous forme de granule dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche granuleuse (Figure 56. A). Il apparaît que la loricrine semble diminuée ($p=0,065$) dans les épidermes traités avec du glyoxal par rapport au contrôle (Figure 56. B). D'autre part, les deux concentrations de metformine n'induisent pas de différence sur l'expression et la localisation de la loricrine (Figure 56). Lorsque la metformine est en présence de glyoxal, l'expression de la loricrine semble rétablie, bien qu'aucune différence significative ne soit à souligner par rapport à la condition glyoxal (Figure 56. B). Nous avons montré également, des valeurs d'intensité de la loricrine très élevées lorsque les peaux 3D sont traitées avec du glyoxal et de la metformine à 0,38 mM (Figure 56). Une fois encore, cette concentration en présence de glyoxal semble induire une augmentation de la différenciation. 0,07 mM de metformine semble être une concentration plus appropriée pour empêcher l'effet du glyoxal, même si celui-ci semble relativement faible sur l'expression de la loricrine.

2.3 Modèle de cicatrisation *in vitro* 3D

Mon séjour de 8 mois au Canada, m'a également permis d'apprendre un modèle innovant de cicatrisation 3D qui permet d'analyser la migration des kératinocytes. De la même façon que précédemment, le LOEX avait déjà mis au point ce modèle en présence de glyoxal et j'ai donc été amené à tester de nouveau 3 concentrations de metformine. Je présenterai dans ce manuscrit seulement les 2 plus faibles, car une fois encore la concentration la plus élevée était délétère pour l'épiderme et la migration des kératinocytes. Concernant le glyoxal, sa concentration est ici plus importante que pour l'élaboration d'une peau 3D complète puisque le temps de traitement est plus court, et est ajouté uniquement lorsque les kératinocytes ont proliféré et commencé à se différencier. Les concentrations utilisées sont listées dans la Table 11 du matériel et méthodes.

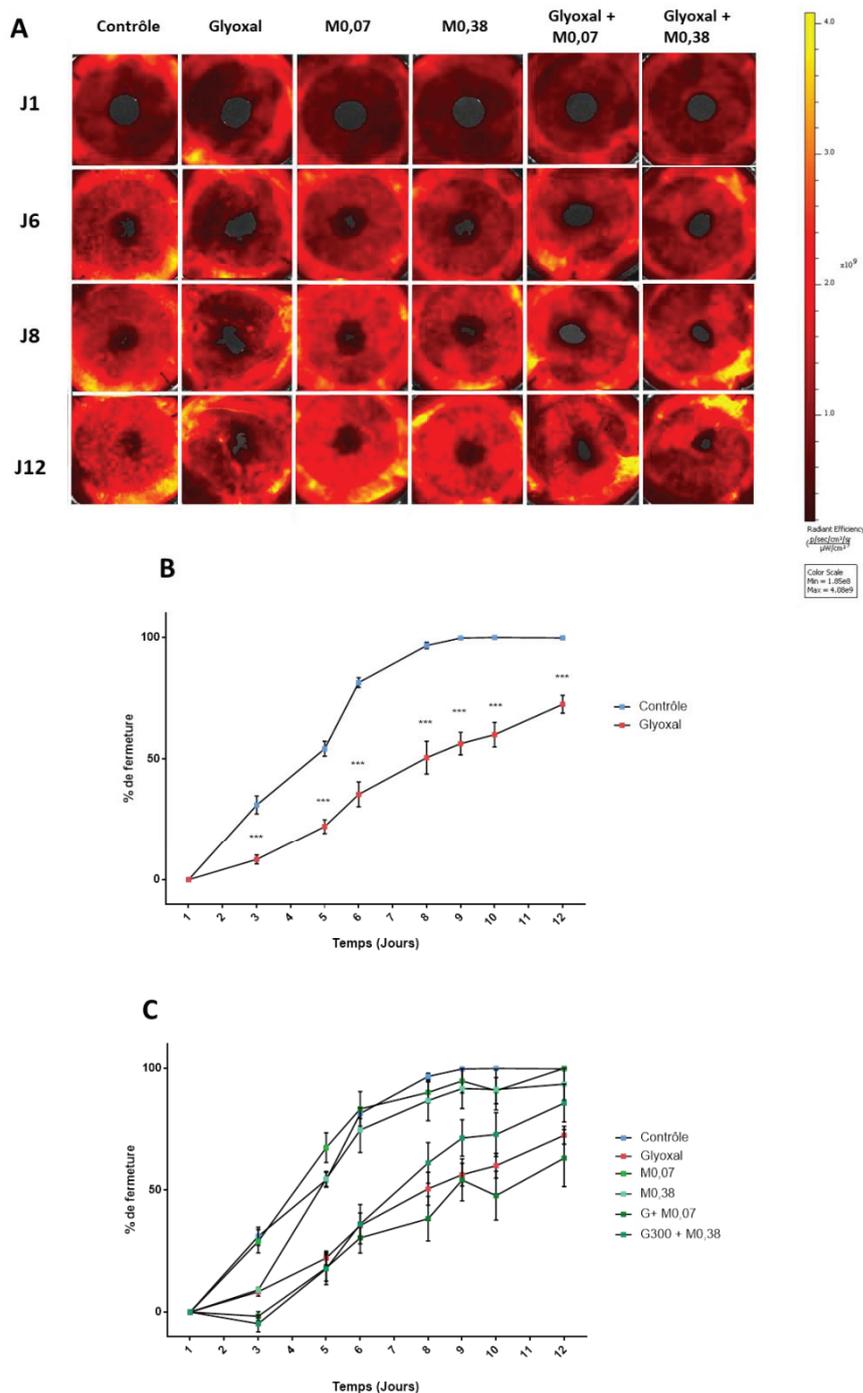


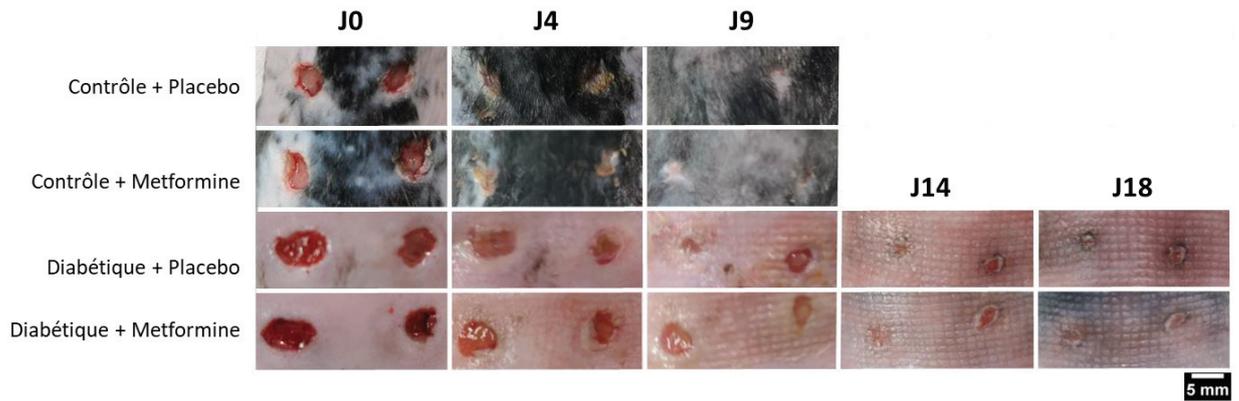
Figure 57. Migration des kératinocytes au sein du modèle 3D de cicatrisation

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,3 mM), M 0,07 : Metformine 0,07 mM et M 0,38 : Metformine 0,38 mM. L'expérience a été réalisée sur 4 à 6 peaux 3D par conditions. **A/** Images correspondant à la fluorescence des kératinocytes des peaux 3D vues du dessus. Le gradient de fluorescence est représenté à droite. **B/** Graphique représentant le % de fermeture des plaies au cours du temps des groupes « Contrôle » et « Glyoxal ». **C/** Graphique représentant le % de fermeture des plaies au cours du temps de l'intégralité des groupes. Une ANOVA 2 a été réalisée pour comparer les groupes entre eux (**B/et C/**) *** $p < 0.001$, lorsque rien n'est indiqué aucune différence significative n'a été détectée. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux erreurs type de la moyenne (SEM).

2.4 Le glyoxal inhibe la migration des kératinocytes et restreint la fermeture d'une plaie dans un modèle 3D

Nous avons voulu analyser l'effet du glyoxal et de la metformine sur la migration des kératinocytes dans un modèle 3D. Pour ce faire, le modèle innovant du LOEX utilise des kératinocytes GFP, ce qui nous a permis d'analyser finement leur migration en observant leur fluorescence après avoir effectué un punch de 6 mm de diamètre (Figure 57. A). Les peaux contrôles non traitées referment complètement la plaie en 9 jours (Figure 57. A et B). Au contraire les peaux 3D traitées au glyoxal présentent un retard significatif de migration dès 3 jours et la plaie n'est toujours pas fermée au bout de 12 jours (Figure 57. A et B). Globalement, les 2 concentrations de metformine (0,07 et 0,38 mM) n'affectent pas la migration des kératinocytes par rapport au contrôle et ne permettent pas de contrecarrer le retard induit par le glyoxal (Figure 57. A et C). Cependant 3 jours après le punch, la metformine seule à 0,38 mM semble induire un retard de la migration des kératinocytes qui est rattrapé au jour 5 (Figure 57. C). Nous pouvons également noter une tendance à l'amélioration de la migration des kératinocytes traités avec la metformine à 0,38 mM et glyoxal à partir du jour 8 par rapport au glyoxal seul (Figure 57. C).

A



B

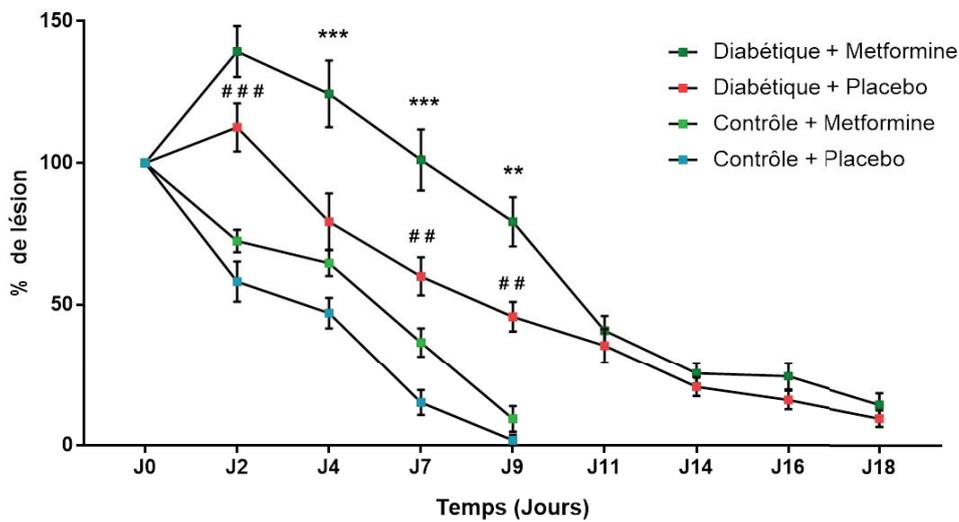


Figure 58. Cicatrisation des souris Db/Db et contrôles avec un pansement metformine ou un placebo

A/ Images représentatives des plaies au fil du temps des souris diabétiques (Db/Db) ou contrôles (saines) avec un pansement placebo ou metformine. **B/** % de lésion au cours du temps. Le débridement et l'application des pansements a été réalisé à J0.

Une ANOVA 2 a été réalisé pour comparer les groupes entre eux. * = Diabétique + Metformine versus Diabétique + Placebo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, # = Diabétique + Placebo versus Contrôle + Placebo # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. Lorsque rien n'est indiqué aucune différence significative n'a été détectée.

Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux erreurs type de la moyenne (SEM).

3 Test d'un pansement metformine *in vivo*

Durant la fin de ma thèse, nous avons eu l'occasion de tester la metformine chez la souris. En effet, les laboratoires URGO ont développé un pansement permettant de libérer de la metformine que nous avons testé sur des souris diabétiques (Db/Db) et des souris saines, dites contrôles. Le pansement est constitué d'un tissage revêtu d'une matrice d'élastomère qui comporte de la metformine ou non. Le pansement permet la libération contrôlée et prolongée de la metformine. En effet, jusqu'à 100 % de la metformine insérée dans le pansement sont libérés en 72h au niveau de la plaie, avec un pic de libération à 10h (données Uργο).

Les souris Db/Db sont mutées spontanément pour le récepteur à la leptine, ne ressentent pas la sensation de satiété et mangent donc continuellement, ce qui permet, l'installation d'un diabète relativement tôt. Lorsque nous avons commencé l'expérience les souris étaient âgées de 12 semaines avec 4 semaines de diabète. La glycémie a été mesurée au début et à la fin de l'expérience pour s'assurer qu'elle était supérieure à 400 mg/dl pour les souris diabétiques et inférieure pour les souris contrôles (non montré ici).

3.1 Les souris diabétiques présentent un retard de cicatrisation important, la metformine n'est pas capable d'améliorer la fermeture des plaies

Nous montrons que, l'induction d'une plaie de compression à l'aide d'aimants, les souris Db/Db présentent un retard de cicatrisation par rapport aux souris contrôles, et ce dès 2 jours après l'induction de la plaie (Figure 58. A). Les souris diabétiques cicatrisent en 18 jours contre seulement 9 pour les souris contrôles (Figure 58. B). Nous sommes donc parvenus à reproduire chez la souris, le retard de cicatrisation observé chez l'homme. Il est important de noter une augmentation de la taille des plaies chez les souris diabétiques 2 jours après le débridement. Puis la plaie commence à se refermer à partir de J2.

Concernant les souris contrôles, le pansement metformine semble retarder la cicatrisation précoce dès J2 par rapport au placebo (Figure 58. A et B). Cependant, il apparaît que les plaies des souris contrôles traitées avec la metformine rattrapent leur léger retard de fermeture entre J7 et J9. En effet, les souris traitées avec la metformine referment leur plaie en même temps que les souris avec le pansement placebo à J9 (Figure 58. B). L'analyse de la fermeture des plaies des souris diabétiques a révélé que la metformine induisait également un retard de cicatrisation à partir de J4 jusqu'à J9 (Figure 58. B). De façon similaire à ce que l'on a observé chez les souris contrôles, la fermeture des plaies

traitées à la metformine s'accélère à partir de J9 et rattrape le retard induit dans les phases précoces de cicatrisation, à J11 (Figure 58. B).

DISCUSSION & **PERSPECTIVES**

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans une démarche de compréhension de l'effet de la glycation sur les défauts de cicatrisation des diabétiques et l'apparition de plaies chroniques. Pour cela nous avons utilisé le glyoxal comme agent glyquant sur des fibroblastes et des modèles plus complexes de peaux 3D. Nous avons également testé sur ces mêmes modèles une molécule qui pourrait contrecarrer les effets de la glycation et proposée par les Laboratoires Urgo : la metformine. Enfin, nous avons réalisé des études préliminaires de cicatrisation sur des souris diabétiques sur lesquelles nous avons pu appliquer un pansement à base de metformine au cours de la fermeture de plaie de compression.

Effet du glyoxal sur le comportement des fibroblastes :

En complément de l'article sur le comportement des fibroblastes en présence de glyoxal nous avons effectué de nombreuses études complémentaires.

Tout d'abord, l'utilisation de l'AFM nous a permis d'analyser le module élastique de différents compartiments cellulaires et extracellulaires. Concernant le collagène, l'expérience devra être réalisée une seconde fois afin d'augmenter le nombre de mesures et de déterminer si le glyoxal induit ou non une augmentation de la rigidité du collagène (Figure 50. D). La difficulté de ce travail a résidé sur le fait qu'il n'est pas simple d'induire la production de collagène par des fibroblastes non confluents, pour pouvoir effectuer les mesures par AFM du collagène néoformé. Bien que la présence de collagène ait été vérifiée par immunofluorescence, le réseau n'est pas aussi dense qu'il pourrait être. Ceci induit la formation d'un réseau hétérogène avec des fibres peut-être plus fines que la normale, conduisant aux écarts types important que nous avons observé (Figure 50. D).

Nous avons également montré une augmentation de la force de traction associée à la diminution de l'aire des cellules en présence de glyoxal, ce qui révèle que les cellules sont plus contractées et adhèrent plus fortement à la matrice sous-jacente. Ces observations sont associées à des défauts de migration, ce qui est concordant avec nos résultats de test scratch. Il a été montré que les fibroblastes cultivés sur du collagène glyqué par du 3-DG ne parvenaient pas à étendre leur filopodes, étaient immobilisés et adhéraient de façon plus importante à la matrice glyquée et que ces caractéristiques participent à des défauts de migration (Loughlin and Artlett 2009). Au contraire, une autre étude montre une moins bonne adhésion des fibroblastes lorsque le collagène est glyqué avec du méthylglyoxal (Alqahtani et al. 2021). Le type de glycation utilisé étant différent entre ces 2 études et les nôtres, ceci pourrait expliquer que nos conclusions soient divergentes.

Afin de compléter notre analyse il serait intéressant de tester dans notre modèle l'expression et la localisation de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) qui est impliquée dans la migration cellulaire

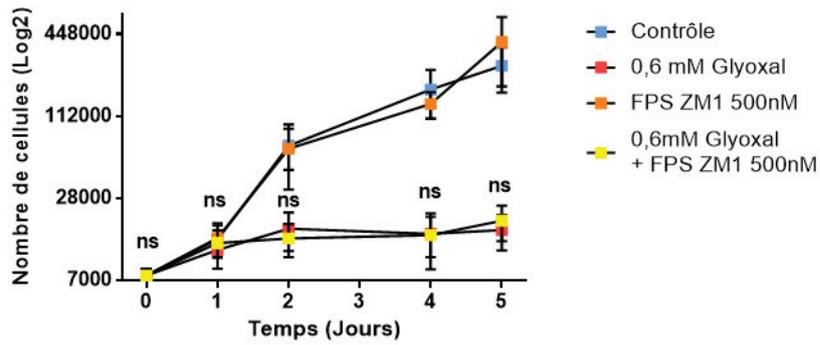


Figure 59. Effet de l'inhibition de RAGE sur la prolifération des fibroblastes
 Contrôle : cellules non traitées. L'expérience a été réalisée sur 3 donneurs de fibroblastes. Une ANOVA 2 a été effectuée pour comparer les groupes FPS ZM1 et 0.6 mM + FPS ZM1 : ns = non-significatif. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD).

et qui est diminuée dans les fibroblastes au contact de collagène glyqué. De plus, FAK est habituellement retrouvée au niveau de la surface cellulaire des fibroblastes mais change de localisation vers l'environnement peri-nucléaire au contact d'un support glyqué (Loughlin and Artlett 2009). Ce changement de localisation signe un dysfonctionnement important de FAK qui ne peut plus jouer son rôle à la membrane cellulaire dans l'adhésion et la migration.

L'effet du glyoxal est-il dépendant de la voie AGE-RAGE ?

Comme expliqué dans l'introduction, la voie AGE-RAGE peut jouer un rôle crucial dans la réponse à la glycation et l'induction de nombreuses voies de signalisation. Au cours de ma thèse, nous avons effectué des expériences préliminaires afin de vérifier si les effets du glyoxal observés étaient dépendants ou non de l'axe AGE-RAGE. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur de RAGE, le FPS-ZM1, qui possède une très forte affinité pour RAGE et empêche la fixation des AGEs (Zhan et al. 2018). Nous avons traité les fibroblastes avec 500 nM de FPS-ZM1, avec ou sans glyoxal. Il apparaît que l'inhibition de RAGE ne permet pas de rétablir la prolifération des fibroblastes (Figure 59).

La diminution de prolifération des fibroblastes en présence de glyoxal serait donc indépendante de l'axe AGE-RAGE. L'expérience a été réalisée sur les 3 donneurs de fibroblastes, mais cependant, nous n'avons testé qu'une seule dose de FPS-ZM1 basé sur l'article de Zhan et al. Pour confirmer ce résultat, il faudrait également tester d'autres doses de FPS-ZM1, ou tester un autre inhibiteur de RAGE comme le GM-1111 qui permet notamment d'éviter la liaison des CMLs avec RAGE (Zhang J. et al. 2011).

L'action du glyoxal sur la prolifération des fibroblastes pourrait être induite soit par l'inactivation de protéines essentielles à la division cellulaire soit en raison de la forte adhésion des fibroblastes à leur matrice qui immobiliserait les cellules qui ne pourraient alors plus migrer ou proliférer.

En complément de mon travail sur les fibroblastes en culture, il nous est apparu intéressant d'étudier les conséquences de la glycation dans des modèles plus intégrés et tout à fait innovants de peaux 3D. C'est pourquoi j'ai réalisé un séjour de 8 mois au LOEX à Québec dans l'équipe de François Berthod qui maîtrise parfaitement ces technologies. J'ai ainsi pu créer 3 types différents de modèles, en présence et en absence de glyoxal :

- Un modèle de derme vascularisé qui consiste à mettre en culture des fibroblastes et des cellules endothéliales dans une éponge. Les fibroblastes favorisent la formation spontanée de capillaires avec une lumière interne organisés en réseau tridimensionnelle et ramifiés, grâce à la sécrétion d'une matrice extracellulaire abondante (Berthod et al. 2006).

-Un modèle de peau complète où des kératinocytes sont ensemencés sur les dermes vascularisés. Après quelques jours de prolifération en immersion l'interface air-liquide permet la différenciation des kératinocytes pour former un épiderme organisé et pluristratifié.

- Un modèle de cicatrisation 3D qui permet d'analyser finement la capacité de migration de kératinocytes GFP pour refermer une plaie *in vitro* grâce au suivi de leur fluorescence au cours du temps.

Effet du glyoxal sur la maturité des vaisseaux :

Nous avons tout d'abord montré que les dermes traités pendant 7 jours au glyoxal présentent une densité vasculaire similaire aux dermes non traités. Au contraire, la présence de péricytes autour des vaisseaux semble être diminuée en présence de glyoxal puisque la co-localisation entre PECAM et NG2 est affaiblie. Une étude effectuée en 1989 sur les rétines de souris Db/Db montre une diminution significative du nombre de péricytes et une augmentation du ratio cellules endothéliales / péricytes, ce qui est concordant avec nos résultats (Midena et al. 1989). Plus récemment, des plaies d'excision ont été réalisées sur des souris Db/Db et l'analyse de ces plaies montre une augmentation de la perméabilité des capillaires avec une diminution de leur stabilité ainsi que du nombre de péricytes les entourant (Okonkwo et al. 2020).

Le recrutement des péricytes est donc diminué dans des plaies diabétiques ce qui pourrait participer au retard de cicatrisation.

Ce qui est important de souligner dans notre modèle c'est que seuls des cellules endothéliales et des fibroblastes ont été ensemencés au sein de l'éponge de collagène, les péricytes dérivent donc d'une de ces deux populations cellulaires. Or, des travaux préliminaires du LOEX démontrent que les péricytes dérivent des fibroblastes et non des cellules endothéliales (Berthod et al. 2012). Nous pouvons donc penser que la glycation induit un défaut de différenciation des fibroblastes en péricytes.

Homéostasie de l'épiderme et glycation :

L'ensemencement de kératinocytes sur ces modèles dermiques nous ont permis de développer, dans un second temps, un épiderme pluristratifié et différencié. Nous avons d'abord mesuré l'épaisseur de l'épiderme à l'aide de la coloration HES et celle-ci apparaît significativement diminuée en présence de glyoxal avec une déstructuration globale de l'épiderme et une diminution du nombre de kératinocytes prolifératifs. L'homéostasie de l'épiderme repose sur l'équilibre de la balance prolifération/différenciation, nous pouvons donc penser que si la prolifération des kératinocytes

basaux est diminuée, la différenciation des kératinocytes est alors augmentée. Or nos résultats montrent que le marquage de K1 est significativement plus faible et on observe une tendance à la diminution de la Loricrine. Il s'avère que peu d'études ont analysé la différenciation des kératinocytes en réponse à une glycation augmentée, mais Cadau et al, montrent une diminution importante de la Loricrine en présence de glyoxal ce qui est concordant avec nos résultats. Cependant, aucune différence en terme de prolifération des kératinocytes basaux n'est révélée (Cadau et al. 2015). D'autre part, la culture monocouche de kératinocytes sur un support de collagène I ou III glyqué induit une augmentation de l'involucrine et de K10 (Fujimoto E. et al. 2010). Dans notre étude il serait donc intéressant d'analyser ces marqueurs afin de connaître leur expression. De surcroît, K10 a été montré comme préférentiellement glyquée par les CMLs (Kawabata et al. 2011). Pennacchi et al, ont effectué une peau reconstruite avec du collagène glyqué et ont donc analysé uniquement l'effet d'un derme glyqué sur le comportement des kératinocytes (Pennacchi et al. 2015). Il apparaît que les couches épidermiques sont plus faibles avec la présence de vacuole dans le cytoplasme des kératinocytes. Ils montrent une augmentation de K14 dans la totalité de l'épiderme, ce qui est significatif de kératinocytes prolifératifs. Ce résultat n'est pas en accord avec nos expériences mais peut s'expliquer par le type d'induction de glycation qui est différente car dans l'étude de Pennacchi et al, c'est la répercussion de la glycation du derme sur l'épiderme qui est analysé.

Il faut cependant prendre en compte que l'immunofluorescence n'est pas une méthode quantitative mais qui permet d'avoir une idée de l'expression des protéines. Pour aller plus loin, nous pourrions lyser les peaux 3D afin de mesurer l'expression des protéines par western blot ou par un test ELISA.

Migration des kératinocytes dans un environnement glyqué :

Pour finir, nous avons également développé un modèle de cicatrisation 3D qui nous permet d'analyser la capacité de migration des kératinocytes qui ont été rendus fluorescent par transfection stable de GFP. La fluorescence des kératinocytes primaires permet de détecter le tout début de la migration et de la suivre de façon fine au cours du temps. Au cours de ce travail nous avons montré que la migration des kératinocytes diminue en présence de glyoxal. En accord avec nos résultats, Zhu et al, ont montré que des kératinocytes traités avec des AGEs-BSA présentaient des défauts de migration et de prolifération importants (Zhu et al. 2011). De plus, la capacité de migration des kératinocytes est réduite en présence de glyoxal à 0,5 mM pendant 24h, en perturbant la voie de signalisation EGFR dépendamment de Snai2 (Quan et al. 2014). Dans notre modèle, une fois que la plaie a été réalisée, la peau glyquée lésée est positionnée sur un derme sain. Pendant l'analyse de fermeture, le derme sous-jacent servant de support, sera à son tour glyqué. Or, en accord avec nos

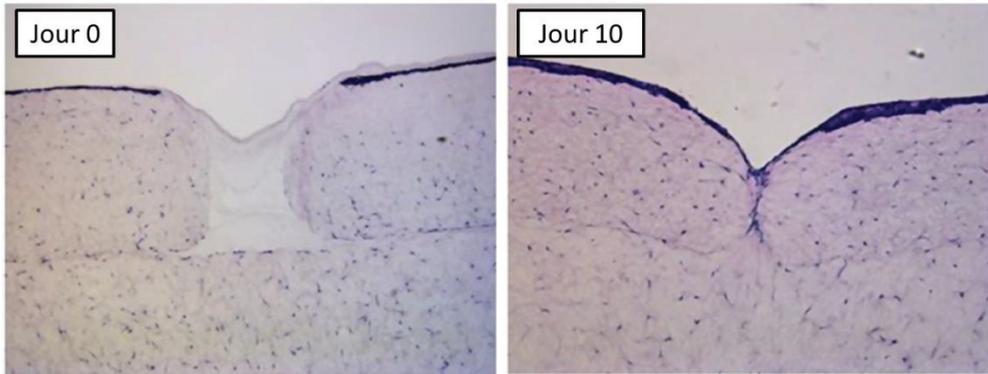


Figure 60. Modèle de cicatrisation 3D de Stuermer et al.

Coupe histologique du modèle de cicatrisation coloré à hématoxyline et éosine immédiatement après la lésion et 10 jours plus tard.

résultats, il a été montré en 2D que les kératinocytes cultivés sur un collagène glyqué possédaient des capacités de migration fortement diminuées (Morita et al. 2005).

Ce modèle de cicatrisation développé par le LOEX au Canada est très innovant car peu de modèles 3D *in-vitro* existent pour évaluer la capacité de fermeture de l'épiderme. C'est un modèle pertinent pour analyser la fermeture d'une plaie via la ré-épithélialisation comme cela se déroule chez l'homme. Nous pouvons citer les travaux de Stuermer et al, en 2018 qui utilisent un gel de collagène issu de queue de rat (Stuermer et al. 2018). Le principe est le même que celui utilisé dans ce manuscrit à savoir que les fibroblastes humains sont cultivés dans un gel de collagène et des kératinocytes immortalisés HaCat sont ensuite ajoutés pour former un épiderme. Un punch est réalisé et la peau lésée est déposée sur un gel de collagène avec des fibroblastes uniquement. Stuermer utilise en plus un gel de collagène vierge de cellule pour combler la lésion et aider à la migration (Figure 60). Ce modèle ne permet pas une analyse fine de la migration des kératinocytes mais plutôt une fermeture grâce au rapprochement du gel de collagène au niveau des berges. Il y a un phénomène fort de contraction qui permet à l'épiderme de se refermer, comme ce qui est observé chez la souris.

En plus des différentes études qui m'ont amené à mettre en évidence les conséquences de la glycation sur le comportement des fibroblastes et sur différents modèles de peaux 3D, j'ai également été amenée à tester une molécule, la metformine, comme potentielle molécule anti-glycante. J'ai donc observé l'effet de la metformine sur plusieurs paramètres tels que la glycation et la mobilité des fibroblastes, la production de matrice extracellulaire et le développement du réseau vasculaire ainsi que la migration des kératinocytes.

Effets de la metformine sur la glycation des fibroblastes :

La première étape a consisté à déterminer une concentration non toxique de metformine (7mM) pour traiter les fibroblastes, qu'elle soit seule ou en présence de 0.6 mM glyoxal.

L'analyse de la présence de CML par western blot au cours du temps a permis de mettre en évidence une augmentation importante de ces CML après ajout de glyoxal entre 24 et 72h (Figure 48. C et D). L'accumulation de CML semble être diminuée par l'action de la metformine.

Cette expérience n'a cependant été réalisée que sur 1 donneur de fibroblastes. Afin d'obtenir des analyses statistiques, il faudrait réitérer l'expérience sur les 2 autres donneurs. Nos résultats sont concordants avec la littérature qui montre bien la metformine comme une molécule anti-glycante qui réduit le taux de CML (Adeshara et al. 2020).

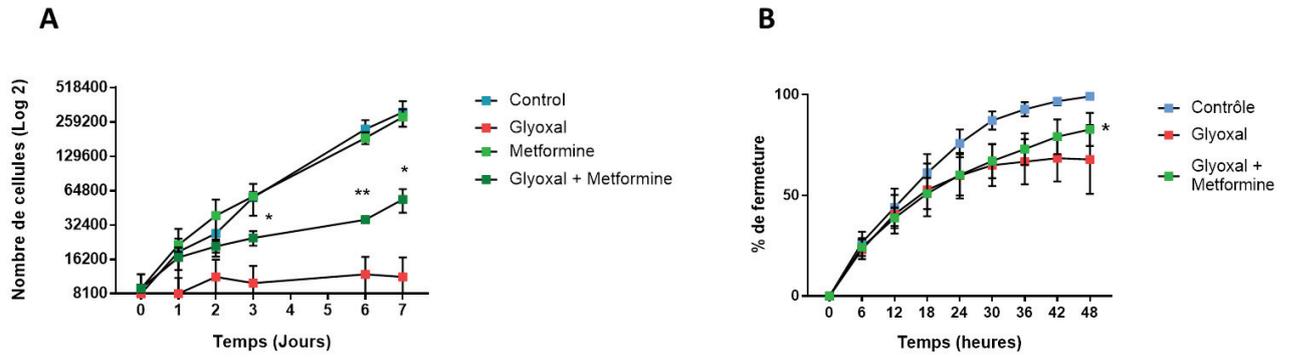


Figure 61. Effet de la metformine sur la prolifération migration des fibroblastes

Contrôle : cellules non traitées ; Glyoxal (0,6 mM), Metformine (7 mM). L'expérience a été réalisée sur un seul donneur de fibroblastes.

A/ Un comptage cellulaire pendant 7 jours a été effectué pour estimer la prolifération cellulaire dans 3 puits différents. Un multiple t-test a été effectuée pour comparer les groupes glyoxal et glyoxal + metformine * $p < 0.05$ ** $p < 0,01$. **B/** Le % de fermeture a été mesuré en calculant l'aire non fermée par les cellules toutes les 6 heures, jusqu'à 48h dans 6 puits différents.

Une ANOVA 2 a été effectuée pour comparer les groupes glyoxal et glyoxal + metformine : * $p < 0.05$. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (SD).

En plus de nos études, il serait intéressant de tester le stress oxydatif dans nos conditions expérimentales. En effet, le glyoxal à 5 mM est connu pour induire un stress oxydatif important dans les hépatocytes, qui est contrecarré par des agents anti-oxydants comme la quercétine (Shangari and O'Brien 2004). D'autre part, des cellules épithéliales de rétine présentent une diminution de leur viabilité et une augmentation de la mort cellulaire et du stress oxydatif en présence de 0.5 mM glyoxal (Qu et al. 2020), effets qui sont contrecarrés par la metformine à 0,1 mM.

Effets de la metformine sur le comportement des fibroblastes :

L'effet de la metformine sur les caractéristiques mécaniques des fibroblastes a ensuite été analysée par la technique d'AFM. Nous avons révélé que la metformine était capable de contrecarrer les effets du glyoxal en augmentant significativement l'aire des cellules (Figure 50. F). Concernant la force de traction, les cellules traitées avec de la metformine et du glyoxal ne présentent pas de différences significatives par rapport au groupe glyoxal seul. Cependant les analyses révèlent un groupe de cellules dont la force de traction est très faible (Figure 50. E). Ces résultats semblent encourageants quant à un effet potentiellement bénéfique de la metformine sur la migration des fibroblastes. Les expériences méritent d'être effectuées une seconde fois pour confirmer ces observations et pour tester les propriétés morphologiques et mécaniques des fibroblastes en présence de metformine seule.

Pour aller plus loin, nous avons effectué des études préliminaires (un seul donneur de fibroblastes) pour estimer l'effet de la metformine sur la prolifération et la migration. Il apparaît que la metformine semble améliorer la prolifération des fibroblastes à partir de 3 jours par rapport au groupe traité avec du glyoxal (Figure 61. A). Concernant la migration, la metformine améliore la fermeture des plaies *in vitro* uniquement à 48h (Figure 61. B).

Ces résultats sont donc encourageants quant à l'effet de la metformine sur l'amélioration de la prolifération et la migration des fibroblastes dans des conditions de glycation et seraient concordants avec la tendance à l'amélioration de la force de traction exercée par les fibroblastes en présence de glyoxal et de metformine.

Certaines études ont été effectuées sur la metformine et son effet sur la prolifération et la migration, mais la littérature présente des données discordantes.

Une étude récente a testé l'effet de la metformine sur la prolifération des fibroblastes 3T3 cultivés avec une dose très élevée de glucose (Soydas et al. 2018). Cette étude met en évidence une diminution de la prolifération en présence de forte concentration de glucose et montre que la

metformine (0,05 mM et 0,5 mM) est capable d'augmenter la prolifération des fibroblastes. Les concentrations de metformine utilisées sont ici beaucoup plus faible et les temps utilisés sont trop courts pour induire des AGEs, l'étude se concentre uniquement sur l'augmentation du taux de glucose. L'action anti-glycante de la metformine ne peut donc pas être analysée, ce qui peut expliquer la plus faible concentration utilisée. En effet ici, la metformine ne peut pas exercer sa capacité à séquestrer des dicarbonyles comme dans notre étude.

D'autre part, des études analysent l'effet de la metformine dans des contextes sains, non hyperglycémiques. Par exemple, les fibroblastes cardiaques migrent et prolifèrent moins en présence de metformine (concentration non connue) (Mummidi et al. 2016). De plus, des fibroblastes synoviaux présentent une diminution de la prolifération et de la migration en présence de 5 et 10 mM de metformine. Au contraire, avec des plus faibles doses de metformine (entre 0,5 et 2 mM), la prolifération est augmentée par rapport au contrôle (Chen Y. et al. 2020).

La metformine ne semble pas mettre en évidence une dose réponse sur la migration et la prolifération, le choix de sa concentration est donc crucial. Nous pouvons penser que la metformine agit différemment en fonction du contexte, certainement lié à ses diverses capacités pharmacologiques.

Quel pourrait être l'effet de la metformine sur la matrice extracellulaire ?

Lors de ma thèse, nous n'avons pas étudié l'effet de la metformine sur la production de collagène. Ici aussi l'effet de la metformine diverge dans la littérature. L'étude de Soydas, montre une augmentation de collagène I et III sécrétés par les fibroblastes dans des conditions hyperglycémiques en présence de metformine (Soydas et al. 2018). D'autre part, le traitement de rats diabétiques à la metformine (voie orale), augmente le taux cutané de collagène III, de TIMP2 et diminue la MMP3 (Knas et al. 2015). Une étude préliminaire de Knas et al. montre que le collagène I est plus présent chez les rats diabétiques traités à la metformine et ne diffère pas par rapport aux rats sains (Knas et al. 2013). Cependant, de nombreuses études décrivent un effet néfaste de la metformine sur la production de la matrice extracellulaire. L'ajout de metformine (10 mM) sur des fibroblastes humain dermiques stimulés au TGF β provoque la diminution de collagène I ainsi qu'une diminution de la transcription des gènes codant les collagène I et III ainsi que l'élastine (Jeon et al. 2020). De même, des fibroblastes murins de rein présentent une diminution de la production de collagène après un traitement de 10 mM à la metformine (Lu et al. 2015). Cependant il est difficile de comparer ces études à la nôtre puisque c'est la production de collagène après une stimulation au TGF β qui est analysée. La metformine serait prometteuse pour diminuer la production excessive de matrice

extracellulaire pendant la phase de remodelage qui engendre des cicatrices hypertrophiques de type chéloïdes (Yoon et al. 2011). Ici encore la metformine semble avoir un effet différent en fonction du contexte hyperglycémique ou non.

Le métabolisme des lipides en présence de metformine :

Les études que nous avons menées en complément de la publication principale de cette thèse, nous ont amené à tester la metformine sur l'accumulation des lipides en réponse au glyoxal. En effet, nous avons montré une accumulation importante de vésicules lipidiques par les fibroblastes, en réponse au glyoxal, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de l'AMPk (Guillon et al. 2021). Cette diminution de l'AMPk ne semble pas être responsable du désordre du métabolisme des lipides puisque l'activateur AICAR ne parvient pas à diminuer l'accumulation de LDs. En parallèle, nous avons testé la metformine qui, en plus de sa capacité à capter le glyoxal, est également un activateur de l'AMPk, ce qui en faisait un bon candidat pour empêcher l'accumulation de LDs.

Il s'avère que la metformine seule induit une augmentation du nombre de vésicules lipidiques mais est capable d'inhiber l'accumulation induite par le glyoxal (Figure 51).

Le fait que la metformine seule active la phosphorylation de l'AMPk et provoque une augmentation des LDs confirmerait que l'accumulation observée pour les fibroblastes traités avec du glyoxal n'est pas dépendante de l'AMPk puisque le glyoxal induit un défaut de sa phosphorylation. Ici la metformine permettrait donc d'éviter le désordre du métabolisme des lipides en captant et bloquant l'action du glyoxal. Nous ne pouvons cependant pas exclure que la metformine active des voies indépendantes de l'AMPk qui pourraient limiter les effets du glyoxal. Quelques articles de la littérature traitent du rôle de la metformine sur le métabolisme des lipides. Il a été montré que la metformine pouvait inhiber l'adipogenèse de fibroblastes embryonnaires murins et de pré-adipocytes de façon dépendante ou non de l'AMPk en diminuant l'expression de mTOR (Chen S. C. et al. 2017). En effet, la metformine serait capable de limiter l'accumulation de vésicules lipidiques ainsi que l'expression de gènes lipogéniques (PPAR γ , FASN..), empêchant donc la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes (Moreno-Navarrete et al. 2011). De plus, la metformine limite l'accumulation de LDs induite par l'acide oléique dans des cellules musculaires de souris et diminue la production de triglycérides (Wang C. et al. 2014). Puisque la phosphorylation de l'AMPk est essentielle pour initier l'autophagie, qui est capable d'éliminer les vésicules lipidiques, Kim et al, ont analysé l'effet de la metformine sur des cellules endothéliales (Kim H. S. et al. 2020a). Ils montrent que la metformine serait capable d'éviter l'accumulation de vésicules lipidiques induite par incubation d'acide gras saturés, en activant le flux autophagique de façon dépendante de l'AMPk.

Effet de la metformine sur le réseau vasculaire :

Nous avons montré que la metformine était capable d'améliorer la maturité des vaisseaux sanguins en présence de glyoxal, avec un nombre de péricytes qui est semblable au contrôle. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de montrer une augmentation significative de ces péricytes par rapport aux dermes traités avec du glyoxal (Figure 52).

La littérature rapporte des résultats contradictoires quant au rôle de la metformine sur le réseau vasculaire et l'angiogenèse. Dans une étude récente, les auteurs ont exposé des cellules endothéliales ombilicales à une forte concentration de glucose, avec ou sans metformine. De façon dépendante de l'AMPk, la metformine joue un rôle protecteur sur les cellules endothéliales en empêchant la production importante de ROS induite par la présence de glucose (Tao et al. 2021). Le rôle de la metformine en cancérologie a été beaucoup étudié et certaines études rapportent que la metformine aurait un effet protecteur sur l'endothélium dans l'environnement de la tumeur, avec une augmentation de VEGF, de l'angiogenèse et donc de la progression tumorale (Martin M. J. et al. 2012, Phoenix et al. 2009, Triggle and Ding 2017). D'autre part, Orecchioni et al, montrent une diminution des cellules endothéliales sans modifier le nombre de péricytes dans l'environnement de la tumeur (Orecchioni et al. 2015). La metformine serait responsable d'une diminution de la densité et de la maturation des micro-vaisseaux en réponse à la diminution d'HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 alpha) et de VEGF (Kurelac et al. 2020, Wang J. et al. 2015).

Dallaglio et al, parle d'un effet paradoxal de la metformine au niveau vasculaire, ils suggèrent en effet que la metformine aurait un effet cellule et contexte spécifique (Dallaglio et al. 2014). Ces données discordantes sur le rôle de la metformine dans la biologie des cellules endothéliales pourraient s'expliquer par le fait que l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire, engendre une série de phénomènes, tels que des changements dans les concentrations d'oxygène et la stabilité d'HIF-1 α , ainsi qu'une réduction de la disponibilité des lipides qui sont nécessaires à la prolifération des cellules endothéliales (Kurelac et al. 2020). Des doses faibles de metformine pourraient être à l'origine de l'angiogenèse par une inhibition incomplète du complexe I et, au contraire, des doses élevées conduiraient à un dysfonctionnement sévère du complexe I et à l'inhibition de l'angiogenèse (Kurelac et al. 2020).

La metformine et l'homéostasie de l'épiderme :

Concernant l'effet de la molécule à 0,07 mM, nous avons montré qu'elle ne modifie pas l'épaisseur de l'épiderme et permet d'éviter la diminution d'épaisseur observée en présence de glyoxal. A cette dose, le nombre de kératinocytes Ki67 positifs est similaire aux peaux non traitées, mais ne permet pas d'empêcher la diminution de kératinocytes prolifératifs en présence de glyoxal, bien qu'une légère amélioration soit à souligner. Il faudrait refaire l'expérience pour augmenter le nombre de comptage. Une étude réalisée sur des kératinocytes immortalisés montre que la metformine à 50 mM diminue fortement leur prolifération en inhibant la voie mTOR (Li et al. 2014, Liu Y. et al. 2016). Cette étude est concordante avec nos résultats mais n'est pas effectuée sur des kératinocytes primaires et la dose de metformine est bien supérieure à la nôtre.

En revanche l'expression de K1 est restaurée par la metformine à 0,07 mM en présence de glyoxal et n'induit pas de modifications lorsqu'elle est ajoutée seule. A 0,07 mM, la metformine semble réguler la différenciation épidermique en présence d'une glycation accrue. En revanche à 0,38 mM, la metformine seule induit une diminution de l'épaisseur de l'épiderme par rapport au contrôle, mais elle permet de contrecarrer l'effet du glyoxal (Figure 53). En présence de glyoxal et de metformine à 0,38 mM, le nombre de kératinocytes Ki67 positifs est drastiquement diminué, l'expression de K1 et de la loricrine semblent augmentée de façon plus importante qu'à 0,07 mM. Nous pouvons donc penser que dans cette condition, les kératinocytes perdent leur capacité de prolifération et rentrent donc dans un processus de différenciation important.

D'autres molécules ont été testées pour améliorer la différenciation des kératinocytes en présence de glyoxal dans un modèle similaire à celui que nous avons utilisé telle que l'aminoguanidine (1,5 mM) en préventif ajoutée en même temps que le glyoxal et l'alagébrium (500 µM) en curatif utilisée après le traitement glyoxal. Ces inhibiteurs de la glycation semblent augmenter l'expression de la loricrine et de la filagrine (Cadau et al. 2015). Dans l'étude de Pennacchi et al, l'aminoguanidine est capable de contrecarrer les effets délétères induit par le collagène glyqué sur la différenciation des kératinocytes (Pennacchi et al. 2015).

Migration des kératinocytes en présence de metformine :

La metformine ne semble pas avoir d'effet sur la migration des kératinocytes, à 0,07 et 0,38 mM car aucune modification n'est remarquable par rapport au contrôle. En présence de glyoxal la metformine ne parvient pas à contre carrer le retard de migration induit par le glyoxal. Bien qu'une légère amélioration soit observable à 0,38 mM (Figure 57).

Dans l'étude de Stuermer, les auteurs testent l'effet de différents anti-diabétiques dont la metformine à 1000 mM soit près de 140 fois concentré que nous pour les fibroblastes et 1000 fois plus élevée pour les kératinocytes. Ils montrent un retard de migration des fibroblastes en 2D et dans le modèle de cicatrisation 3D, accompagné d'une baisse importante de l'épaisseur de l'épiderme. La très forte concentration utilisée pourrait expliquer ces observations.

Enfin, afin de compléter l'ensemble des résultats obtenus précédemment, il nous a semblé indispensable de réaliser des modèles *in vivo* dans le but de mettre en évidence la répercussion de l'hyperglycémie chronique sur la cicatrisation de plaies de compression chez la souris Db/Db. Nous avons également testé l'application de pansements contenant de la metformine afin de vérifier son action sur la cicatrisation. L'induction de plaie de compression chez la souris est une expérimentation qui se fait en routine au laboratoire sur des souris diabétiques de type I induites avec de la streptozotocine depuis la mise en place du brevet n°FR1855141 (Modèle pour l'évaluation de traitements pour la cicatrisation des ulcères de pression) (Remoué 2020). Cependant, nous avons dû mettre au point ce protocole pour les souris diabétiques de type II, les Db/Db, pour lesquelles nous n'avons jamais effectué de plaies de compression. Nous avons choisi ici de débrider les plaies avant d'appliquer les différents pansements, afin de permettre une meilleure pénétration de la molécule. La pose de tegaderm sur le pansement permet de maintenir la plaie constamment humide tout au long de la cicatrisation.

L'étude de la cicatrisation chez la souris apporte certains biais dont il faut avoir conscience. Comme expliqué dans l'introduction, la structure de la peau de souris présente des différences avec la peau humaine. L'épaisseur de l'épiderme est beaucoup plus fine à cause d'un nombre plus faible de couche de kératinocytes. D'autre part, chez la souris le muscle sous-cutané participe grandement à la fermeture de la plaie par contraction. Il est possible d'installer des anneaux anti-contraction pour limiter ce phénomène et analyser la fermeture de la plaie qui se fait par migration des kératinocytes. Malgré tout, la souris reste un bon modèle pour étudier la cicatrisation de par sa petite taille et la facilité d'hébergement et de manipulation.

Pourquoi la souris Db/Db ?

Concernant le choix du modèle diabétique, il en existe de nombreux chez la souris. Nous avons choisi un modèle de souris diabétiques de type II qui représente la grande majorité des diabétiques dans le monde (90%). De plus, le diabète de type II mène plus souvent à l'apparition de DFU qui sont plus souvent associés à des complications graves comme la gangrène et l'amputation (Al-Rubeaan et al. 2015, Zhang P. et al. 2017). Le modèle de souris Db/Db reproduit bien le diabète de type II avec une

prise de poids importante mais est basé sur une mutation unique spontanée du récepteur à la leptine. Un des biais de ce modèle est le fait qu'il représente mal les nombreuses mutations qui s'installent chez les patients diabétiques et qui interviennent dans les complications observées.

Il existe seulement quelques cas chez l'homme qui présentent une mutation sur le récepteur de la leptine (Fang et al. 2019).

Bien que nous n'ayons pas vérifié la présence de produits terminaux de glycation chez les souris, il a été montré que les souris Db/Db étaient un des modèles les plus efficaces pour étudier la glycation en lien avec le diabète en comparaison avec des modèles d'induction du diabète par des régimes riches en gras (Guilbaud et al. 2019). En effet les souris Db/ Db présentent une accumulation de CML au niveau du plasma, des reins, du cœur et des poumons et de la peau (Guilbaud et al. 2019, Peppas et al. 2006).

Nous avons récupéré le plasma des souris diabétiques et contrôles en fin d'expérience, il serait intéressant d'analyser le taux d'AGEs et de glyoxal présent.

Pour la première fois dans le laboratoire, nous avons effectué une plaie de compression sur ces souris diabétiques, ce qui nous a permis de reproduire le retard de cicatrisation observée chez l'homme. Cependant nous avons noté une augmentation de la taille de la plaie après le débridement chez les souris Db/Db, c'est un phénomène que nous avons déjà observé dans le laboratoire chez des souris T1D induites par la streptozotocine. Nous pouvons penser qu'il y a un certain relâchement cutané avant de débiter la cicatrisation qui pourrait être lié à une diminution de la contraction qui participe grandement à la cicatrisation chez la souris contrôle.

Effet du pansement metformine Urgo :

Pour la première fois, nous avons testé l'effet de la metformine sur des plaies de compression chez des souris diabétiques. Nos résultats n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence une amélioration de la cicatrisation des souris diabétiques. De par ses capacités anti-glycantes, la metformine semblait être un bon candidat. En effet, la glycation est en grande majorité responsable du retard de cicatrisation chez les diabétiques. Le blocage de RAGE par une injection intrapéritonéale ou topique de sRAGE permet de restaurer la cicatrisation chez des souris diabétiques après une plaie d'excision (Goova et al. 2001). La glycation augmente avec l'âge et l'application topique de metformine sur des plaies d'excision chez des rats âgés permet d'augmenter la cicatrisation et est décrit comme un agent prometteur pour améliorer la fermeture de plaies (Zhao et al. 2017). De façon étonnante, nous montrons un retard de cicatrisation pour les souris contrôles ou diabétiques traitées

avec la metformine dans les premiers jours de fermeture, retard qui est rattrapé ensuite. Notre expérience n'a cependant été réalisée qu'une seule fois, et avec uniquement 5 souris contrôles pour le placebo et 5 souris traitées avec la metformine. Il faudrait refaire l'expérience sur plus de souris pour confirmer ces observations. Pour le moment, ces résultats nous laissent penser que la metformine serait néfaste pour les phases précoces de fermeture. Des études complémentaires seraient nécessaires pour étudier le rôle de la metformine sur la première phase de cicatrisation, l'inflammation, qui est nécessaire pour l'induction de la cicatrisation. En effet, la metformine pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire qui retarderait la phase de fermeture (Kar et al. 2021, Kim H. S. et al. 2020a). De plus, le pansement de metformine utilisé est à 7 %, et nous avons vu l'importance de la concentration de la metformine sur différents paramètres. Il serait donc intéressant d'utiliser un pansement moins concentré en metformine pour limiter ses effets potentiellement toxiques en début de cicatrisation.

Cependant, en tant que premier traitement prescrit aux diabétiques de type II, une étude a analysé le pourcentage d'amputation chez des patients traités avec ou sans metformine. Il apparaît que la metformine diminue de 30 % le risque d'amputation (Hippisley-Cox and Coupland 2016). De nombreuses études se sont intéressées à l'efficacité de la metformine pour accélérer, améliorer la cicatrisation des diabétiques. Han et al, ont montré que 2 semaines de traitements de metformine avant la création d'une plaie d'excision participaient à leur fermeture plus rapide, avec une augmentation de l'angiogenèse et du taux de précurseur de cellules endothéliales (Han X. et al. 2017). D'autre part, une étude a été menée sur des plaies d'excision réalisées sur des rats diabétiques induits par streptozotocine traitées avec de la metformine (Lee S. H. et al. 2006). Lee et al, utilisent un gel de PGLA (poly-D-L-lactide-glycolide) contenant la metformine qui se diffuse lentement pendant 22 jours (200µg/ml au début et 19µg/ml au bout de 8 jours) qui permet d'accélérer la ré-épithélialisation et la fermeture de la plaie.

La metformine a même montré des avantages pour améliorer la cicatrisation chez des rat sains de façon dépendante de l'AMPk (Qing et al. 2019). En application topique après une plaie d'excision, la cicatrisation apparaît accélérée avec une augmentation de l'angiogenèse et de la transition des macrophages en phénotype M2. La transition des macrophages en M2 permet de stopper la phase inflammatoire pour permettre l'entrée en phase de prolifération et donc éviter l'installation de plaies chroniques. Une autre étude récente a testé l'effet de la metformine sur des plaies d'excision chez des rats sains. Ils ont montré que l'application topique de metformine induisait une diminution de l'expression du TGFβ, de l'αSMA ainsi que du collagène I et III (Chogan et al. 2020). Ces mécanismes permettent d'atténuer l'apparition d'un tissu cicatriciel fibreux mais induisent un retard de la

cicatrisation. Pour pallier cela, ils ont développé un support innovant constitué de 3 couches (polycaprolactone –chitosan-polyvinyl alcohol) intégrant la metformine. La fermeture des plaies est accélérée dans les phases précoces de cicatrisation tout en empêchant l'apparition de cicatrices fibreuses lors de la phase de remodelage de la matrice.

D'après ces études nous pouvons penser que la façon d'appliquer et la libération de la metformine sont des points cruciaux à définir pour accélérer la fermeture de plaie. De plus, son action différente sur les fibroblastes, cellules endothéliales et kératinocytes nous encourage à penser que la modulation de sa concentration au fil du temps semble être un point essentiel pour améliorer la cicatrisation des diabétiques.

CONCLUSION

GENERALE

Ces travaux de thèse ont permis de mettre au point un modèle robuste pour étudier l'effet de la glycation en 2D et en 3D sur les cellules cutanées et mieux comprendre les défauts de cicatrisation.

En effet, le glyoxal, retrouvé en grande quantité dans le plasma des patients diabétiques, pourrait participer activement au retard de cicatrisation en perturbant des étapes clés comme la prolifération, la migration ou encore la production de matrice extracellulaire. Nous avons montré pour la première fois une perturbation du métabolisme des lipides en réponse à une glycation accrue dans les fibroblastes dermiques. Complètement perturbé, le phénotype des fibroblastes semble tendre vers un profil lipogénique au détriment d'une migration et d'une prolifération active qui est nécessaire lors de la cicatrisation.

Nos modèles 3D montrent un défaut dans la maturité et la stabilité des vaisseaux sanguins en réponse au glyoxal qui pourrait participer à l'installation de DFU. Enfin l'homéostasie de l'épiderme est bouleversée avec la différenciation des kératinocytes qui est altérée en présence de glyoxal. Dans un contexte de cicatrisation la migration des kératinocytes est fortement diminuée.

Les différents tests effectués *in vitro* avec de la metformine semblent encourageants à différents niveaux comme la régulation de la différenciation des kératinocytes et du métabolisme des lipides. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que le glyoxal est un agent glyquant parmi le processus complexe qu'est la glycation dans lequel de nombreux autres acteurs sont importants. Notre modèle regarde de façon précise l'action du glyoxal à une certaine concentration au niveau cutané, mais la metformine dans un organisme complet peut agir à bien d'autres niveaux de la glycation.

Bien que l'essai du pansement avec metformine sur une plaie de compression chez la souris diabétique n'ait pas donné de résultats positifs, la metformine reste prometteuse pour améliorer la cicatrisation des diabétiques. En effet, ses multiples actions pharmacologiques complexes méritent d'être étudiées de façon plus détaillée au niveau des cellules de la peau afin d'optimiser son action en fonction des phases de cicatrisation.

Les différents modèles et expériences réalisés durant ce projet de thèse reproduisent de nombreuses caractéristiques de la peau des diabétiques et peuvent dans ce sens, être utilisés pour étudier d'autres molécules thérapeutiques innovantes.

ANNEXES

Revue en cours de révision dans « European Journal of Dermatology » qui explique le rôle de la pollution atmosphérique dans l'apparition de complications cutanées médiée par le récepteur AhR. Le retard de cicatrisation lié au diabète y est abordé.

Title: The Aryl hydrocarbon receptor pathway plays a central role in the cutaneous response to pollutants

Short title: Skin response to pollutants and the AhR

Cécile Guillon^{1,2,3}, Meriam Meziani², Soraya Abdelli², Dominique Sigaudou Roussel^{1,2},
Christelle Bonod^{1,2}, and Audrey Nosbaum^{4,5}

Author affiliations:

¹ CNRS UMR5305 LBTI, 7 passage du vercors 69367 Lyon cedex 7 France

² University Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69100
Villeurbanne, France

³ URGO Research Innovation and Development, 42 Rue de Longvic, 21300 Chenôve, France

⁴ CIRI (International Center for Infectiology Research) INSERM U1111, Ecole Normale

Supérieure de Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, 21 avenue Tony
Garnier, 69007 Lyon, France

⁵ Allergy and Clinical Immunology Department, Lyon Sud University Hospital, 165 chemin
Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite cedex, France

Corresponding author: Cécile Guillon, cecile.guillon@ibcp.fr, +33 6 14 63 95 18.

Word count: 4475

Number of figures: 2

Number of references: 55

Abstract: 169 words (250 max)

Short- and long-term exposure to atmospheric pollution has significant health effects. The skin is the organ directly in contact with pollutants and is responsible for protection of the organism. Particulate matter (PM) such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are the basis of certain pulmonary as well as dermatological complications. Pollution exacerbates certain illnesses such as atopic dermatitis and cancer, and it may also participate in delaying wound healing and in the occurrence of chronic ailments such as diabetes. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) transcription factor at the core of these responses to pollutants is expressed by all cells of the skin. The AhR is subject to tight regulation that depends on its ligand. Pollutants act in a deleterious manner via the AhR on the behavior of keratinocytes as well as fibroblasts. Natural ligands, on the other hand, allow the noxious effects of pollution to be countered. Modulation of AhR appears to be an excellent therapeutic target to improve or stop the cutaneous problems linked to pollution.

Keywords: atopic dermatitis, pollution, skin, wound healing

Introduction

It is nowadays recognized that pollution is a major public health problem caused by an increase in the prevalence of numerous cardiovascular, pulmonary, and dermatological illnesses (Dabass et al. 2016, Guan et al. 2016). Atmospheric pollution is due to air contamination by different natural gases derived from emissions by the vegetation as well as by soil erosion and of anthropomorphic origin produced by human activities. These pollutants are classified into two distinct families: primary pollutants and secondary pollutants, the latter undergoing modification by the primary pollutants. Atmospheric pollution comprises gases such as carbon dioxide and sulfur dioxide, as well as particulate matter (PM) emitted by various human activities. FPs contain heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These components are produced by road and air traffic as well as by cigarette smoke (Lecas et al. 2016). Dioxins such as TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxin) are derived mainly from wood stoves and forest fires; they are part of the family of PAHs. Exposure to pollutants particularly affects the skin, which is an organ in direct contact with the pollution. For example, toxic and cancerogenic dioxins readily penetrate the skin due to their lipophilic properties (Krutmann et al. 2014). On the other hand, pollutants reach the lungs by respiration, and their passage in the blood flow can affect other organs such as the skin (Krutmann et al. 2014). A link between pollution and chronic cutaneous inflammatory diseases such as atopic dermatitis (AD) or impaired wound healing has recently been reported (Kim K. E. et al. 2016). Similarly, it has been shown that long-term exposure to pollutants is associated with an enhanced incidence of lung as well as skin cancers (Pope et al. 2002). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) transcription factor, which is expressed in all cutaneous cells, is central to all of these pathophysiological processes (Esser et al. 2013, Furue et al. 2014). The AhR signaling pathway is induced by PM in particular, which have a high affinity for this receptor (Esser et al. 2013).

In light of the increasing concerns arising from pollution, there is ample merit in gaining a better understanding of the consequences of pollution at the level of the skin in response to the AhR. We here document the effects and the interactions that occur in skin in response to pollution and that involve the AhR.

1. Biology of the AhR

The skin is the largest organ of the human body. It protects the organism from exterior insults, and it plays a role as a sensor of the environment. This is why the cutaneous homeostasis and the integrity of the skin need to be tightly regulated.

The AhR is expressed in all of the organs that act as barriers, such as liver, lungs, intestine, and skin (Esser et al. 2013). The AhR is a helix-loop-helix domain transcription factor that responds to endogenous and exogenous signals, and it is, therefore, also able to modulate these effects. It is found in the cytoplasm of all cutaneous cells, both in the epidermis and the dermis, and it is essential for homeostasis of the skin (Esser et al. 2013).

The AhR is activated in the cytoplasm after binding of its ligand, which allows induction of the signal for its translocation to the nucleus. Thanks to chaperone proteins, the AhR is directed to the nuclear compartment where it heterodimerizes with the molecule ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). This protein complex is able to activate the transcription of certain genes, by binding to their XRE (Xenobiotic Response Element) promoter regions (**Figure 1**). On the other hand, the AhR activates the expression of its own AhRR (Aryl hydrocarbon Receptor Repressor) repressor, thereby ensuring a negative feedback loop. AhRR binds to ARNT in the nucleus and prevents the binding and the action of the AhR/ARNT complex (Esser et al. 2013).

1.1. Nature of the AhR ligands

Numerous ligands are capable of activating the AhR pathway. They are classified into three groups according to their nature.

1.1.1. Endogenous ligands

UVB radiation is capable of generating dimers of tryptophan, called FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole), which can bind to the AhR (Fritsche et al. 2007). These are referred to as endogenous ligands. Activation of the AhR pathway by FICZ promotes pigmentation and hence improves protection of the DNA. Due to this, the AhR is sensitive to the environment and it acts as a sensor of UV radiation (Esser et al. 2013). When exposed to UVB radiation, mice lacking the AhR exhibit less cutaneous pigmentation than wild-type mice (Jux et al. 2011).

1.1.2. Natural exogenous ligands

The AhR can bind with high affinity to ligands in food. Phytochemical antioxidants such as flavonoids, which are responsible for the color of fruits and plants, or glucosinolates that give rise to the bitterness of mustard and cauliflower, are exogenous natural ligands of the AhR. Their binding induces translocation of the nuclear factor Nrf2 to the nucleus, allowing expression of antioxidant enzymes such as Nqo1 (Quinone oxidoreductase) and oxygenase-1 (HO-1) (Furue et al. 2017, Haarmann-Stemmann et al. 2012, Uchi et al. 2017) that protect cells from damage generated by ROS. A recent study has shown that these exogenous natural ligands exert a barrier function by regulating transepidermal water loss (Haas et al. 2016).

1.1.3. Synthetic exogenous ligands

Lastly, particulates from pollution, such as PAHs or TCDD, are synthetic exogenous ligands with very high affinities. Their binding to the AhR promotes the generation of reactive oxygen species, which are known to cause DNA damage. Pollution gives rise to an increase in

inflammation and it exacerbates cutaneous inflammatory diseases such as atopic dermatitis as well as psoriasis (Kim H. O. et al. 2014).

The nature of the ligand determines the AhR response. In humans, the specificity of the binding of the AhR depends on a valine residue situated at position 381. In case of substitution by an alanine, the specificity increases, unlike substitution by an asparagine, which leads to abolition of the binding.

2. Consequences of the activation of the AhR at the cutaneous level

The epidermis is the most superficial layer of the skin. It is mainly composed of keratinocytes that become differentiated from the basal layer to the corneal layer. There are also melanocytes, which are responsible for pigmentation of the skin. The epidermis plays an essential role in the barrier function. It is sensitive and in direct contact with environmental particulates, particularly those found in pollution. The underlying dermis is also highly exposed. Park *et al.* exposed dermal fibroblasts to particulate pollution for 24 h, and they identified 1977 genes for which the expression was altered. We report here the consequences of this substantial transcriptional modification on certain cutaneous functionalities.

2.1. Loss of the barrier function of the skin

It has been shown that reconstructed human epidermis exposed long-term to tobacco smoke undergoes histological changes. The spinous and granular layers were no longer visible, while the thickness of the corneal layer was increased (Lecas et al. 2016). Another experiment performed on cultured keratinocytes reported an increase in the differentiation of the cells in response to TCDD (Kennedy et al. 2013). The development of the corneal layer at the expense of the granular and spinous layers can be explained by acceleration of the differentiation of the keratinocytes (Lecas et al. 2016). By contrast, the ligand FICZ is capable of decreasing the thickness of the epidermis and of improving the transepidermal loss of water in mice with

atopic dermatitis (Kiyomatsu-Oda et al. 2018). On the other hand, mice that specifically lack the AhR in keratinocytes (K5AhR-KO) exhibited greater transepidermal water loss than the wild type mice (Carvajal-Gonzalez et al. 2009). The AhR also targets the expression of filaggrin, *FLG*, which is essential for the barrier function of the skin by participation in the formation of the corneal layer. Mice lacking the AhR (AhR KO) express lower levels of genes associated with the barrier function (Haas et al. 2016). The expression of filaggrin, occludin, and involucrin increase following mechanical stress in healthy mice, but this increased expression is not seen in mice lacking the AhR. The loss of AhR appears to result in less cutaneous resistance to mechanical stress. Moreover, the expression of genes coding for extracellular matrix anchoring proteins (collagens IV and VII) and the expression of genes coding for proteins involved in cell-cell junctions (corneodesmosin, desmocollin-1, and desmoglein-1) were found to be decreased in a reconstructed epidermis model after exposure to cigarette smoke (Lecas et al. 2016). This led to a decrease in the efficacy of the epidermal barrier by the loss of cell cohesion. The AhR is, therefore, subject to very tight regulation at the level of the epidermis. Depending on the ligand and the context, the AhR can maintain or change the homeostasis of the epidermis.

2.2. Modulation of the proliferative and the migratory capacities of cutaneous cells

The AhR also participates in the activation of growth factors such as EGF (epidermal growth factor) involved in cell differentiation or proliferation. AhR KO mice exhibit faster dorsal wound healing than normal mice, In this model, the re-epithelialization is faster due to faster keratinocyte migration. There are more fibroblasts, and the collagen level is higher at the level of the granulation tissue. Fibroblasts secrete high levels of active TGF- β (transforming growth factor), which participates in enhancing wound healing (Carvajal-Gonzalez et al. 2009). This study shows that decreasing in AhR activity could be a new potential way to treat chronic lesions. By contrast, activation of the AhR by PAHs results in a decrease in proliferation as

well as entry into apoptosis of keratinocytes and fibroblasts, which could participate in impaired healing (Qiao et al. 2017).

2.3. Modulation of MMPs

Matrix metalloproteinases (MMP) induce changes in the quantity and the structure of collagens. A model of reconstructed human skin, and *Hairless* *-/-* mice, exposed to tobacco smoke were shown to exhibit a significant increase in MMP-1 and MMP-3 (Lecas et al. 2016). These proteins are responsible for the degradation of type I, II, and III collagen and type IV and V collagen, respectively. On the other hand, the expression of inhibitors of MMPs, TIMP-1 and TIMP-3, is not altered in cutaneous tissue. Tobacco smoke and pollutants alter the balance between the biosynthesis and the degradation of collagen. The balance tends toward degradation of collagen in favor of the induction of MMPs.

It was recently shown that the active form of TGF- β is an essential factor in homeostasis of the epidermis and growth of the dermis. Tobacco smoke, as well as PAHs, induce the non-functional form of TGF- β , thereby leading to a reduction in the biosynthesis of extracellular matrix proteins (Yin et al. 2003). Similarly, tobacco smoke can result in oxidative stress by the induction of reactive oxygen species (ROS) in fibroblasts. ROS can then induce damage at the level of the DNA and stimulate the production of MMPs. The AhR is a transcription factor activated in response to pollutants, thereby giving rise to changes at the level of the skin. The activation of these transcription factors thereby leads to oxidative biological responses such as the formation of ROS (Lecas et al. 2016) and it can also directly activate the production of MMP-1 and MMP-3, which are responsible for the degradation of collagen and elastin fibers (Ono et al. 2013).

The AhR pathway activated by the components of tobacco smoke and pollutants plays a central role in the process of extrinsic aging as a result of pronounced alterations at the level of the dermis.

2.4. Loss of the viscoelasticity

In vivo studies in mice and of cultured fibroblasts that have been exposed to tobacco smoke or to atmospheric pollutants have revealed changes in the biosynthesis of type III, IV, and VII collagens as well as elastin fibers (Kim K. E. et al. 2016). These changes translate into a significant decrease in the matrix components in the dermis and neosynthesis of abnormal elastin (Vierkötter et al. 2010). Such dysmorphic elastic fibers can lead to elastosis or changes that lead to a loss of the viscoelasticity of the skin. Thus, these alterations appear to be responsible for the formation of wrinkles and hence early extrinsic aging.

On the other hand, the damaged skin of mice exposed to tobacco smoke exhibits a higher level of elastase than non-exposed mice. The elastic fibers are then degraded more, thereby perturbing the plasticity of the wound (Dhall et al. 2016).

2.5. Hyperpigmentation

Recent studies have indicated that photoprotection by tanning can occur in the absence of UV radiation. Treatment of melanocytes with oligonucleotides such as the 7-mer pApGpTpApTpGpA is able to induce tyrosinase activity and stimulate the synthesis of melanin in the absence of UV light (Eller and Gilchrest 2000). Other studies have shown that ligands of the AhR, such as dioxin or PAHs, induce the proliferation of melanocytes (Furue et al. 2014). This mechanism can, therefore, provide scientific proof of the association between spots of pigmentation and exposure to FPs. Similarly, the exposure of primary melanocytes cultures to atmospheric particulates induces transcriptional expression of genes involved in the formation of skin spots (Krutmann et al. 2014). Lastly, activation of the AhR pathway in melanocytes in

response to pollutants induces cell proliferation and high levels of melanin synthesis, leading to the appearance of pigment spots on the skin.

2.6. Inflammation

The AhR does not result in specific immune responses, due to the fact that the AhR is present in several types of immune cells and because the response differs depending on the bound ligand. The AhR can also activate the expression of pro-inflammatory or immunosuppressive cytokines such as interleukin (IL-) 1β (IL- 1β) or TGF- β in keratinocytes. It has been shown that the AhR increases the expression of a pro-inflammatory cytokine, IL-8, in keratinocytes in a manner dependent on a response to oxidative stress induced by benzo[a]pyrene (BaP) in cigarette smoke (Tsuji et al. 2011). Exposure of a reconstructed epidermis to cigarette smoke induced a high degree of inflammation of the skin by the expression of IL- 1α , IL-8, and IL-18 (Lecas et al. 2016). Keratinocytes treated with PAHs exhibited an increase in IL- 1α and IL- 1β , which are interleukins that also perturb the dermis. Co-culture of these keratinocytes with fibroblasts revealed expression of MMP1 and COX-2 in dermal cells (Kim M. et al. 2019). In 2005, Masafumi Tauchi and their team generated transgenic mice that constitutively express the AhR in keratinocytes, under the control of the K promoter (Tauchi et al. 2005). The receptor is active in the complete absence of ligands, the aim, therefore, being to activate the transcription of target genes without a chemical entity (AhR ligands). These mice exhibited cutaneous inflammatory lesions and pronounced itching, and molecular analysis by microarrays revealed overexpression of pro-inflammatory genes. Non-immune cells are able to produce TNF alpha and IL-8 after activation of the Toll-like receptor 2 (TLR-2) (Hou X. X. et al. 2019). Hou *et al.* showed that TCDD increases the secretion of TNF alpha and IL-8 after induction of TLR-2. Suppression of the AhR by KO blocks the production of these pro-inflammatory cytokines (Hou X. X. et al. 2019).

The AhR hence plays a central role in the regulation of cutaneous inflammation, and its activation results in skin lesions.

3. Link with cutaneous pathologies

3.1. Atopic dermatitis

Activation of the AhR by pollutants appears to be correlated with chronic inflammatory diseases such as atopic dermatitis (AD). AD is a skin disease that occurs mainly in childhood. It results in several clinical signs such as itching, erythema, and chronic xerosis. At the molecular level, the barrier function of the skin is altered due to, in certain cases, a loss of function of the gene coding for filaggrin. It was not until very recently that atmospheric particulates have been taken into account in the development and the exacerbation of the symptoms of AD. There is a correlation between the severity of AD in children and outdoor as well as indoor pollution such as particles present in paint (Ahn 2014). On the other hand, the expression of the AhR and ARNT are increased in the lesions of patients with AD relative to healthy skin (Kim H. O. et al. 2014).

A recent study used an AhR-CA mouse model that mimics AD. The keratinocytes of these mice constitutively express the AhR. This cytoplasmic receptor is, therefore, a key factor in AD (Hidaka et al. 2017).

In the presence of PAHs, AhR-CA mice overexpress the gene Artemin (*Artn*), which is a target of the AhR transcription factor, in the keratinocytes. The artemin protein (ARTN) is upregulated in the keratinocytes and is responsible for hyperinnervation and an increase in pruritis. The skin is, therefore, hypersensitive and the itchiness is exacerbated, in the same study, it was shown that the AhR is activated in DA lesions in humans (Hidaka et al. 2017). Moreover, it has been shown that *in vitro* exposure of human keratinocytes to pollutants leads to increased expression of ARTN (Hidaka et al. 2017). Hu *et al.* have shown that the level of AhR in the serum of AD patients is higher than that of healthy individuals. The expression of

AhR mRNA is positively correlated with the severity of the disease as well as to the level of IL-6 present in the serum of AD patients (Hu Y. Q. et al. 2020).

3.2. Impaired wound healing

One of the main complications of diabetic patients is a lack of substantial wound healing, resulting in acute chronic lesions. It has been shown that smoking increases the risk of foot amputation in diabetic patients (Liu M. et al. 2018). Cigarette smoke is a direct activator of the AhR pathway as it contains more than 3800 components, including PAH (Ono et al. 2013). A number of clinical and experimental studies have shown the impact of cigarette smoke on chronic wound healing (McDaniel and Browning 2014, Sorensen et al. 2010, Xia et al. 2019). Sorensen *et al.* made cutaneous excisions of smokers and non-smokers, and analysis of the lesions revealed perturbed inflammation and a decrease in the proliferation of fibroblasts that could participate in a delay of wound healing (Sorensen et al. 2010). Michaud *et al.* indicated that extracts of cigarette smoke inhibited vascular endothelial growth factor (VEGF), which perturbed the migration and the formation of capillaries formed by HUVECs (human umbilical vascular endothelial cells) (37). These studies suggest that for diabetic patients, evaluation of tobacco dependency and stopping smoking are key to improving chronic wound healing. Indeed, cessation of smoking of more than three weeks preoperatively reduced impaired wound healing after surgery (Kuri et al. 2005).

The cutaneous vascular density and blood flow are decreased with aging or pathologies such as diabetes, or in the presence of chronic lesions, thereby increasing the expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in tissues, which allows expression of angiogenic genes. Several studies have shown that the loss of HIF-1 α subunits in the endothelium leads to vascular anomalies. Under limiting oxygen concentrations, HIF-1 α is stabilized, which allows it to be translocated to the nucleus where it binds to ARNT, like AhR. The HIF-1 α :ARNT heterodimer binds to hypoxia response elements (HRE) in target genes inducible by hypoxia (Kewley et al.

2004, Majmundar et al. 2010). It has been shown that in the presence of pollutants such as PCB126, hypoxia significantly interferes with the functions of the AhR, which could negatively affect CYP1A1 mRNA expression, resulting in a lower protein level and hence less enzymatic activity (Vorrink et al. 2014). This negative interaction between the AhR and hypoxia signaling pathways appears to depend at least in part on the availability of ARNT. Furthermore, it has been shown that ARNT KO mice exhibit vascular and angiogenic impairments that can contribute to impaired migration of immune cells during the first stages of wound healing (Han Y. et al. 2014). This negative interaction has been observed in liver (Fleming et al. 2009, Nukaya et al. 2010) and, unlike the study of Pollenz *et al.* on the induction of the AhR by TCDD, does not indicate competition for ARNT under hypoxic conditions (Pollenz et al. 1999).

Thus, the presence of tissue hypoxia can significantly perturb the normal transcriptional response of the AhR after exposure to PCB 126, which could ultimately affect cell metabolism and contribute to the development of chronic lesions as a result of major cutaneous vascular defects. Moreover, cigarette smoke has adverse effects on vascular biology, inducing endothelial dysfunction and arterial stiffness (Celermajer et al. 1996). Cigarette smoke causes defective angiogenesis that can be linked to a lack of VEGF (Michaud et al. 2006), a main pro-angiogenic factor for which the expression depends on HIF-1 α (Ichihara et al. 2009, Ichihara et al. 2007). More extensive studies focused on skin and impaired wound healing in this toxic context of pollutants are necessary to improve the understanding of these multiple interactions.

3.3. Cancer

Long-term exposure to indoor and outdoor air pollution is associated with an increased incidence of cancer, particularly lung cancer (Pope et al. 2002). PAHs exhibit cancerogenic properties by the formation of DNA adducts following the activation of cytochrome P450, which leads to the formation of diol-epoxide metabolites (Szeliga and Dipple 1998).

Matsumoto and his team have shown that repeated topical application of PAHs on the back of AhR^{+/+} mice led to the formation of epidermoid carcinomas after 29 weeks, unlike AhR^{-/-} mice (Matsumoto et al. 2007). The formation of cutaneous tumors in the AhR^{+/+} mice was mediated by the expression of CYP1A1, induced by extracts of air pollution particles (Matsumoto et al. 2007). The AhR plays a major role in the cutaneous carcinogenesis induced by PAHs. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) results in invasive cancers by the formation of metastasis, and it is known that Slug is a key transcription factor in the EMT. It inhibits the proteins required for cell-cell interaction, such as E-cadherins, and it allows cell migration. There are several XRE regions in the Slug gene promoter, to which the AhR can bind. Inhibition of the AhR leads to suppression of the expression of Slug (Ikuta and Kawajiri 2006). Prolonged exposure to different pollutants can lead to certain cancers becoming more aggressive due to an increased metastatic potential.

4. Conclusion/perspectives

The AhR is subjected to extremely tight regulation. Ligands of a synthetic exogenous nature, such as pollutants, can disrupt this balance. In a context of pollution, the AhR promotes the generation of ROS, which cause DNA mutations. Reactive oxygen species promote the secretion of pro-inflammatory cytokines and decrease the expression of filaggrin by the NF κ B and AP1 pathways. The proliferation of melanocytes and melanogenesis are enhanced in the presence of pollutants. Lastly, at the level of the dermis, activation of the AhR by synthetic exogenous ligands generates ROS and the activity of metalloproteases is increased. Fibroblasts synthesize an abnormal form of elastin and an inactive form of TGF- β . Activation of the AhR by pollutants also leads to the formation of cutaneous tumors and it can promote the formation of metastasis.

The structure and the composition of the skin are modified in the presence of pollutants. The extracellular matrix is degraded, inflammation is increased, and pigmentation is stimulated. These changes are directly linked with early cutaneous aging, serious forms of AD, delayed wound healing, and the formation of cancer (**Figure 2**). Hidaka and their team have shown that the *Artemin* gene is a target of the AhR, inducing substantial pruritis in the presence of PAH in mice. Inhibition of *Artemin* reduces the symptoms of AD (Hidaka et al. 2017). In humans, this gene is found in AD lesions, Strong activation of *Artemin* in response to pollutants is, therefore, possible. *Artemin* could also be a therapeutic target in AD. Interestingly, Van Den Bogaard *et al.* were the first to show a beneficial therapeutic effect of activation of the AhR on the barrier function of the skin by coal tar. The expression of filaggrin was restored in the keratinocytes of the reconstructed epidermis of AD patients with a heterozygous mutation (FLG^{-/+}) (van den Bogaard et al. 2013). In 2020, Furue, assigned the beneficial effects of natural or medicinal ligands of the AhR to anti-oxidant properties via activation of NRF2 in AD patients (Furue 2020). The AhR/NRF2 pathway is, therefore, a potential therapeutic target for AD patients.

Food items can provide flavonoïds that can compete with pollutants by exerting an anti-oxidative role (Furue et al. 2014). Haas and their team have shown that suppression of the AhR ligands in the food of mice decreased the barrier function similar to mice lacking the AhR. After being fed a diet enriched in I3C (indole-3-carbinol), these mice fully recovered their barrier function (Haas et al. 2016). Recently, studies have shown that a flavonoid, eupapholin, can attenuate the oxidative stress and inflammation induced in cultured keratinocytes by fine particulates (Lin et al. 2016). Eupapholin appears to reduce the generation of ROS and the activity of the MAP Kinase pathway, which is the basis for NFκB activation (Lee C. W. et al. 2016a). Other than environmental or personal actions to reduce pollutants, one can imagine

counteracting the effects of pollution by a specific diet that results in high levels of natural exogenous ligands of the AhR to limit the action of pollutants.

References:

1. Dabass A, *et al.* Using spatio-temporal modeling for exposure assessment in an investigation of fine particulate air pollution and cardiovascular mortality. *Environ Res* 2016; 151:564-572.
2. Guan WJ, Zheng XY, Chung KF, & Zhong NS Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China: time for urgent action. *Lancet* 2016; 388:1939-1951.
3. Lecas S, *et al.* In vitro model adapted to the study of skin ageing induced by air pollution. *Toxicol Lett* 2016; 259:60-68.
4. Krutmann J, *et al.* Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *J Dermatol Sci* 2014; 76:163-168.
5. Kim KE, Cho D, & Park HJ Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci* 2016; 152:126-134.
6. Pope CA, 3rd, *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287:1132-1141.
7. Esser C, Bargon I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T, & Krutmann J Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin Immunopathol* 2013; 35:677-691.
8. Furue M, Takahara M, Nakahara T, & Uchi H Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res* 2014; 306:769-779.
9. Fritsche E, *et al.* Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:8851-8856.
10. Jux B, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J Invest Dermatol* 2011; 131:203-210.
11. Haarmann-Stemmann T, Abel J, Fritsche E, & Krutmann J The AhR-Nrf2 pathway in keratinocytes: on the road to chemoprevention? *J Invest Dermatol* 2012; 132:7-9.
12. Furue M, *et al.* Antioxidants for Healthy Skin: The Emerging Role of Aryl Hydrocarbon Receptors and Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2. *Nutrients* 2017; 9.
13. Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Mitoma C, & Furue M Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2017; 85:36-43.
14. Haas K, *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Is Essential for Murine Skin Barrier Integrity. *J Invest Dermatol* 2016; 136:2260-2269.
15. Kim HO, Kim JH, Chung BY, Choi MG, & Park CW Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 2014; 23:278-281.

16. Kennedy LH, *et al.* 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation. *Toxicol Sci* 2013; 132:235-249.
17. Kiyomatsu-Oda M, Uchi H, Morino-Koga S, & Furue M Protective role of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. *J Dermatol Sci* 2018; 90:284-294.
18. Carvajal-Gonzalez JM, *et al.* Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGFbeta. *J Cell Sci* 2009; 122:1823-1833.
19. Qiao Y, *et al.* Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 488:445-452.
20. Yin L, Morita A, & Tsuji T Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF-beta. *Exp Dermatol* 2003; 12 Suppl 2:51-56.
21. Ono Y, *et al.* Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp Dermatol* 2013; 22:349-353.
22. Vierkötter A, *et al.* Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology* 2010; 130:2719-2726.
23. Dhall S, *et al.* Tobacco toxins deposited on surfaces (third hand smoke) impair wound healing. *Clin Sci (Lond)* 2016; 130:1269-1284.
24. Eller MS & Gilchrest BA Tanning as part of the eukaryotic SOS response. *Pigment Cell Res* 2000; 13 Suppl 8:94-97.
25. Tsuji G, *et al.* An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J Dermatol Sci* 2011; 62:42-49.
26. Kim M, *et al.* Particulate matter induces pro-inflammatory cytokines via phosphorylation of p38 MAPK possibly leading to dermal inflammaging. *Exp Dermatol* 2019; 28:809-815.
27. Tauchi M, *et al.* Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol Cell Biol* 2005; 25:9360-9368.
28. Hou XX, *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates the Expression of TNF-alpha and IL-8 in Human Sebocytes via the MyD88-p65NF-kappaB/p38MAPK Signaling Pathways. *J Innate Immun* 2019; 11:41-51.
29. Ahn K The role of air pollutants in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:993-999; discussion 1000.
30. Hidaka T, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol* 2017; 18:64-73.

31. Hu YQ, Liu P, Mu ZL, & Zhang JZ Aryl hydrocarbon receptor expression in serum, peripheral blood mononuclear cells, and skin lesions of patients with atopic dermatitis and its correlation with disease severity. *Chin Med J (Engl)* 2020; 133:148-153.
32. Liu M, Zhang W, Yan Z, & Yuan X Smoking increases the risk of diabetic foot amputation: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 2018; 15:1680-1685.
33. McDaniel JC & Browning KK Smoking, chronic wound healing, and implications for evidence-based practice. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2014; 41:415-423; quiz E411-412.
34. Xia N, Morteza A, Yang F, Cao H, & Wang A Review of the role of cigarette smoking in diabetic foot. *J Diabetes Investig* 2019; 10:202-215.
35. Sorensen LT, *et al.* Smoking attenuates wound inflammation and proliferation while smoking cessation restores inflammation but not proliferation. *Wound Repair Regen* 2010; 18:186-192.
36. Kuri M, Nakagawa M, Tanaka H, Hasuo S, & Kishi Y Determination of the duration of preoperative smoking cessation to improve wound healing after head and neck surgery. *Anesthesiology* 2005; 102:892-896.
37. Kewley RJ, Whitelaw ML, & Chapman-Smith A The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:189-204.
38. Majmundar AJ, Wong WJ, & Simon MC Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010; 40:294-309.
39. Vorrink SU, Severson PL, Kulak MV, Futscher BW, & Domann FE Hypoxia perturbs aryl hydrocarbon receptor signaling and CYP1A1 expression induced by PCB 126 in human skin and liver-derived cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 274:408-416.
40. Han Y, Tao J, Gomer A, & Ramirez-Bergeron DL Loss of endothelial-ARNT in adult mice contributes to dampened circulating proangiogenic cells and delayed wound healing. *Vasc Med* 2014; 19:429-441.
41. Fleming CR, Billiard SM, & Di Giulio RT Hypoxia inhibits induction of aryl hydrocarbon receptor activity in topminnow hepatocarcinoma cells in an ARNT-dependent manner. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009; 150:383-389.
42. Nukaya M, Walisser JA, Moran SM, Kennedy GD, & Bradfield CA Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in hepatocytes is required for aryl hydrocarbon receptor-mediated adaptive and toxic responses in liver. *Toxicol Sci* 2010; 118:554-563.
43. Pollenz RS, Davarinos NA, & Shearer TP Analysis of aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling during physiological hypoxia reveals lack of competition for the aryl hydrocarbon nuclear translocator transcription factor. *Mol Pharmacol* 1999; 56:1127-1137.
44. Celermajer DS, *et al.* Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334:150-154.

45. Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, & Rivard A Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41:275-284.
46. Ichihara S, *et al.* Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by benzo[a]pyrene in a manner dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381:44-49.
47. Ichihara S, *et al.* A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1297-1304.
48. Szeliga J & Dipple A DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chem Res Toxicol* 1998; 11:1-11.
49. Matsumoto Y, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ Sci Technol* 2007; 41:3775-3780.
50. Ikuta T & Kawajiri K Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp Cell Res* 2006; 312:3585-3594.
51. van den Bogaard EH, *et al.* Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2013; 123:917-927.
52. Furue M Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2020; 21.
53. Lin ZC, *et al.* Eupafolin nanoparticles protect HaCaT keratinocytes from particulate matter-induced inflammation and oxidative stress. *Int J Nanomedicine* 2016; 11:3907-3926.
54. Lee CW, *et al.* Eupafolin ameliorates COX-2 expression and PGE2 production in particulate pollutants-exposed human keratinocytes through ROS/MAPKs pathways. *J Ethnopharmacol* 2016; 189:300-309.
55. Ye W, *et al.* AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1. *The FEBS Journal* 2019; 286:4215-4231.

Figure legends:

Figure 1. Signaling by the AhR in response to its ligand.

AhR: Aryl hydrocarbon Receptor; ARNT: Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator; XRE: Xenobiotic Response Element; AhRR: Aryl hydrocarbon Receptor Repressor. In the cytoplasm, the AhR binds its ligand and is then transported to the nucleus. In the nucleus, the AhR and its ligand heterodimerize with the ARNT to bind to the XRE in promoter regions of target genes such as, for example, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) (Ye et al. 2019).

Figure 2. Impact of pollution on the cutaneous functionality involving the AhR.

Pollution and cigarette smoke are composed of numerous ligands capable of activating the AhR. Oxidative stress induced by pollution perturbs the overall balance of the skin. This results in inflammation of the epidermis by the secretion of pro-inflammatory cytokines (1), greater trans-epidermal water loss (2) due to the loss of intercellular junctions (3), and destabilization of the dermal-epidermal junction (DEJ) (4). The keratinocytes of the basal layer lose their capacity for proliferation and their differentiation is increased, thereby enhancing the supra-basal layers (5). The proliferation and the migration of fibroblasts are altered (6), which can lead to impaired wound healing. Within the derma, the extracellular matrix is degraded (7) by the presence of metalloproteases (MMPs) induced by the inflamed keratinocytes in particular. However, endogenous or exogenous natural entities are capable of counteracting the adverse effects of pollution (8).

Figures :

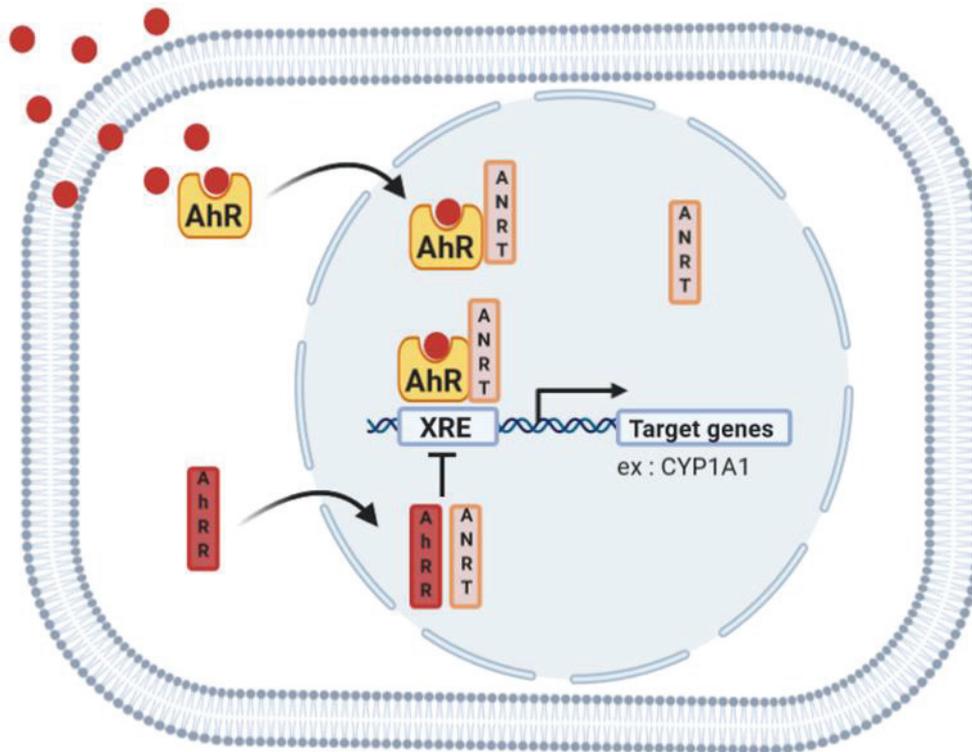


Figure 1. Signaling by the AhR in response to its ligand.

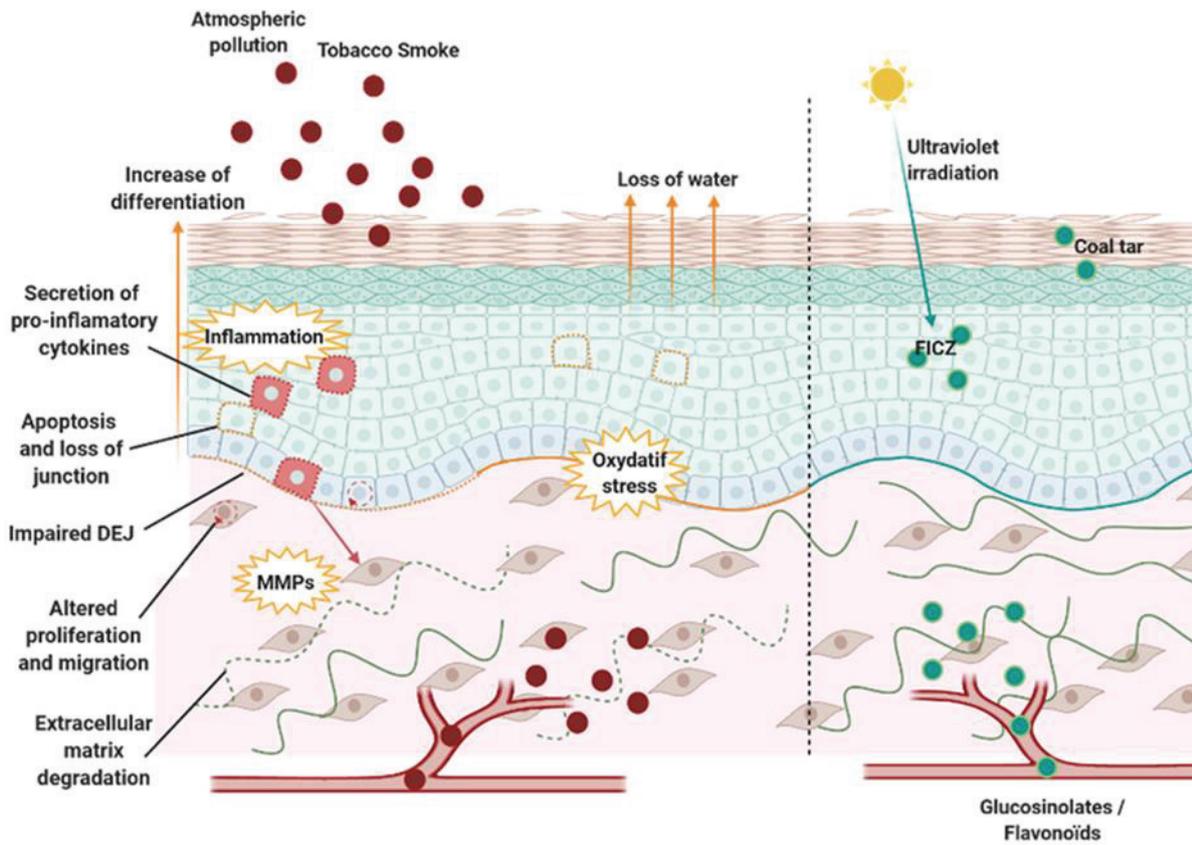


Figure 2. Impact of pollution on the cutaneous functionality involving AhR.

REFERENCES
BIBLIO-
GRAPHIQUES

Abraira VE, Ginty DD. 2013. The sensory neurons of touch. *Neuron* 79: 618-639.

Adeshara KA, Bangar NS, Doshi PR, Diwan A, Tupe RS. 2020. Action of metformin therapy against advanced glycation, oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes patients: 3 months follow-up study. *Diabetes Metab Syndr* 14: 1449-1458.

Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Dawnay A, Thornalley PJ. 2005. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* 16: 1471-1485.

Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. 1986. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261: 4889-4894.

Ahmed N. 2005. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.

Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ. 2005. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 28: 2465-2471.

Ahn K. 2014. The role of air pollutants in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134: 993-999; discussion 1000.

Al-Ani B, Alzamil NM, Hewett PW, Al-Hashem F, Bin-Jaliah I, Shatoor AS, Kamar SS, Latif NSA, Haidara MA, Dawood AF. 2021. Metformin ameliorates ROS-p53-collagen axis of fibrosis and dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus-induced left ventricular injury. *Arch Physiol Biochem*: 1-7.

Al-Rubeaan K, Al Derwish M, Ouizi S, Youssef AM, Subhani SN, Ibrahim HM, Alamri BN. 2015. Diabetic foot complications and their risk factors from a large retrospective cohort study. *PLoS One* 10: e0124446.

Alabdulkarim Y. 2017. Recent advances in bone regeneration: The role of adipose tissue-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells. *Journal of limb lengthening and reconstruction* 3: 4-18.

Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. 2011. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22: 4068-4078.

Alexander CM, Kasza I, Yen CL, Reeder SB, Hernando D, Gallo RL, Jahoda CA, Horsley V, MacDougald OA. 2015. Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response. *J Lipid Res* 56: 2061-2069.

Algire C, Moiseeva O, Deschenes-Simard X, Amrein L, Petruccioli L, Birman E, Viollet B, Ferbeyre G, Pollak MN. 2012. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)* 5: 536-543.

Alqahtani AS, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Kam A, Alam P, Li GQ. 2021. Attenuation of methylglyoxal-induced glycation and cellular dysfunction in wound healing by *Centella cordifolia*. *Saudi J Biol Sci* 28: 813-824.

Anderegg U, Simon JC, Averbek M. 2014. More than just a filler - the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Exp Dermatol* 23: 295-303.

Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. 2012. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J Invest Dermatol* 132: 1222-1229.

Aragno M, Mastrocola R. 2017. Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease. *Nutrients* 9.

Argaud D, Roth H, Wiernsperger N, Leverve XM. 1993. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 213: 1341-1348.

Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. 2013. Psoriasis and the risk of diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatol* 149: 84-91.

Association AD. 2015. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 38 Suppl: S8-S16.

Aumailley M. 2020. Laminins and interaction partners in the architecture of the basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Exp Dermatol*.

Azzam H, Bergman R, Friedman-Birnbaum R. 1997. Lichen planus associated with metformin therapy. *Dermatology* 194: 376.

- Baker LB, Wolfe AS.** 2020. Physiological mechanisms determining eccrine sweat composition. *Eur J Appl Physiol* 120: 719-752.
- Bakker K, Apelqvist J, Lipsky BA, Van Netten JJ.** 2016. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes Metab Res Rev* 32 Suppl 1: 2-6.
- Barnes KA, Anderson ML, Stofan JR, Dalrymple KJ, Reimel AJ, Roberts TJ, Randell RK, Ungaro CT, Baker LB.** 2019. Normative data for sweating rate, sweat sodium concentration, and sweat sodium loss in athletes: An update and analysis by sport. *J Sports Sci* 37: 2356-2366.
- Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R.** 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 30: 257-262.
- Basler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM.** 2016. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 242: 105-118.
- Bathaie ZB, F., Farajzadeh A.** 2014. Role of amino acids on prevention of non enzymatic glycation of lens proteins in senil and diabetic cataract. Pages 15. *Handbook of nutrition, diet and the eye.*
- Bavkar LN, Patil RS, Rooge SB, Nalawade ML, Arvindkar AU.** 2019. Acceleration of protein glycation by oxidative stress and comparative role of antioxidant and protein glycation inhibitor. *Mol Cell Biochem* 459: 61-71.
- Baynes JW.** 2001. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol* 36: 1527-1537.
- Behrens DT, Villone D, Koch M, Brunner G, Sorokin L, Robenek H, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P, Hansen U.** 2012. The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J Biol Chem* 287: 18700-18709.
- Beisswenger PJ, Howell SK, Nelson RG, Mauer M, Szwegold BS.** 2003. Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem Soc Trans* 31: 1358-1363.
- Bekele F, Chelkeba L, Fekadu G, Bekele K.** 2020. Risk factors and outcomes of diabetic foot ulcer among diabetes mellitus patients admitted to Nekemte referral hospital, western Ethiopia: Prospective observational study. *Ann Med Surg (Lond)* 51: 17-23.
- Ben Salem C, Hmouda H, Slim R, Denguezli M, Belajouza C, Bouraoui K.** 2006. Rare case of metformin-induced leukocytoclastic vasculitis. *Ann Pharmacother* 40: 1685-1687.
- Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA.** 2006. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol* 207: 491-498.
- Berthod F, Symes J, Tremblay N, Medin JA, Auger FA.** 2012. Spontaneous fibroblast-derived pericyte recruitment in a human tissue-engineered angiogenesis model in vitro. *J Cell Physiol* 227: 2130-2137.
- Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L.** 2015. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J* 12: 47-52.
- Bi H, Li H, Zhang C, Mao Y, Nie F, Xing Y, Sha W, Wang X, Irwin DM, Tan H.** 2019. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res Ther* 10: 302.
- Birk DE.** 2001. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 32: 223-237.
- Blanpain C, Fuchs E.** 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 339-373.
- Bolzan AD, Bianchi MS.** 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 512: 121-134.
- Bonfanti L, Mironov AA, Jr., Martinez-Menarguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, Buccione R, Geuze HJ, Mironov AA, Luini A.** 1998. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95: 993-1003.
- Borradori L, Sonnenberg A.** 1999. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112: 411-418.
- Bosko CA.** 2019. Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes. *J Drugs Dermatol* 18: s63-67.
- Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel V, Forsberg RC, Davignon DR, Smith DG.** 1999. A prospective study of risk factors for diabetic foot ulcer. The Seattle Diabetic Foot Study. *Diabetes Care* 22: 1036-1042.

Brand C, et al. 2016. NG2 proteoglycan as a pericyte target for anticancer therapy by tumor vessel infarction with retargeted tissue factor. *Oncotarget* 7: 6774-6789.

Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF, Entero H, Lee B, Pastar I, Golinko M, Rosenberg H, Tomic-Canic M. 2007. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. *Mol Med* 13: 30-39.

Brings S, Fleming T, Freichel M, Muckenthaler MU, Herzig S, Nawroth PP. 2017. Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. *Int J Mol Sci* 18.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. 1988. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318: 1315-1321.

Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. 1986. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232: 1629-1632.

Cadau S, Leoty-Okombi S, Pain S, Bechetoille N, Andre-Frei V, Berthod F. 2015. In vitro glycation of an endothelialized and innervated tissue-engineered skin to screen anti-AGE molecules. *Biomaterials* 51: 216-225.

Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, Chang L, Yan LJ, Zhao B. 2016. Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 36: 483-495.

Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. 2015. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4: 225-234.

Candi E, Schmidt R, Melino G. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 328-340.

Cappellano G, Morandi EM, Rainer J, Grubwieser P, Heinz K, Wolfram D, Bernhard D, Lobenwein S, Pierer G, Ploner C. 2018. Human Macrophages Preferentially Infiltrate the Superficial Adipose Tissue. *Int J Mol Sci* 19.

Carey AL, et al. 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55: 2688-2697.

Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.

Carmeliet P, Jain RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298-307.

Carvajal-Gonzalez JM, Roman AC, Cerezo-Guisado MI, Rico-Leo EM, Martin-Partido G, Fernandez-Salguero PM. 2009. Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGFbeta. *J Cell Sci* 122: 1823-1833.

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G. 2004. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 122: 1235-1244.

CDC CfDcaP. 2004. Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53: 1066-1068.

Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. 1996. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 334: 150-154.

Cen J, Sargsyan E, Forslund A, Bergsten P. 2018. Mechanisms of beneficial effects of metformin on fatty acid-treated human islets. *J Mol Endocrinol* 61: 91-99.

Cerami A. 1985. Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am Geriatr Soc* 33: 626-634.

Cerami C, et al. 1997. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13915-13920.

Cerezo M, et al. 2013. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther* 12: 1605-1615.

Chang JE, Choi MS. 2020. A Molecular Perspective on the Potential Benefits of Metformin for the Treatment of Inflammatory Skin Disorders. *Int J Mol Sci* 21.

- Chen SC, Brooks R, Houskeeper J, Bremner SK, Dunlop J, Viollet B, Logan PJ, Salt IP, Ahmed SF, Yarwood SJ.** 2017. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 440: 57-68.
- Chen SX, Zhang LJ, Gallo RL.** 2019. Dermal White Adipose Tissue: A Newly Recognized Layer of Skin Innate Defense. *J Invest Dermatol* 139: 1002-1009.
- Chen Y, Qiu F, Yu B, Zuo F, Zhu X, Nandakumar KS, Xiao C.** 2020. Metformin, an AMPK Activator, Inhibits Activation of FLSs but Promotes HAPLN1 Secretion. *Mol Ther Methods Clin Dev* 17: 1202-1214.
- Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R.** 2009. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11: R39.
- Chhabra A, Bhatia A, Ram AK, Goel S.** 2017. Increased advanced glycation end product specific fluorescence in repeatedly heated used cooking oil. *J Food Sci Technol* 54: 2602-2606.
- Chogan F, Mirmajidi T, Rezayan AH, Sharifi AM, Ghahary A, Nourmohammadi J, Kamali A, Rahaie M.** 2020. Design, fabrication, and optimization of a dual function three-layer scaffold for controlled release of metformin hydrochloride to alleviate fibrosis and accelerate wound healing. *Acta Biomater* 113: 144-163.
- Chung HY, et al.** 2019. Redefining Chronic Inflammation in Aging and Age-Related Diseases: Proposal of the Senoinflammation Concept. *Aging Dis* 10: 367-382.
- Colhoun HM, et al.** 2011. Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products as predictive biomarkers of coronary heart disease risk in patients with type 2 diabetes: an analysis from the CARDS trial. *Diabetes* 60: 2379-2385.
- Colzani M, De Maddis D, Casali G, Carini M, Vistoli G, Aldini G.** 2016. Reactivity, Selectivity, and Reaction Mechanisms of Aminoguanidine, Hydralazine, Pyridoxamine, and Carnosine as Sequestering Agents of Reactive Carbonyl Species: A Comparative Study. *ChemMedChem* 11: 1778-1789.
- Cooper R, Lawrence JC.** 1996. The isolation and identification of bacteria from wounds. *J Wound Care* 5: 335-340.
- Cree-Green M, et al.** 2019. Metformin Improves Peripheral Insulin Sensitivity in Youth With Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 104: 3265-3278.
- Crocker DJ, Murad TM, Geer JC.** 1970. Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp Mol Pathol* 13: 51-65.
- Culina S, et al.** 2018. Islet-reactive CD8(+) T cell frequencies in the pancreas, but not in blood, distinguish type 1 diabetic patients from healthy donors. *Sci Immunol* 3.
- D'Souza A M, Johnson JD, Clee SM, Kieffer TJ.** 2016. Suppressing hyperinsulinemia prevents obesity but causes rapid onset of diabetes in leptin-deficient *Lep(ob/ob)* mice. *Mol Metab* 5: 1103-1112.
- Dabass A, Talbott EO, Bilonick RA, Rager JR, Venkat A, Marsh GM, Duan C, Xue T.** 2016. Using spatio-temporal modeling for exposure assessment in an investigation of fine particulate air pollution and cardiovascular mortality. *Environ Res* 151: 564-572.
- Dai J, Chen H, Chai Y.** 2019. Advanced Glycation End Products (AGEs) Induce Apoptosis of Fibroblasts by Activation of NLRP3 Inflammasome via Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling Pathway. *Med Sci Monit* 25: 7499-7508.
- Dakin H, Dudley H.** 1913. An enzyme concerned with the formation of hydroxy acids from ketonaldehydes. *Journal of Biochemistry* 14: 155-157.
- Dallaglio K, et al.** 2014. Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. *Carcinogenesis* 35: 1055-1066.
- Dalton SJ, Mitchell DC, Whiting CV, Tarlton JF.** 2005. Abnormal extracellular matrix metabolism in chronically ischemic skin: a mechanism for dermal failure in leg ulcers. *J Invest Dermatol* 125: 373-379.
- Dandia H, Makkad K, Tayalia P.** 2019. Glycated collagen - a 3D matrix system to study pathological cell behavior. *Biomater Sci* 7: 3480-3488.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV.** 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136: 729-743.
- Davis EC, Mecham RP.** 1998. Intracellular trafficking of tropoelastin. *Matrix Biol* 17: 245-254.

- de la Maza MP, Uribarri J, Olivares D, Hirsch S, Leiva L, Barrera G, Bunout D.** 2008. Weight increase is associated with skeletal muscle immunostaining for advanced glycation end products, receptor for advanced glycation end products, and oxidation injury. *Rejuvenation Res* 11: 1041-1048.
- de Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RP, Zeebregts CJ, Smit AJ.** 2016. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis* 254: 291-299.
- Deckers J, Hammad H, Hoste E.** 2018. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front Immunol* 9: 93.
- Deegan AJ, Wang RK.** 2019. Microvascular imaging of the skin. *Phys Med Biol* 64: 07TR01.
- Delpierre G, Rider MH, Collard F, Stroobant V, Vanstapel F, Santos H, Van Schaftingen E.** 2000. Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. *Diabetes* 49: 1627-1634.
- Deo P, Keogh JB, Price NJ, Clifton PM.** 2017. Effects of Weight Loss on Advanced Glycation End Products in Subjects with and without Diabetes: A Preliminary Report. *Int J Environ Res Public Health* 14.
- Desmouliere A.** 1995. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* 19: 471-476.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G.** 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103-111.
- Dhall S, Alamat R, Castro A, Sarker AH, Mao JH, Chan A, Hang B, Martins-Green M.** 2016. Tobacco toxins deposited on surfaces (third hand smoke) impair wound healing. *Clin Sci (Lond)* 130: 1269-1284.
- Dickerson TJ, Janda KD.** 2002. A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15084-15088.
- Dobler D, Ahmed N, Song L, Eboigbodin KE, Thornalley PJ.** 2006. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes* 55: 1961-1969.
- Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, Ehses JA.** 2008. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* 31 Suppl 2: S161-164.
- Driskell RR, Jahoda CA, Chuong CM, Watt FM, Horsley V.** 2014. Defining dermal adipose tissue. *Exp Dermatol* 23: 629-631.
- Driskell RR, et al.** 2013. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 504: 277-281.
- Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Skibova J, Schaper NC, Lipsky BA.** 2013. Risk factors for recurrence of diabetic foot ulcers: prospective follow-up analysis in the Eurodiale subgroup. *Int Wound J* 10: 555-561.
- Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW.** 1989. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* 28: 9464-9468.
- Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW.** 1991. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 30: 1205-1210.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW.** 1993. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 91: 2463-2469.
- Eckert RL, Rorke EA.** 1989. Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect* 80: 109-116.
- Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W.** 2013. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 1833: 3471-3480.
- Edsberg LE, Black JM, Goldberg M, McNichol L, Moore L, Sieggreen M.** 2016. Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System: Revised Pressure Injury Staging System. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 43: 585-597.

Egawa G, Kabashima K. 2018. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergol Int* 67: 3-11.

Eguchi K, Nagai R. 2017. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest* 127: 14-23.

Ehshes JA, et al. 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56: 2356-2370.

El-Asaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M. 2003. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144: 4154-4163.

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 275: 223-228.

Eller MS, Gilchrist BA. 2000. Tanning as part of the eukaryotic SOS response. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8: 94-97.

Esser C, Bargon I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T, Krutmann J. 2013. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin Immunopathol* 35: 677-691.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890-898.

Fang JY, Lin CH, Huang TH, Chuang SY. 2019. In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity. *Nutrients* 11.

Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. 2004. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110: 2226-2232.

Feingold KR. 2007. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* 48: 2531-2546.

Fleming CR, Billiard SM, Di Giulio RT. 2009. Hypoxia inhibits induction of aryl hydrocarbon receptor activity in topminnow hepatocarcinoma cells in an ARNT-dependent manner. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150: 383-389.

Flier JS. 1995. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* 80: 15-18.

Flory J, Lipska K. 2019. Metformin in 2019. *JAMA* 321: 1926-1927.

Forbes JM, Fotheringham AK. 2017. Vascular complications in diabetes: old messages, new thoughts. *Diabetologia* 60: 2129-2138.

Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, Cooper ME. 2003. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J* 17: 1762-1764.

Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 120: 2355-2369.

Fortunel NO, Martin MT. 2012. Cellular organization of the human epidermal basal layer: clues sustaining a hierarchical model. *Int J Radiat Biol* 88: 677-681.

Freeman SC, Sonthalia S. 2020. Histology, Keratohyalin Granules.

Fritsche E, et al. 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8851-8856.

Fuchs E, Raghavan S. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3: 199-209.

Fujimoto E, Kobayashi T, Fujimoto N, Akiyama M, Tajima S, Nagai R. 2010. AGE-modified collagens I and III induce keratinocyte terminal differentiation through AGE receptor CD36: epidermal-dermal interaction in acquired perforating dermatosis. *J Invest Dermatol* 130: 405-414.

Fujimoto T, Parton RG. 2011. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Fujioka K, Brazg RL, Raz I, Bruce S, Joyal S, Swanink R, Pans M. 2005. Efficacy, dose-response relationship and safety of once-daily extended-release metformin (Glucophage XR) in type 2 diabetic

patients with inadequate glycaemic control despite prior treatment with diet and exercise: results from two double-blind, placebo-controlled studies. *Diabetes Obes Metab* 7: 28-39.

Furue M. 2020. Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 21.

Furue M, Takahara M, Nakahara T, Uchi H. 2014. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res* 306: 769-779.

Furue M, Uchi H, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Chiba T, Ito T, Nakahara T, Tsuji G. 2017. Antioxidants for Healthy Skin: The Emerging Role of Aryl Hydrocarbon Receptors and Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2. *Nutrients* 9.

Gagnon D, Crandall CG. 2018. Sweating as a heat loss thermoeffector. *Handb Clin Neurol* 156: 211-232.

Galiano RD, Michaels Jt, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 12: 485-492.

Gallo RL. 2017. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J Invest Dermatol* 137: 1213-1214.

Gilbert ER, Liu D. 2012. Epigenetics: the missing link to understanding beta-cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Epigenetics* 7: 841-852.

Golebiewska EM, Poole AW. 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 29: 153-162.

Goleva E, Berdyshev E, Leung DY. 2019. Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *J Clin Invest* 129: 1463-1474.

Gonzalez-Duque S, et al. 2018. Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by beta Cells Are Targeted by Circulating Naive CD8+ T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors. *Cell Metab* 28: 946-960 e946.

Goova MT, et al. 2001. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 159: 513-525.

Guan WJ, Zheng XY, Chung KF, Zhong NS. 2016. Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China: time for urgent action. *Lancet* 388: 1939-1951.

Guerra A, Belinha J, Jorge RN. 2018. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *J Theor Biol* 459: 1-17.

Guilbaud A, Howsam M, Niquet-Leridon C, Delguste F, Boulanger E, Tessier FJ. 2019. The LepR(db/db) mice model for studying glycation in the context of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 35: e3103.

Guillon C, Ferraro S, Clement S, Bouschbacher M, Sigaudou-Roussel D, Bonod C. 2021. Glycation by glyoxal leads to profound changes in the behavior of dermal fibroblasts. *BMJ Open Diabetes Res Care* 9.

Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. 2003. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1323-1332.

Gupta A, Tripathi AK, Tripathi RL, Madhu SV, Banerjee BD. 2007. Advanced glycosylated end products-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* 44: 373-378.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226.

Haarmann-Stemann T, Abel J, Fritsche E, Krutmann J. 2012. The AhR-Nrf2 pathway in keratinocytes: on the road to chemoprevention? *J Invest Dermatol* 132: 7-9.

Haas K, Weighardt H, Deenen R, Kohrer K, Clausen B, Zahner S, Boukamp P, Bloch W, Krutmann J, Esser C. 2016. Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Is Essential for Murine Skin Barrier Integrity. *J Invest Dermatol* 136: 2260-2269.

Haftek M, Simon M, Kanitakis J, Marechal S, Claudy A, Serre G, Schmitt D. 1997. Expression of corneodesmosin in the granular layer and stratum corneum of normal and diseased epidermis. *Br J Dermatol* 137: 864-873.

- Han X, Tao Y, Deng Y, Yu J, Sun Y, Jiang G.** 2017. Metformin accelerates wound healing in type 2 diabetic db/db mice. *Mol Med Rep* 16: 8691-8698.
- Han Y, Tao J, Gomer A, Ramirez-Bergeron DL.** 2014. Loss of endothelial-ARNT in adult mice contributes to dampened circulating proangiogenic cells and delayed wound healing. *Vasc Med* 19: 429-441.
- Hardie DG.** 2014. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annu Rev Nutr* 34: 31-55.
- Haskell BD, Flurkey K, Duffy TM, Sargent EE, Leiter EH.** 2002. The diabetes-prone NZO/HILt strain. I. Immunophenotypic comparison to the related NZB/BINJ and NZW/LacJ strains. *Lab Invest* 82: 833-842.
- Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW.** 1992. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol* 141: 1085-1095.
- Herzig S, Shaw RJ.** 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 121-135.
- Hidaka T, et al.** 2017. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol* 18: 64-73.
- Hinek A.** 1995. The 67 kDa spliced variant of beta-galactosidase serves as a reusable protective chaperone for tropoelastin. *Ciba Found Symp* 192: 185-191; discussion 191-186.
- Hinek A, Rabinovitch M.** 1994. 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol* 126: 563-574.
- Hippisley-Cox J, Coupland C.** 2016. Diabetes treatments and risk of amputation, blindness, severe kidney failure, hyperglycaemia, and hypoglycaemia: open cohort study in primary care. *BMJ* 352: i1450.
- Hodge J.** 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agric Food Chem* 1: 928-943.
- Hollenbach S, Thampi P, Viswanathan T, Abraham EC.** 2003. Cleavage of in vitro and in vivo formed lens protein cross-links by a novel cross-link breaker. *Mol Cell Biochem* 243: 73-80.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
- Hong ES, Lim C, Choi HY, Lee YK, Ku EJ, Moon JH, Park KS, Jang HC, Choi SH.** 2019. Plasma fibroblast growth factor 21 levels increase with ectopic fat accumulation and its receptor levels are decreased in the visceral fat of patients with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care* 7: e000776.
- Hou WL, Yin J, Alimujiang M, Yu XY, Ai LG, Bao YQ, Liu F, Jia WP.** 2018. Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J Cell Mol Med* 22: 1316-1328.
- Hou XX, et al.** 2019. Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates the Expression of TNF-alpha and IL-8 in Human Sebocytes via the MyD88-p65NF-kappaB/p38MAPK Signaling Pathways. *J Innate Immun* 11: 41-51.
- Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC.** 2001. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 345: 790-797.
- Hu H, Han CM, Hu XL, Ye WL, Huang WJ, Smit AJ.** 2012. Elevated skin autofluorescence is strongly associated with foot ulcers in patients with diabetes: a cross-sectional, observational study of Chinese subjects. *J Zhejiang Univ Sci B* 13: 372-377.
- Hu YQ, Liu P, Mu ZL, Zhang JZ.** 2020. Aryl hydrocarbon receptor expression in serum, peripheral blood mononuclear cells, and skin lesions of patients with atopic dermatitis and its correlation with disease severity. *Chin Med J (Engl)* 133: 148-153.
- Hunter RW, Hughey CC, Lantier L, Sundelin EI, Peggie M, Zeqiraj E, Sicheri F, Jessen N, Wasserman DH, Sakamoto K.** 2018. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nat Med* 24: 1395-1406.
- Iberg N, Fluckiger R.** 1986. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. *J Biol Chem* 261: 13542-13545.

Ichihara S, Yamada Y, Gonzalez FJ, Nakajima T, Murohara T, Ichihara G. 2009. Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by benzo[a]pyrene in a manner dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 44-49.

Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Nakajima T, Li P, Kondo T, Gonzalez FJ, Murohara T. 2007. A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1297-1304.

IDF. 2019. 9th edition of international diabetes federation.

Ikegami H, Fujisawa T, Ogihara T. 2004. Mouse models of type 1 and type 2 diabetes derived from the same closed colony: genetic susceptibility shared between two types of diabetes. *ILAR J* 45: 268-277.

Ikuta T, Kawajiri K. 2006. Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp Cell Res* 312: 3585-3594.

Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, Nawata H. 2002. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E775-783.

Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. 1950. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41: 317-318.

Ishitsuka Y, Roop DR. 2020. Loricrin: Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci* 21.

Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, Omary MB. 2018. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10.

Jalilian M, Ahmadi Sarbarzeh P, Oubari S. 2020. Factors Related to Severity of Diabetic Foot Ulcer: A Systematic Review. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13: 1835-1842.

Janson D, Saintigny G, Mahe C, El Ghalbzouri A. 2013. Papillary fibroblasts differentiate into reticular fibroblasts after prolonged in vitro culture. *Exp Dermatol* 22: 48-53.

Janson D, Rietveld M, Mahe C, Saintigny G, El Ghalbzouri A. 2017. Differential effect of extracellular matrix derived from papillary and reticular fibroblasts on epidermal development in vitro. *Eur J Dermatol* 27: 237-246.

Janson DG, Saintigny G, van Adrichem A, Mahe C, El Ghalbzouri A. 2012. Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol* 132: 2565-2572.

Januszewski AS, Xu D, Cho YH, Benitez-Aguirre PZ, O'Neal DN, Craig ME, Donaghue KC, Jenkins AJ. 2020. Skin autofluorescence in people with type 1 diabetes and people without diabetes: An eight-decade cross-sectional study with evidence of accelerated aging and associations with complications. *Diabet Med*: e14432.

Jeon HB, Roh H, Ahn HM, Lee JH, Yun CO, Roh TS, Lee WJ. 2020. Metformin Inhibits Transforming Growth Factor beta-Induced Fibrogenic Response of Human Dermal Fibroblasts and Suppresses Fibrosis in Keloid Spheroids. *Ann Plast Surg*.

Ji H, Li XK. 2016. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 2721469.

Jia X, Wu L. 2007. Accumulation of endogenous methylglyoxal impaired insulin signaling in adipose tissue of fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem* 306: 133-139.

Jiang G, Zhang BB. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E671-678.

Jonca N, Leclerc EA, Caubet C, Simon M, Guerrin M, Serre G. 2011. Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. *Eur J Dermatol* 21 Suppl 2: 35-42.

Jurgens HS, et al. 2007. Development of diabetes in obese, insulin-resistant mice: essential role of dietary carbohydrate in beta cell destruction. *Diabetologia* 50: 1481-1489.

Just PA, et al. 2020. Lkb1 suppresses amino acid-driven gluconeogenesis in the liver. *Nat Commun* 11: 6127.

Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C. 2011. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J Invest Dermatol* 131: 203-210.

Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 114: 3069-3070.

- Kamata K, Mizukami H, Inaba W, Tsuboi K, Tateishi Y, Yoshida T, Yagihashi S.** 2014. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented beta-cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid* 21: 191-201.
- Kanitakis J.** 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12: 390-399; quiz 400-391.
- Kappler F, et al.** 1997. Metabolism of fructoselysine in the kidney. Sixth International Maillard Symposium. London.
- Kar E, Alatas O, Sahinturk V, Oz S.** 2021. Effects of metformin on lipopolysaccharide induced inflammation by activating fibroblast growth factor 21. *Biotech Histochem*: 1-9.
- Kawabata K, Yoshikawa H, Saruwatari K, Akazawa Y, Inoue T, Kuze T, Sayo T, Uchida N, Sugiyama Y.** 2011. The presence of N(epsilon)-(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1246-1252.
- Kennedy LH, Sutter CH, Leon Carrion S, Tran QT, Bodreddigari S, Kensicki E, Mohney RP, Sutter TR.** 2013. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation. *Toxicol Sci* 132: 235-249.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A.** 2004. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 189-204.
- Khalifa WA.** 2018. Risk factors for diabetic foot ulcer recurrence: A prospective 2-year follow-up study in Egypt. *Foot (Edinb)* 35: 11-15.
- Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, Bhasker V, Gordillo GM, Sen CK, Roy S.** 2010. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One* 5: e9539.
- Kim HO, Kim JH, Chung BY, Choi MG, Park CW.** 2014. Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 23: 278-281.
- Kim HS, Ren G, Kim T, Bhatnagar S, Yang Q, Bahk YY, Kim JA.** 2020a. Metformin reduces saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inflammatory response by restoration of autophagic flux in endothelial cells. *Sci Rep* 10: 13523.
- Kim KE, Cho D, Park HJ.** 2016. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci* 152: 126-134.
- Kim M, Kim JH, Jeong GJ, Park KY, Lee MK, Seo SJ.** 2019. Particulate matter induces pro-inflammatory cytokines via phosphorylation of p38 MAPK possibly leading to dermal inflammaging. *Exp Dermatol* 28: 809-815.
- Kim T, Spiegel DA.** 2013. The unique reactivity of N-phenacyl-derived thiazolium salts toward alpha-dicarbonyl compounds. *Rejuvenation Res* 16: 43-50.
- Kim Y, Keogh JB, Deo P, Clifton PM.** 2020b. Differential Effects of Dietary Patterns on Advanced Glycation end Products: A Randomized Crossover Study. *Nutrients* 12.
- Kislinger T, et al.** 1999. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274: 31740-31749.
- Kiyomatsu-Oda M, Uchi H, Morino-Koga S, Furue M.** 2018. Protective role of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. *J Dermatol Sci* 90: 284-294.
- Knas M, Niczyporuk M, Zalewska A, Car H.** 2013. The unwounded skin remodeling in animal models of diabetes types 1 and 2. *Physiol Res* 62: 519-526.
- Knas M, Wolosik K, Zalewska A, Mikucka-Niczyporuk A, Kasacka I, Niczyporuk M.** 2015. The skin remodeling in type 1 diabetes and insulin resistance animal models. *Physiol Res* 64: 875-881.
- Knight J, Assimos DG, Easter L, Holmes RP.** 2010. Metabolism of fructose to oxalate and glycolate. *Horm Metab Res* 42: 868-873.
- Koch S, Claesson-Welsh L.** 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006502.

- Kolaczowska E, Kubes P.** 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159-175.
- Kolset SO, Tveit H.** 2008. Serglycin--structure and biology. *Cell Mol Life Sci* 65: 1073-1085.
- Koo SH, et al.** 2005. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437: 1109-1111.
- Korosec A, Frech S, Lichtenberger BM.** 2019. Isolation of Papillary and Reticular Fibroblasts from Human Skin by Fluorescence-activated Cell Sorting. *J Vis Exp*.
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H.** 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6474-6479.
- Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I.** 2017. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 2220-2227.
- Krutmann J, Liu W, Li L, Pan X, Crawford M, Sore G, Seite S.** 2014. Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *J Dermatol Sci* 76: 163-168.
- Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D, Boeck K, Arendt T, Munch G.** 2005. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1043: 211-216.
- Kunkel HG, Wallenius G.** 1955. New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 122: 288.
- Kurelac I, Umesh Ganesh N, Iorio M, Porcelli AM, Gasparre G.** 2020. The multifaceted effects of metformin on tumor microenvironment. *Semin Cell Dev Biol* 98: 90-97.
- Kuri M, Nakagawa M, Tanaka H, Hasuo S, Kishi Y.** 2005. Determination of the duration of preoperative smoking cessation to improve wound healing after head and neck surgery. *Anesthesiology* 102: 892-896.
- Landen NX, Li D, Stahle M.** 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci* 73: 3861-3885.
- Lange C, Jeruschke K, Herberg L, Leiter EH, Junger E.** 2006. The diabetes-prone NZO/HI strain. Proliferation capacity of beta cells in hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Arch Physiol Biochem* 112: 49-58.
- Lecas S, Boursier E, Fitoussi R, Vie K, Momas I, Seta N, Achard S.** 2016. In vitro model adapted to the study of skin ageing induced by air pollution. *Toxicol Lett* 259: 60-68.
- Lee CW, et al.** 2016a. Eupafolin ameliorates COX-2 expression and PGE2 production in particulate pollutants-exposed human keratinocytes through ROS/MAPKs pathways. *J Ethnopharmacol* 189: 300-309.
- Lee DH, Oh JH, Chung JH.** 2016b. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *J Dermatol Sci* 83: 174-181.
- Lee SH, Jeong SK, Ahn SK.** 2006. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J* 47: 293-306.
- Lee SY, Lee SH, Yang EJ, Kim EK, Kim JK, Shin DY, Cho ML.** 2015. Metformin Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Suppression of the STAT3 Signaling Pathway and Regulation of the between Th17/Treg Balance. *PLoS One* 10: e0135858.
- Li W, Ma W, Zhong H, Liu W, Sun Q.** 2014. Metformin inhibits proliferation of human keratinocytes through a mechanism associated with activation of the MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med* 7: 389-392.
- Libby AE, Bales E, Orlicky DJ, McManaman JL.** 2016. Perilipin-2 Deletion Impairs Hepatic Lipid Accumulation by Interfering with Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation and Altering the Hepatic Lipidome. *J Biol Chem* 291: 24231-24246.
- Lin ZC, Lee CW, Tsai MH, Ko HH, Fang JY, Chiang YC, Liang CJ, Hsu LF, Hu SC, Yen FL.** 2016. Eupafolin nanoparticles protect HaCaT keratinocytes from particulate matter-induced inflammation and oxidative stress. *Int J Nanomedicine* 11: 3907-3926.
- Liu M, Zhang W, Yan Z, Yuan X.** 2018. Smoking increases the risk of diabetic foot amputation: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 15: 1680-1685.

- Liu Y, Yang F, Ma W, Sun Q.** 2016. Metformin inhibits proliferation and proinflammatory cytokines of human keratinocytes in vitro via mTOR-signaling pathway. *Pharm Biol* 54: 1173-1178.
- Lo TW, Selwood T, Thornalley PJ.** 1994. The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem Pharmacol* 48: 1865-1870.
- Loffek S, Schilling O, Franzke CW.** 2011. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 38: 191-208.
- Loughlin DT, Artlett CM.** 2009. 3-Deoxyglucosone-collagen alters human dermal fibroblast migration and adhesion: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *Wound Repair Regen* 17: 739-749.
- Lu J, et al.** 2015. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF-beta-induced collagen production in mouse renal fibroblasts. *Life Sci* 127: 59-65.
- Lubura M, et al.** 2015. Diabetes prevalence in NZO females depends on estrogen action on liver fat content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E968-980.
- Lumpkin EA, Marshall KL, Nelson AM.** 2010. The cell biology of touch. *J Cell Biol* 191: 237-248.
- Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng YH, Kahn CR.** 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61: 1691-1699.
- Maillard L.** 1912. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *Compte rendu de l'Académie des sciences* 154: 66-68.
- Majmudar AJ, Wong WJ, Simon MC.** 2010. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 40: 294-309.
- Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR.** 1971. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173: 548-550.
- Mallone R, Eizirik DL.** 2020. Presumption of innocence for beta cells: why are they vulnerable autoimmune targets in type 1 diabetes? *Diabetologia* 63: 1999-2006.
- Mantey I, Foster AV, Spencer S, Edmonds ME.** 1999. Why do foot ulcers recur in diabetic patients? *Diabet Med* 16: 245-249.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S.** 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519-531.
- Martin MJ, Hayward R, Viros A, Marais R.** 2012. Metformin accelerates the growth of BRAF V600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A. *Cancer Discov* 2: 344-355.
- Martin P, Nunan R.** 2015. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 173: 370-378.
- Matiacevich SB, Santagapita PR, Buera MP.** 2005. Fluorescence from the maillard reaction and its potential applications in food science. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 483-495.
- Matsumoto Y, Ide F, Kishi R, Akutagawa T, Sakai S, Nakamura M, Ishikawa T, Fujii-Kuriyama Y, Nakatsuru Y.** 2007. Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ Sci Technol* 41: 3775-3780.
- McDaniel JC, Browning KK.** 2014. Smoking, chronic wound healing, and implications for evidence-based practice. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 41: 415-423; quiz E411-412.
- McManaman JL, et al.** 2013. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res* 54: 1346-1359.
- Meerwaldt R, et al.** 2005. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 16: 3687-3693.
- Meigel WN, Gay S, Weber L.** 1977. Dermal architecture and collagen type distribution. *Arch Dermatol Res* 259: 1-10.
- Mentink CJ, Hendriks M, Levels AA, Wolffenbuttel BH.** 2002. Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clin Chim Acta* 321: 69-76.
- Metcalf DG, Bowler PG.** 2013. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns Trauma* 1: 5-12.

- Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A.** 2006. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol* 41: 275-284.
- Michopoulou A, Rousselle P.** 2015. How do epidermal matrix metalloproteinases support re-epithelialization during skin healing? *Eur J Dermatol* 25 Suppl 1: 33-42.
- Midena E, Segato T, Radin S, di Giorgio G, Meneghini F, Piermarocchi S, Belloni AS.** 1989. Studies on the retina of the diabetic db/db mouse. I. Endothelial cell-pericyte ratio. *Ophthalmic Res* 21: 106-111.
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ.** 2013. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494: 256-260.
- Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D.** 2008. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One* 3: e4066.
- Misery L.** 2014. [Pruritus: considerable progress in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)* 30: 1123-1128.
- Misery L.** 2020. Pruriplastic Itch-A Novel Pathogenic Concept in Chronic Pruritus. *Front Med (Lausanne)* 7: 615118.
- Misery L, Gaudillere A.** 1996. [Merkel cell and neuro-cutaneous system]. *Pathol Biol (Paris)* 44: 849-855.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG.** 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233: 119-125.
- Miyata T, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C.** 1997. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 12: 255-258.
- Mizutani K, Ono T, Ikeda K, Kayashima K, Horiuchi S.** 1997. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol* 108: 797-802.
- Mlakar A, Spiteller G.** 1996. Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid. *Chem Phys Lipids* 79: 47-53.
- Monnier VM, Cerami A.** 1981. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211: 491-493.
- Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR.** 1986. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med* 314: 403-408.
- Moon JS, Karunakaran U, Elumalai S, Lee IK, Lee HW, Kim YW, Won KC.** 2017. Metformin prevents glucotoxicity by alleviating oxidative and ER stress-induced CD36 expression in pancreatic beta cells. *J Diabetes Complications* 31: 21-30.
- Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Rodriguez-Hermosa JI, Sabater M, Pardo G, Ricart W, Fernandez-Real JM.** 2011. OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes* 60: 168-176.
- Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M.** 2005. Migration of keratinocytes is impaired on glycosylated collagen I. *Wound Repair Regen* 13: 93-101.
- Morris ME, Beare JE, Reed RM, Dale JR, LeBlanc AJ, Kaufman CL, Zheng H, Ng CK, Williams SK, Hoying JB.** 2015. Systemically delivered adipose stromal vascular fraction cells disseminate to peripheral artery walls and reduce vasomotor tone through a CD11b+ cell-dependent mechanism. *Stem Cells Transl Med* 4: 369-380.
- Mosser DM, Edwards JP.** 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
- Moysa A, Hammerschmid D, Szczepanowski RH, Sobott F, Dadlez M.** 2019. Enhanced oligomerization of full-length RAGE by synergy of the interaction of its domains. *Sci Rep* 9: 20332.
- Mraz M, Haluzik M.** 2014. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol* 222: R113-127.

Mummidi S, Das NA, Carpenter AJ, Kandikattu H, Krenz M, Siebenlist U, Valente AJ, Chandrasekar B. 2016. Metformin inhibits aldosterone-induced cardiac fibroblast activation, migration and proliferation in vitro, and reverses aldosterone+salt-induced cardiac fibrosis in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 98: 95-102.

Munch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. 1997. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 23: 134-143.

Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. 2020. Histology, Stratum Corneum.

Myllyharju J, Kivirikko KI. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20: 33-43.

Nakamura M, Yamada K. 1967. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. *Diabetologia* 3: 212-221.

Nami N, Feci L, Napoliello L, Giordano A, Lorenzini S, Galeazzi M, Rubegni P, Fimiani M. 2016. Crosstalk between platelets and PBMC: New evidence in wound healing. *Platelets* 27: 143-148.

Nauroy P, Barruche V, Marchand L, Nindorera-Badara S, Bordes S, Closs B, Ruggiero F. 2017. Human Dermal Fibroblast Subpopulations Display Distinct Gene Signatures Related to Cell Behaviors and Matrisome. *J Invest Dermatol* 137: 1787-1789.

Nemes Z, Steinert PM. 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31: 5-19.

Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, Jacob MP, Sommer P, Damour O. 2004. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol* 122: 621-630.

Nukaya M, Walisser JA, Moran SM, Kennedy GD, Bradfield CA. 2010. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in hepatocytes is required for aryl hydrocarbon receptor-mediated adaptive and toxic responses in liver. *Toxicol Sci* 118: 554-563.

Ochoa-Gonzalez F, Cervantes-Villagrana AR, Fernandez-Ruiz JC, Nava-Ramirez HS, Hernandez-Correa AC, Enciso-Moreno JA, Castaneda-Delgado JE. 2016. Metformin Induces Cell Cycle Arrest, Reduced Proliferation, Wound Healing Impairment In Vivo and Is Associated to Clinical Outcomes in Diabetic Foot Ulcer Patients. *PLoS One* 11: e0150900.

Oh JH, Kim YK, Jung JY, Shin JE, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH. 2011. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J Dermatol Sci* 62: 192-201.

Okazaki M, Saito Y, Udaka Y, Maruyama M, Murakami H, Ota S, Kikuchi T, Oguchi K. 2002. Diabetic nephropathy in KK and KK-Ay mice. *Exp Anim* 51: 191-196.

Okonkwo UA, Chen L, Ma D, Haywood VA, Barakat M, Urao N, DiPietro LA. 2020. Compromised angiogenesis and vascular Integrity in impaired diabetic wound healing. *PLoS One* 15: e0231962.

Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Dokmeci Emre S. 2017. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis* 16: 128.

Ono Y, et al. 2013. Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp Dermatol* 22: 349-353.

Onyango AN. 2012. Small reactive carbonyl compounds as tissue lipid oxidation products; and the mechanisms of their formation thereby. *Chem Phys Lipids* 165: 777-786.

Orecchioni S, et al. 2015. The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int J Cancer* 136: E534-544.

Orlicky DJ, Libby AE, Bales ES, McMahan RH, Monks J, La Rosa FG, McManaman JL. 2019. Perilipin-2 promotes obesity and progressive fatty liver disease in mice through mechanistically distinct hepatocyte and extra-hepatocyte actions. *J Physiol* 597: 1565-1584.

Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. 2014. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2: 411-429.

Pagliara AS, Karl IE, Keating JP, Brown BI, Kipnis DM. 1972. Hepatic fructose-1,6-diphosphatase deficiency. A cause of lactic acidosis and hypoglycemia in infancy. *J Clin Invest* 51: 2115-2123.

Paolillo FR, Mattos VS, de Oliveira AO, Guimaraes FEG, Bagnato VS, de Castro Neto JC. 2019. Noninvasive assessments of skin glycated proteins by fluorescence and Raman techniques in diabetics and nondiabetics. *J Biophotonics* 12: e201800162.

Parish CR. 2006. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol* 6: 633-643.

Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM. 1998. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4: 1025-1031.

Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14: 289-301.

Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. 2010. Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med* 16: 92-101.

Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M. 2014. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3: 445-464.

Patten J, Wang K. 2020. Fibronectin in development and wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.*

Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. 2000. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen* 8: 68-76.

Pence BD, Woods JA. 2014. Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3: 71-79.

Pennacchi PC, de Almeida ME, Gomes OL, Faiao-Flores F, de Araujo Crepaldi MC, Dos Santos MF, de Moraes Barros SB, Maria-Engler SS. 2015. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. *Tissue Eng Part A* 21: 2417-2425.

Peppas M, Brem H, Cai W, Zhang JG, Basgen J, Li Z, Vlassara H, Uribarri J. 2006. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). *Am J Nephrol* 26: 430-436.

Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP. 2009. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 113: 101-111.

Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS. 1998. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47: 358-364.

Pintus E, Kadlec M, Jovicic M, Sedmikova M, Ros-Santaella JL. 2018. Aminoguanidine Protects Boar Spermatozoa against the Deleterious Effects of Oxidative Stress. *Pharmaceutics* 10.

Poitout V, Robertson RP. 2008. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29: 351-366.

Pollenz RS, Davarinis NA, Shearer TP. 1999. Analysis of aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling during physiological hypoxia reveals lack of competition for the aryl hydrocarbon nuclear translocator transcription factor. *Mol Pharmacol* 56: 1127-1137.

Ponec M, Gibbs S, Pilgram G, Boelsma E, Koerten H, Bouwstra J, Mommaas M. 2001. Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 Suppl 1: 63-71.

Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287: 1132-1141.

Porter RM. 2003. Mouse models for human hair loss disorders. *J Anat* 202: 125-131.

Prasad K, Dhar I, Caspar-Bell G. 2015. Role of Advanced Glycation End Products and Its Receptors in the Pathogenesis of Cigarette Smoke-Induced Cardiovascular Disease. *Int J Angiol* 24: 75-80.

Qiao Y, Li Q, Du HY, Wang QW, Huang Y, Liu W. 2017. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 488: 445-452.

- Qing L, Fu J, Wu P, Zhou Z, Yu F, Tang J.** 2019. Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/mTOR/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Am J Transl Res* 11: 655-668.
- Qu S, Zhang C, Liu D, Wu J, Tian H, Lu L, Xu GT, Liu F, Zhang J.** 2020. Metformin Protects ARPE-19 Cells from Glyoxal-Induced Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 1740943.
- Quan KK, Kusewitt DF, Hudson LG.** 2014. Glyoxal leads to defective keratinocyte migration and down-regulation of Snai2. *J Dermatol Sci* 73: 166-169.
- Rabbani N, Thornalley PJ.** 2018. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney Int* 93: 803-813.
- Radziuk J, Bailey CJ, Wiernsperger NF, Yudkin JS.** 2003. Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3: 151-169.
- Rahbar S.** 1968. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 22: 296-298.
- Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM.** 2005. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 15: 16R-28R.
- Rauci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME.** 2008. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 22: 3716-3727.
- Reiser KM, Amigable MA, Last JA.** 1992. Nonenzymatic glycation of type I collagen. The effects of aging on preferential glycation sites. *J Biol Chem* 267: 24207-24216.
- Remoué N.** 2020. Fragilité cutanée et cicatrisation retardée de l'ulcère de pression avec la neuropathie diabétique : étude dans un modèle murin. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F.** 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* 53: 430-442.
- Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA.** 2019. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* 8.
- Rittie L, Sachs DL, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ.** 2013. Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelialization of human wounds. *Am J Pathol* 182: 163-171.
- Rittie L, Farr EA, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ.** 2016. Reduced cell cohesiveness of outgrowths from eccrine sweat glands delays wound closure in elderly skin. *Aging Cell* 15: 842-852.
- Riuzzi F, Sorci G, Sgheddu R, Chiappalupi S, Salvadori L, Donato R.** 2018. RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9: 1213-1234.
- Robinson NA, Lopic S, Welter JF, Eckert RL.** 1997. S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 272: 12035-12046.
- Ronfard V, Barrandon Y.** 2001. Migration of keratinocytes through tunnels of digested fibrin. *PNAS* 98: 4504-4509.
- Rosen ED, Spiegelman BM.** 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853.
- Rosmalen JG, Pigmans MJ, Kersseboom R, Drexhage HA, Leenen PJ, Homo-Delarche F.** 2001. Sex steroids influence pancreatic islet hypertrophy and subsequent autoimmune infiltration in nonobese diabetic (NOD) and NODscid mice. *Lab Invest* 81: 231-239.
- Rousselle P, Beck K.** 2013. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adh Migr* 7: 122-134.
- Rousselle P, Montmasson M, Garnier C.** 2019. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biol* 75-76: 12-26.
- Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M, Wiernsperger N.** 1999. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol* 58: 1765-1773.

- Ruggiero F, Roulet M, Bonod-Bidaud C.** 2005. [Dermis collagens: beyond their structural properties]. *J Soc Biol* 199: 301-311.
- Saito A, Kitayama J, Horie H, Koinuma K, Ohzawa H, Yamaguchi H, Kawahira H, Mimura T, Lefor AK, Sata N.** 2020. Metformin changes the immune microenvironment of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cancer Sci* 111: 4012-4020.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH.** 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 122: 1285-1294.
- Sartore G, Ragazzi E, Burlina S, Paleari R, Chillelli NC, Mosca A, Avemaria F, Lapolla A.** 2020. Role of fructosamine-3-kinase in protecting against the onset of microvascular and macrovascular complications in patients with T2DM. *BMJ Open Diabetes Res Care* 8.
- Sassi-Gaha S, Loughlin DT, Kappler F, Schwartz ML, Su B, Tobia AM, Artlett CM.** 2010. Two dicarbonyl compounds, 3-deoxyglucosone and methylglyoxal, differentially modulate dermal fibroblasts. *Matrix Biol* 29: 127-134.
- Sato K, Sato F.** 1983. Individual variations in structure and function of human eccrine sweat gland. *Am J Physiol* 245: R203-208.
- Sato K, Kang WH, Saga K, Sato KT.** 1989. Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J Am Acad Dermatol* 20: 537-563.
- Schaffer JE.** 2003. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14: 281-287.
- Scheijen JL, Schalkwijk CG.** 2014. Quantification of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in blood and plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: evaluation of blood specimen. *Clin Chem Lab Med* 52: 85-91.
- Schipper HS, et al.** 2012. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J Clin Invest* 122: 3343-3354.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R.** 2009. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 19: R132-142.
- Schulze E, Witt M, Fink T, Hofer A, Funk RH.** 1997. Immunohistochemical detection of human skin nerve fibers. *Acta Histochem* 99: 301-309.
- Sell DR, Monnier VM.** 1989. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 264: 21597-21602.
- Shamloul G, Khachemoune A.** 2020. An updated review of the sebaceous gland and its role in health and diseases Part 1: Embryology, evolution, structure, and function of sebaceous glands. *Dermatol Ther*: e14695.
- Shangari N, O'Brien PJ.** 2004. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 68: 1433-1442.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC.** 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310: 1642-1646.
- Shen CY, Lu CH, Wu CH, Li KJ, Kuo YM, Hsieh SC, Yu CL.** 2020. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Molecules* 25.
- Sher I, et al.** 2006. Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation. *J Biol Chem* 281: 5178-5187.
- Shigemura N, Ninomiya Y.** 2016. Recent Advances in Molecular Mechanisms of Taste Signaling and Modifying. *Int Rev Cell Mol Biol* 323: 71-106.
- Singh S, Bhansali A.** 2016. Randomized placebo control study of insulin sensitizers (Metformin and Pioglitazone) in psoriasis patients with metabolic syndrome (Topical Treatment Cohort). *BMC Dermatol* 16: 12.
- Skovso S.** 2014. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig* 5: 349-358.
- Smith GP.** 2012. Animal models of cutaneous and hepatic fibrosis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 105: 371-409.

- Smith MM, Melrose J.** 2015. Proteoglycans in Normal and Healing Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4: 152-173.
- Son KH, Son M, Ahn H, Oh S, Yum Y, Choi CH, Park KY, Byun K.** 2016. Age-related accumulation of advanced glycation end-products-albumin, S100beta, and the expressions of advanced glycation end product receptor differ in visceral and subcutaneous fat. *Biochem Biophys Res Commun* 477: 271-276.
- Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R.** 2013. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1833: 101-109.
- Sorensen LT, Toft B, Rygaard J, Ladelund S, Teisner B, Gottrup F.** 2010. Smoking attenuates wound inflammation and proliferation while smoking cessation restores inflammation but not proliferation. *Wound Repair Regen* 18: 186-192.
- Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U.** 2017. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* 58: 81-94.
- Soydas T, Yaprak Sarac E, Cinar S, Dogan S, Solakoglu S, Tuncdemir M, Kanigur Sultuybek G.** 2018. The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. *J Physiol Biochem* 74: 273-281.
- Srinivasan K, Ramarao P.** 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125: 451-472.
- Stadler I, Zhang RY, Oskoui P, Whittaker MS, Lanzafame RJ.** 2004. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse. *J Invest Surg* 17: 221-227.
- Steenbeke M, De Bruyne S, De Buyzere M, Lapauw B, Speeckaert R, Petrovic M, Delanghe JR, Speeckaert MM.** 2020. The role of soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) in the general population and patients with diabetes mellitus with a focus on renal function and overall outcome. *Crit Rev Clin Lab Sci*: 1-18.
- Steinthorsdottir V, et al.** 2007. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 39: 770-775.
- Sterne J.** 1957. Du nouveau dans les antidiabétiques. La NN diméthylamine guanyl guanidine (N.N.D.G.). *Maroc Med* 36: 1295-1296.
- Steven AC, Bisher ME, Roop DR, Steinert PM.** 1990. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J Struct Biol* 104: 150-162.
- Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S, Mahoney MG, Brennan D, Krzyzanowska A, Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M.** 2008. Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med* 12: 2675-2690.
- Stucker M, Esser M, Hoffmann M, Memmel U, Hirschmuller A, von Bormann C, Hoffmann K, Altmeyer P.** 2002. High-resolution laser Doppler perfusion imaging aids in differentiating between benign and malignant melanocytic skin tumours. *Acta Derm Venereol* 82: 25-29.
- Sturmer EK, Besser M, Terberger N, Koester V, Bachmann HS, Severing AL.** 2018. Side effects of frequently used oral antidiabetics on wound healing in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 392: 371-380.
- Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JC, Kobayashi H.** 2008. Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol* 17: 473-480.
- Sui X, Xu Y, Wang X, Han W, Pan H, Xiao M.** 2015. Metformin: A Novel but Controversial Drug in Cancer Prevention and Treatment. *Mol Pharm* 12: 3783-3791.
- Sung CT, Chao T, Lee A, Foulad DP, Choi F, Juhasz M, Dobry A, Mesinkovska NA.** 2020. Oral Metformin for Treating Dermatological Diseases: A Systematic Review. *J Drugs Dermatol* 19: 713-720.
- Szeliga J, Dipple A.** 1998. DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chem Res Toxicol* 11: 1-11.
- Sztalryd C, Brasaemle DL.** 2017. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862: 1221-1232.
- Szwergold BS, Howell S, Beisswenger PJ.** 2001. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes* 50: 2139-2147.

Tachibana T. 1995. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 58: 379-396.

Tao L, Fan X, Sun J, Zhang Z. 2021. Metformin prevented high glucose-induced endothelial reactive oxygen species via OGG1 in an AMPK α -Lin-28 dependent pathway. *Life Sci* 268: 119015.

Tarutani M, et al. 2012. GPHR-dependent functions of the Golgi apparatus are essential for the formation of lamellar granules and the skin barrier. *J Invest Dermatol* 132: 2019-2025.

Tasanen K, Varpuluoma O, Nishie W. 2019. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid. *Front Immunol* 10: 1238.

Tauchi M, et al. 2005. Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol Cell Biol* 25: 9360-9368.

Taylor KR, Gallo RL. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 20: 9-22.

Tessier FJ. 2010. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris)* 58: 214-219.

Thomé OW. 1885. *Flora von deutschland osterreich und der schweiz.*

Thornalley PJ. 1998. Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact* 111-112: 137-151.

Thornalley PJ. 2006. Advanced glycation end products in renal failure. *J Ren Nutr* 16: 178-184.

Thornalley PJ. 2008. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* 23: 125-150.

Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. 1999. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344 Pt 1: 109-116.

Thorpe S, Baynes JW. 2002. CML: a brief history. *International Congress Series* 1245: 91-99.

Thulabandu V, Chen D, Atit RP. 2018. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 7.

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. 2005. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 96: 488-500.

Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. 2018. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol* 217: 2273-2289.

Triggle CR, Ding H. 2017. Metformin is not just an antihyperglycaemic drug but also has protective effects on the vascular endothelium. *Acta Physiol (Oxf)* 219: 138-151.

Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Mitoma C, Moroi Y, Furue M. 2011. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J Dermatol Sci* 62: 42-49.

Turk Z. 2010. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res* 59: 147-156.

Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Mitoma C, Furue M. 2017. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 85: 36-43.

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. 2010. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 110: 911-916 e912.

Valcourt U, Alcaraz LB, Exposito JY, Lethias C, Bartholin L. 2015. Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adh Migr* 9: 154-165.

van den Bogaard EH, Bergboer JG, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IM, Hato SV, van der Valk PG, Schroder JM, Joosten I, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. 2013. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest* 123: 917-927.

van der Lugt T, Weseler AR, Gebbink WA, Vrolijk MF, Opperhuizen A, Bast A. 2018. Dietary Advanced Glycation Endproducts Induce an Inflammatory Response in Human Macrophages in Vitro. *Nutrients* 10.

van Waateringe RP, Fokkens BT, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Paterson AD, Smit AJ, Lutgers HL, Wolffenbuttel BHR. 2019. Skin autofluorescence predicts incident type 2 diabetes, cardiovascular disease and mortality in the general population. *Diabetologia* 62: 269-280.

Varela GM, Antwi DA, Dhir R, Yin X, Singhal NS, Graham MJ, Crooke RM, Ahima RS. 2008. Inhibition of ADRP prevents diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295: G621-628.

Vasan S, et al. 1996. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 382: 275-278.

Verzija N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. 2000. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 275: 39027-39031.

Viac J, Haftek M, Staquet MJ, Reano A, Brochier J, Thivolet J. 1985. A monoclonal antibody labelling the keratinocyte membrane: a marker of epidermal differentiation. *Acta Derm Venereol* 65: 1-8.

Vierkötter A, Schikowski T, Ranft U, Sugiri D, Matsui M, Krämer U, Krutmann J. 2010. Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology* 130: 2719-2726.

Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 122: 253-270.

Volk SW, Iqbal SA, Bayat A. 2013. Interactions of the Extracellular Matrix and Progenitor Cells in Cutaneous Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2: 261-272.

Vorriink SU, Severson PL, Kulak MV, Futscher BW, Domann FE. 2014. Hypoxia perturbs aryl hydrocarbon receptor signaling and CYP1A1 expression induced by PCB 126 in human skin and liver-derived cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 274: 408-416.

Vouillarmet J, Maucort-Boulch D, Michon P, Thivolet C. 2013. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. *Diabetes Technol Ther* 15: 601-605.

Wadman SK, De Bree PK, Van Sprang FJ, Kamerling JP, Haverkamp J, Vliegenthart JF. 1975. N-Epsilon-(Carboxymethyl)Lysine, a Constituent of Human Urine. *Clin Chim Acta* 59: 313-320.

Wang C, Liu F, Yuan Y, Wu J, Wang H, Zhang L, Hu P, Li Z, Li Q, Ye J. 2014. Metformin suppresses lipid accumulation in skeletal muscle by promoting fatty acid oxidation. *Clin Lab* 60: 887-896.

Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. 2008. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest* 88: 1278-1290.

Wang J, et al. 2015. Suppression of tumor angiogenesis by metformin treatment via a mechanism linked to targeting of HER2/HIF-1 α /VEGF secretion axis. *Oncotarget* 6: 44579-44592.

Wang Z, Gleichmann H. 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47: 50-56.

Weiherrmann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. 2017. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci* 39: 241-247.

Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376.

Werner S, Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870.

Witte MB, Barbul A. 1997. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 77: 509-528.

Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. 2011. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011: 969618.

Wu CY, Shieh JJ, Shen JL, Liu YY, Chang YT, Chen YJ. 2015. Association between antidiabetic drugs and psoriasis risk in diabetic patients: results from a nationwide nested case-control study in Taiwan. *J Am Acad Dermatol* 72: 123-130.

Xia N, Morteza A, Yang F, Cao H, Wang A. 2019. Review of the role of cigarette smoking in diabetic foot. *J Diabetes Investig* 10: 202-215.

Xin C, Wang Y, Liu M, Zhang B, Yang S. 2021. Correlation analysis between advanced glycation end products detected noninvasively and skin aging factors. *J Cosmet Dermatol* 20: 243-248.

- Xue J, Rai V, Singer D, Chabierski S, Xie J, Reverdatto S, Burz DS, Schmidt AM, Hoffmann R, Shekhtman A.** 2011. Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure* 19: 722-732.
- Xue M, Jackson CJ.** 2015. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4: 119-136.
- Yang PY, Li PC, Feng B.** 2019. Protective effects of gliclazide on high glucose and AGEs-induced damage of glomerular mesangial cells and renal tubular epithelial cells via inhibiting RAGE-p22phox-NF-kB pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23: 9099-9107.
- Yang S, Litchfield JE, Baynes JW.** 2003a. AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch Biochem Biophys* 412: 42-46.
- Yang X, Xu Z, Zhang C, Cai Z, Zhang J.** 2017. Metformin, beyond an insulin sensitizer, targeting heart and pancreatic beta cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863: 1984-1990.
- Yang Y, Santamaria P.** 2006. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond)* 110: 627-639.
- Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellett JD, Wu R, Nadler JL.** 2003b. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 26: e99-104.
- Yao M, Cui B, Zhang W, Ma W, Zhao G, Xing L.** 2021. Exosomal miR-21 secreted by IL-1beta-primed-mesenchymal stem cells induces macrophage M2 polarization and ameliorates sepsis. *Life Sci* 264: 118658.
- Ye W, Chen R, Chen X, Huang B, Lin R, Xie X, Chen J, Jiang J, Deng Y, Wen J.** 2019. AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (

CYP1A1

) by recruiting Sp1. *The FEBS Journal* 286: 4215-4231.

- Yeo GC, Keeley FW, Weiss AS.** 2011. Coacervation of tropoelastin. *Adv Colloid Interface Sci* 167: 94-103.
- Yildiz G, Demiryurek AT, Sahin-Erdemli I, Kanzik I.** 1998. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br J Pharmacol* 124: 905-910.
- Yin L, Morita A, Tsuji T.** 2003. Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF-beta. *Exp Dermatol* 12 Suppl 2: 51-56.
- Yoon KH, et al.** 2011. Comparison of the efficacy of glimepiride, metformin, and rosiglitazone monotherapy in korean drug-naive type 2 diabetic patients: the practical evidence of antidiabetic monotherapy study. *Diabetes Metab J* 35: 26-33.
- Zabielski P, Hady HR, Chacinska M, Roszczyc K, Gorski J, Blachnio-Zabielska AU.** 2018. The effect of high fat diet and metformin treatment on liver lipids accumulation and their impact on insulin action. *Sci Rep* 8: 7249.
- Zeggini E, et al.** 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316: 1336-1341.
- Zhan D, Guo L, Zheng L.** 2018. Inhibition of the receptor for advanced glycation promotes proliferation and repair of human periodontal ligament fibroblasts in response to high glucose via the NF-kappaB signaling pathway. *Arch Oral Biol* 87: 86-93.
- Zhang J, Xu X, Rao NV, Argyle B, McCoard L, Rusho WJ, Kennedy TP, Prestwich GD, Krueger G.** 2011. Novel sulfated polysaccharides disrupt cathelicidins, inhibit RAGE and reduce cutaneous inflammation in a mouse model of rosacea. *PLoS One* 6: e16658.
- Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R.** 2008. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* 283: 35507-35516.
- Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y.** 2017. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (dagger). *Ann Med* 49: 106-116.

Zhao P, et al. 2017. Anti-aging pharmacology in cutaneous wound healing: effects of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application. *Aging Cell* 16: 1083-1093.

Zhu P, Yang C, Chen LH, Ren M, Lao GJ, Yan L. 2011. Impairment of human keratinocyte mobility and proliferation by advanced glycation end products-modified BSA. *Arch Dermatol Res* 303: 339-350.

Zigrino P, Brinckmann J, Niehoff A, Lu Y, Giebeler N, Eckes B, Kadler KE, Mauch C. 2016. Fibroblast-Derived MMP-14 Regulates Collagen Homeostasis in Adult Skin. *J Invest Dermatol* 136: 1575-1583.

Zomer HD, Trentin AG. 2018. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci* 90: 3-12.