

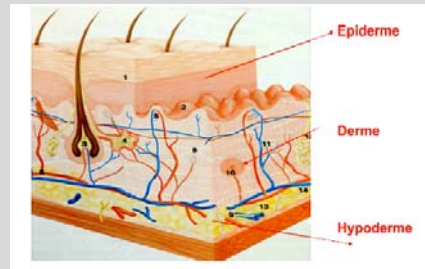
D.U. de cicatrisation des plaies, brûlures et nécroses

La cicatrisation normale : mécanismes physiologiques et modèles expérimentaux

Franck Verrecchia
INSERM UMRs 1238, Nantes

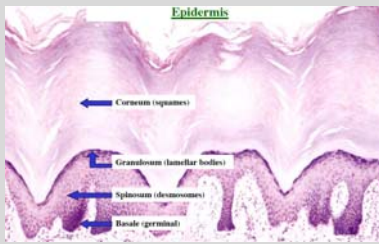
1ère Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

La peau



1ère Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

1) les **kératinocytes** = 85% des cellules de l'épiderme, % en 4 couches

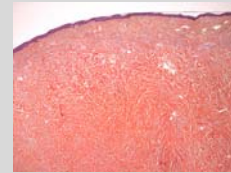


Couche basale:

- rangée unique de cellules cylindriques
- renouvellement de l'épiderme par mitose des cellules

1ère Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

2) les **fibroblastes** = cellules résidentes du derme



Coupe de peau, marquage au rouge sirius

Sécrétion de la majorité des composants de la **Matrice ExtraCellulaire** (collagènes, élastine, glycoprotéines de structure.....)

1ère Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

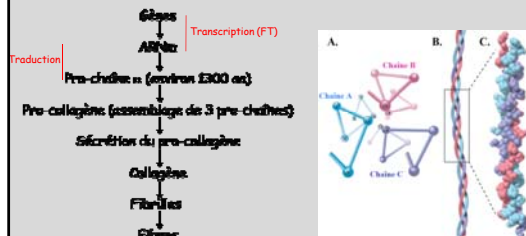
2) les **fibroblastes** = **synthèse des collagènes (matrice extracellulaire)**

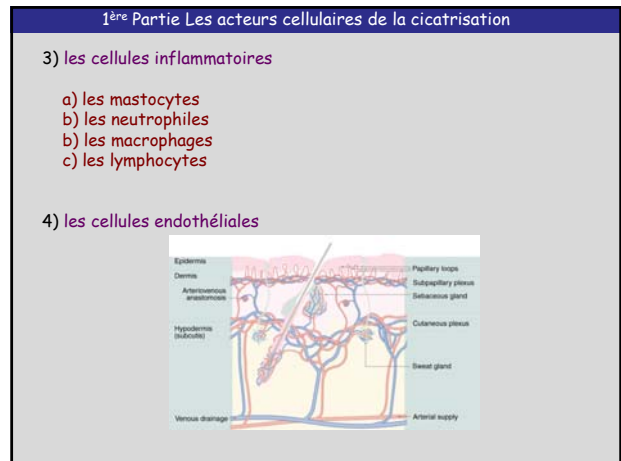
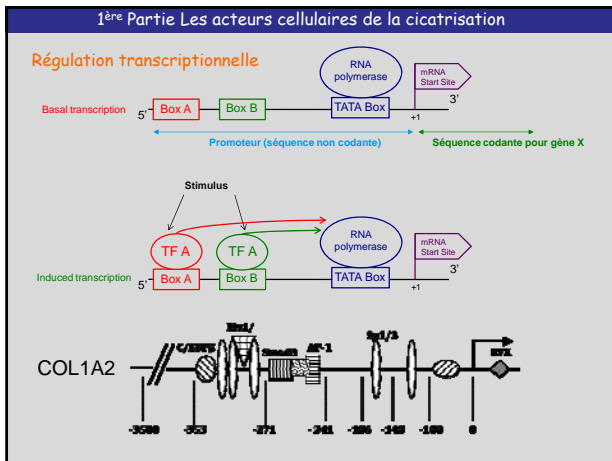


Type et chaînes α	Forme moléculaire	Caractéristiques et composition moléculaire
Type I α1(I) α2(I)	fibrillaire	Le mieux connu et le plus abondant. [α1(I)], [α2(I)]
Type III α1(III)	fibrillaire	Derme, paroi artérielle [α1(III)]
Type IV α1(IV) α2(IV) α3(IV) α4(IV) α5(IV)	réseau plan	Membranes basales [α1(IV)], [α2(IV)] [α3(IV)], [α4(IV)] [α5(IV)]
Type V α1(V) α2(V)	fibrillaire	Très répandu, fines fibres de rôle mal établi ou participation aux grosses fibres de type I [α1(V)], [α2(V)]
Type VI α1(VI) α2(VI) α3(VI)	filaments perlés	Très répandu, signification discutée [α1(VI)], [α2(VI)], [α3(VI)]
Type VII α1(VII)	courtes fibres dermiques	Fibelles d'ancrage des membranes basales [α1(VII)]
Type XIII α1(XIII)	collagène FACIT	Associe les fibres de collagène I à la substance fondamentale, dans le derme. [α1(XIII)]
Type XIII	Collagène transmembranaire	Composant des jonctions adhérentes dans l'épiderme et des plaques d'adhésion focale.
Type XIV α1(XIV)	Collagène FACIT	Associe les fibres de collagène I à la substance fondamentale [α1(XIV)]
Type XV	?	Associe aux membranes basales
Type XVI	Collagène FACIT	Associe au type VII dans la jonction dermo-épidermique
Type XVII	Collagène transmembranaire	Dans les hémidesmosomes des kératinocytes, ancrage BP130 de la pémphigolysine
Type XVIII	?	Associe aux membranes basales

1ère Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

Production de MEC (exemple des collagènes fibrillaires)



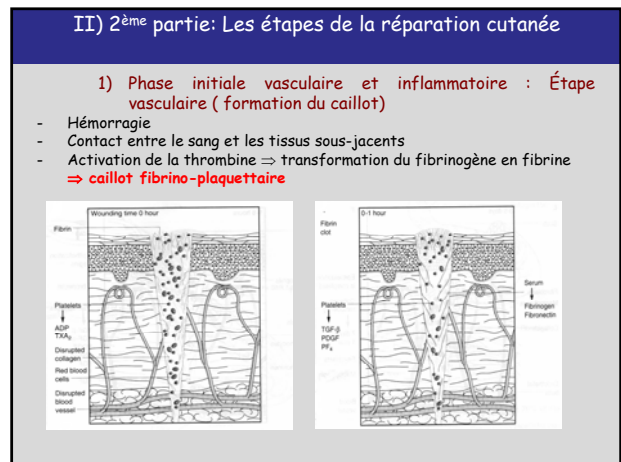


II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

Définition :

Toute lésion tissulaire, qu'elle soit son origine provoque une cascade de réponses qui conduit à la formation d'un **tissu de réparation** et à la cicatrisation de la blessure. Les processus de réparation tissulaire suivent une cinétique spécifique qui permet de distinguer **3 phases** successives:

- 1) Phase initiale vasculaire et inflammatoire
- 2) Phase de réparation tissulaire
- 3) Phase de maturation



II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

La formation du caillot (suite)

Le rôle du caillot est triple :

- i) assurer la **protection** des tissus mis à nu
- ii) constituer une « **matrice extracellulaire provisoire** » permettant la migration des cellules mobilisées
- iii) servir de **réservoir de cytokines et de facteurs de croissance**

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

La phase inflammatoire

Différents types cellulaires sont impliqués dans la phase inflammatoire de la réparation tissulaire.

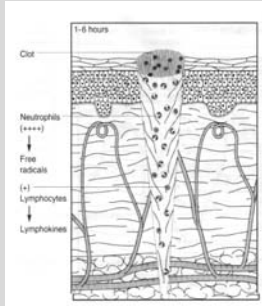
a) les mastocytes :

- sécrétion de facteurs stimulants
- agissent à tous les stades, jusqu'à complète restitution du tissu lésé

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

b) les polynucléaires neutrophiles :

- la phagocytose et l'élimination des débris cellulaires et tissulaires
- la fin de l'infiltration des neutrophiles marque la fin de la phase inflammatoire précoce de la cicatrisation



II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

c) les macrophages :

- stimulation de la **phagocytose** des débris tissulaires
- production de nombreux **médiateurs solubles** capables de moduler la réponse inflammatoire

d) les lymphocytes

- recruten et activent les **fibroblastes** responsables de la synthèse de collagènes.

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

2) La phase de réparation

a) la réparation épidermique

- reconstitution d'un épithélium pluristratifié, recouvrant la plaie et ayant retrouvé sa fonction de barrière, son caractère pigmenté mais aussi ses fonctions sensorielles et immunitaires
- implique ainsi différentes étapes.
 - i) la migration cellulaire
 - ii) la prolifération
 - iii) la maturation

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

la migration cellulaire.

- événement précoce (dès la 6^{ème} heure après l'induction de la blessure)
- migration des kératinocytes des berges de la plaie vers le centre

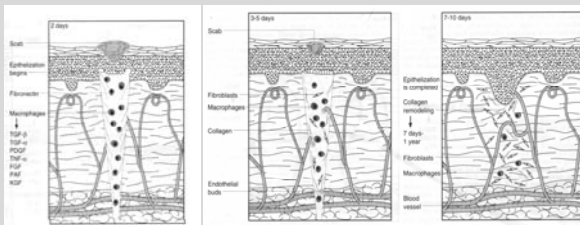
la prolifération

- événement plus tardif (après 48 à 72 heures)
- sous l'influence de nombreux facteurs (FGF, KGF, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β ...)

la maturation

- simultanée avec la fermeture de la plaie
- correspond à une reprise de la fonction et de la morphologie normale des kératinocytes.

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée



II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

b) la réparation de la jonction dermo-épidermique

- le contrôle de nombreux facteurs de croissance et cytokines tels le TGF- β , le TNF- α et l'IL-1
- commence par les bords de la plaie et progresse vers le centre fixant l'épiderme au derme sous-jacent.

c) la réparation dermique : formation du tissu de granulation

- environ quatre jours après la survenue de la blessure
- sa formation repose sur les fibroblastes qui vont produire un tissu conjonctif lâche, et sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) qui apportent l'oxygène et les nutriments permettant de soutenir le métabolisme cellulaire.

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée

b) Le remodelage tissulaire

= passage du caillot de fibrine à une matrice extracellulaire immature principalement constituée de fibronectine et d'acide hyaluronique puis à un tissu riche en collagène, de type III dans un premier temps puis de type I, et en protéoglycannes

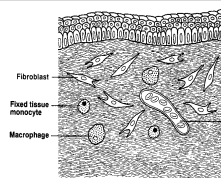
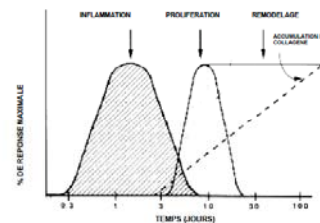


Figure 4. The remodeling phase is characterized by an equilibrium between collagen synthesis and collagen degradation in an effort to reestablish the connective tissue matrix that was destroyed by the tissue injury. (Reprinted with permission from Schwartz SI, et al, editors. Principles of surgery, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1993; ch 8.)

II) 2^{ème} partie: Les étapes de la réparation cutanée Cinétique



3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Modèles in vitro

- Modèle monocouche
- Modèles tridimensionnels : lattices de collagène

Modèles animaux

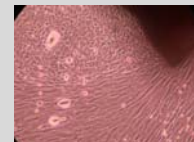
- Modèles de plaies expérimentales
- Modèle incisionnel
- Modèle excisionnel

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Modèle monocouche (Moscana, 1952)

Les cellules: kératinocytes ou fibroblastes

-) cellules normales ou lignées cellulaires
-) Obtention à partir d'un prélèvement de tissu
-) mise en culture: culture primaire
-) repiquage ou « passage » : culture secondaire



3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Modèle monocouche (Moscana, 1952)

Les milieux de culture:

Conditions minimales

- eau
- ions minéraux (osmolarité)
- source de carbone et d'énergie
- source d'azote (acides aminés)
- ph constant 7.4

Complément à ajouter

- antibiotiques
- Glutamine
- Sérum

Les supports



3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Exemple d'étude sur des cellules en monocouche (Technique de Biologie Moléculaire)

Etude des mécanismes d'action du TGF-β sur la production des composants de la matrice extracellulaire

- 1) Identification de gènes cibles directes de Smad3 en réponse au TGF-β (cDNA micro-arrays)
- 2) JNK, cible thérapeutique dans les traitements anti-fibrosants ?

La superfamille du TGF-β

-) Facteurs de croissance qui interviennent au cours de nombreux processus :

-) physiologiques

- Développement embryonnaire
- Contrôle du système immunitaire
- Prolifération cellulaire
- Cicatrisation

-) pathologiques

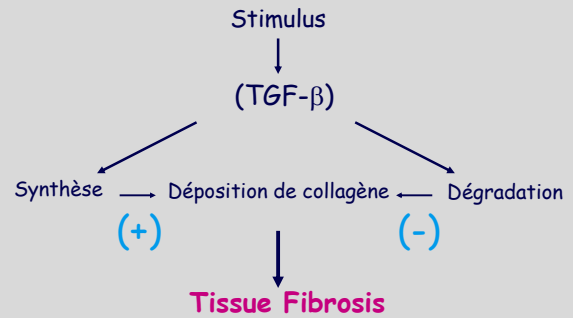
- Cancer
- Fibrose

-) Plus de 30 membres dans le règne animal

-) Les plus étudiés

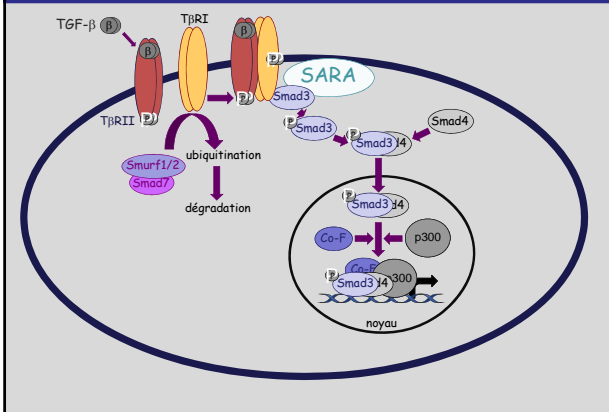
-) TGF-βs, Bone Morphogenic Proteins, Activins

Développement des processus fibrotiques



D'après Uitto et Kouba, J. Dermatol. Sci. 2000

Voie de signalisation du TGF-β par les Smads



Identification of novel ECM-related TGF-β/Smad3 gene targets in cultured dermal fibroblasts

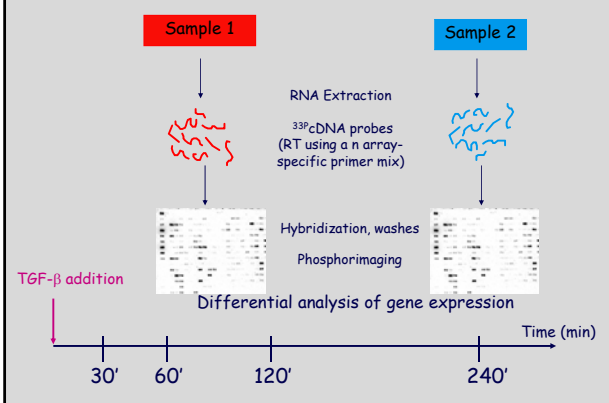
Strategy

- 1) Differential hybridization of cDNA microarrays to identify early-induced genes
- 2) Functional analysis of the promoters for some of the genes identified in (1)

criteria:

- transactivation by TGF-β and Smad3
- inhibition of TGF-β-induced transactivation by Smad3ΔMH2 and by Smad7
- Absence of TGF-β-induced transactivation in Smad3^{-/-} fibroblasts

cDNA ARRAYS: principe



Early-induced genes, classified in clusters according to their induction kinetics

cluster 1

cell matrix interaction
 integrin alpha-3
 plasminogen activator inhibitor-1
 tPA
 nidogen
 Sparc precursor
 laminin 37 kDa receptor
 IGFBP3
 HSP6/perlecan
 versican (isoform, V1, V2, V3)
 emmprin
 disintegrin precursor
 cell-cell interaction
 CD44
 notch2
 beta catenin hTcf-4
 tyrosine-protein kinase EPH3
 cytoplasmic regulators
 nucleoside diphosphate kinase A
 rhoB
 pak-alpha
 P37NB

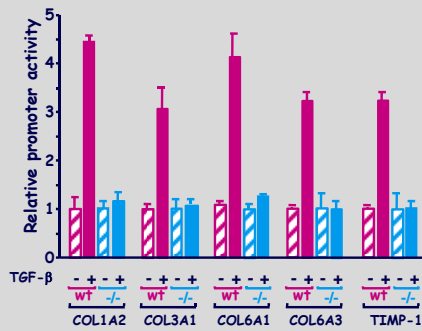
cluster 2

cell matrix interaction
 collagen type I pro-alpha-2
 collagen type III pro-alpha-1
 collagen type VI alpha-1
 collagen type VI alpha-3
 fibronectin
 decorin
 leukocyte adhesion prot)
 MMP-3; stromelysin-1
 MMP-14 (MT1-MMP)
 MMP-16 (MT3-MMP)
 TIMP-1
 TIMP-3
 LRP-1 precursor
 cell-cell interaction
 CD82 antigen
 ICAM-1
 cadherin-6
 protocadherin 43
 desmoplakin III
 dishevelled homolog (DVL)
 Wnt-13

cytoplasmic regulators

cytohesin-1
 MacMarcks
 rho GDP-dissociation inhibitor 1
 rhoC & rho G
 cluster 3
 cell matrix interaction
 LAM3AH
 insulin-like GF binding protein 2
 IGFBP5
 integrin beta-5
 MMP-19
 insulin-like growth factor II receptor
 cell-cell interaction
 APC
 cytoplasmic regulators
 c-myc
 paxillin
 ras-like protein TC10
 RhoB protein
 RhoA
 zyxin + zyxin-2

La réponse au TGF-β est abolie dans des MEFs *Smad3*^{-/-}



Conclusions

This combined cDNA array/promoter transactivation approach allowed:

- the identification of 59 ECM-related genes rapidly induced by TGF-β
- the characterisation of 6 novel *Smad3* targets:

COL1A1, COL3A1, COL5A2, COL6A1, COL6A3 et TIMP-1

Skin fibrillar collagen genes are all *Smad3* targets:

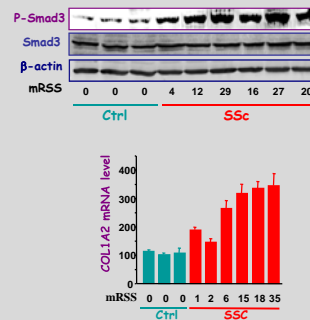
COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2

JNK, cible thérapeutique dans les traitements anti-fibrosants ?



Chéloïdes : Généralement déclenché par un processus de cicatrisation cutanée ou d'inflammation dermique folliculaire

Sclérodémie



Inhibition de la voie de signalisation de TGF-β/Smad par les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL1-β)

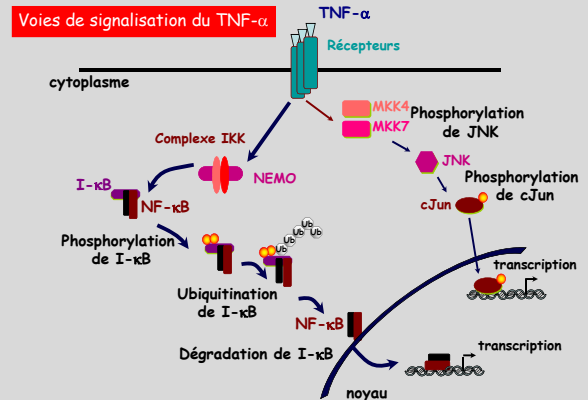
TNF-α et IL-1β

Cytokines cataboliques ⇒ dégradation des composants de l'ECM

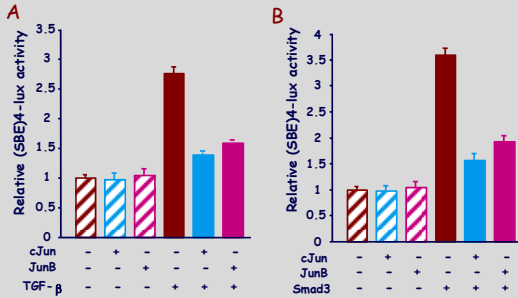
TGF-β

Cytokine anabolique ⇒ synthèse des composants de l'ECM

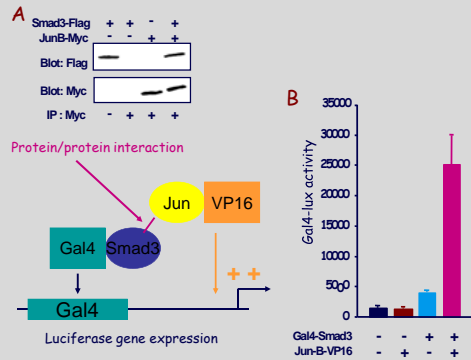
Inhibition de la voie de TGF-β/Smad par les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL1-β)



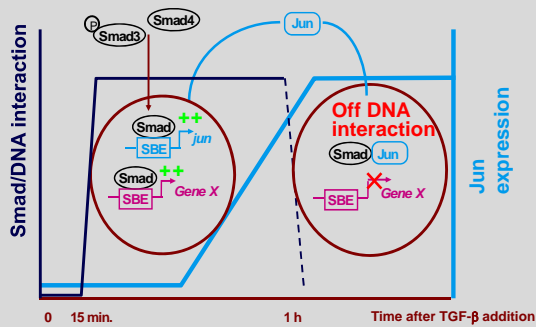
La surexpression de cJun ou JunB inhibe la réponse au TGF- β d'un promoteur spécifique de Smad3/4



Interactions protéine/protéine entre Smad3 et Jun



Rétro-contrôle négatif de la voie Smad par AP-1

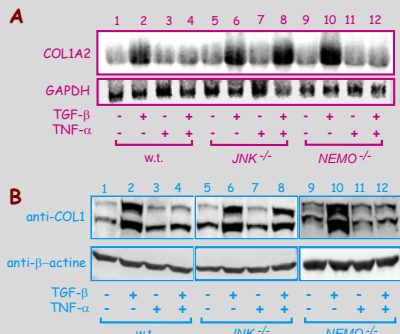


Régulation de COL1A2 par le TNF- α

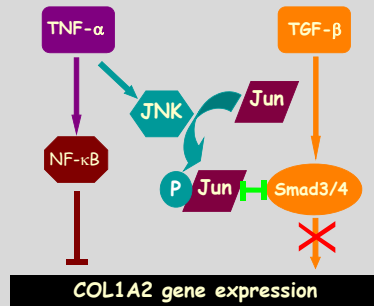
Objectifs

Valider notre modèle dans le contexte de la régulation de l'expression du collagène de type I, largement impliqué dans le développement des processus fibrotiques

JNK est requis pour que le TNF- α inhibe la réponse de COL1A2 au TGF- β



Rôle distinct de JNK et NF- κ B dans la régulation de l'expression de COL1A2 par le TNF- α



3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

•Modèles in vitro

•Modèle tridimensionnels lattices de collagène
(Lattices de collagènes à rétraction libre ou sous contrainte)

Rétraction libre

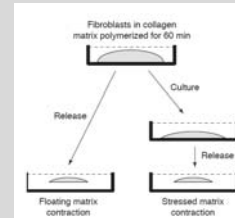
- la diminution du volume de l'ensemble cellules-collagène se fait librement

Rétraction sous contrainte

- rétraction inhibée mécaniquement
 - par une attache du lattice à sa périphérie
 - par des attaches latérales dans une boîte rectangulaire

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Modèle tridimensionnels lattices de collagène
(Lattices de collagènes à rétraction libre ou sous contrainte)



Exemple d'étude sur des modèles tridimensionnels
(Lattices de collagène à rétraction libre)

Etude de l'effet de l'halofuginone sur la capacité des fibroblastes à contracter des lattices de collagène

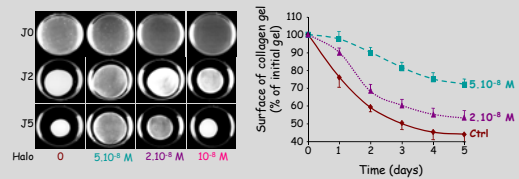
Myofibroblastes

-) prolifération
-) synthèse des composants de la MEC
-) contraction de la matrice extracellulaire

Halofuginone

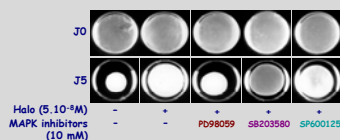
-) alcaloïde
-) inhibition de la synthèse de collagène dans des modèles murins
-) Propriétés antifibrosantes ?

Effet sur la capacité à contracter des lattices de collagène à des [] > à 10⁻⁷M



> de la capacité des fibroblastes à contracter des lattices de collagène

Rôle des MAPKs sur la capacité de l'halofuginone à inhiber la contraction



L'effet sur la contraction dépend de la cascade ERK

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

•Modèles in vivo: modèle animaux

•Modèles de plaies expérimentales

Modèle incisionnel = incision linéaire par bistouri ou laser (cicatrisation rapide des plaies = adapté pour réaliser des analyses biomécaniques)

Modèle excisionnel

- exérèse d'un certain volume de tissu, calibré en superficie et en profondeur
- biopsies facilement réalisables aux différents stades de la cicatrisation pour analyse histologique ou moléculaire

Ex: modèles excisionnels superficiels

- stripping par un adhésif = ablation superficielle de l'épiderme
- dermatome = ablation jusqu'au derme moyen
- bulles de suctions = clivage dermo-épidermique

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux



Tape Stripping (TS)



Dermatome

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Modulation of Gene Expression Induced in Human Epidermis by Environmental Stress *In Vivo*

Chaire Marionnet, Françoise Bernerd,* Arnaud Dumas, Franck Verrecchia, Karine Mollier, Delphine Compan,* Bruno Bernard,* Morad Lahfi, Jacques Leclaire,* Chantal Melnicko, Bruno Mehal,* Sophie Sesté,* Alain Mauviel, and Louis Dubertret
 Institut de Recherche sur la Peau, INSERM U1032, Hôpital Saint-Louis, Paris, and *UVeal Recherche, Chilly, France

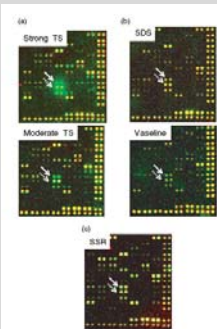


Figure 4. Profile of Atlas Human cDNA expression array representing of differential hybridization of Atlas Human cDNA expression array after treatment of skin in strong or moderate tape stripping or vaseline TS, after chemical treatment by SDS, SLS or vaseline TS, or vaseline TS. The Atlas Human cDNA expression array was hybridized with ³²P-labeled cDNA probes derived from control and treated epidermis of the same volunteer were analyzed. The control sample was labeled in genes the control sample was labeled in red. Genes that were upregulated, downregulated, or not modulated appeared green, red, or yellow-colored, respectively. Full and dotted arrow indicate signals for the MRP14 and MRP18 genes, respectively.

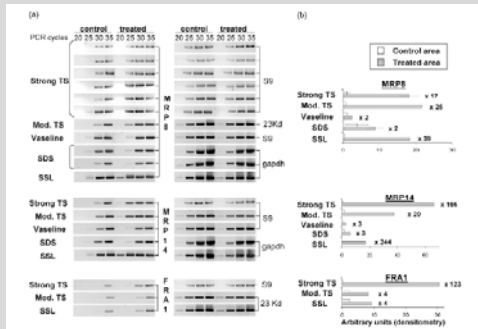


Figure 5. Confirmation by semi-quantitative reverse transcription-PCR of the cDNA microarray-identified differential expression of selected genes after different treatment conditions of human epidermis. (a) Reverse transcription-PCR. Lane 1-4, control epidermis; lanes 5-8, treated epidermis. Left panel: gene housekeeping (GAPDH). Right panel: housekeeping gene, 5S. (b) Quantification of reverse transcription-PCR. GAPDH (housekeeping gene) and MRP18 (housekeeping gene) were used as internal controls. The fold increase in gene expression was determined by the ratio of the fold increase in gene expression to the fold increase in GAPDH expression. The fold increase in gene expression was determined by the ratio of the fold increase in gene expression to the fold increase in GAPDH expression. The fold increase in gene expression was determined by the ratio of the fold increase in gene expression to the fold increase in GAPDH expression.

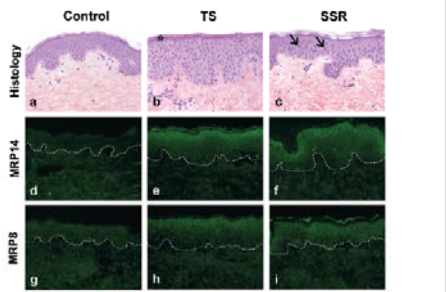
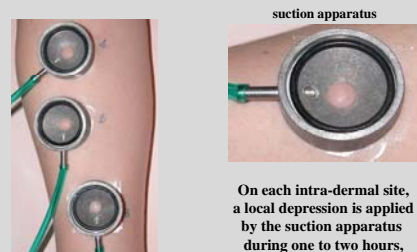


Figure 6. Histology and MRP14 and MRP18 immunofluorescence in human skin following tape stripping or SSR exposure. Classical histology (a-c), MRP14 detection (d-f), MRP18 detection (g-i) control human skin was analyzed 24 h after treatment. (a,c,g) control condition, (b,c,h) 40 tape stripping, or (d-f,i) SSR exposure. Basement membrane zone is shown with white dotted lines. Arrows indicate keratin cells. Star indicates postkeratin cornifying lamellae.

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Skin Blister technique :



On each intra-dermal site, a local depression is applied by the suction apparatus during one to two hours, until the blister is raised

3 blisters per arm

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Blister fluid and blister roof collection :



Rappels

In vitro : -) TGF-β/Smad3 favorise la synthèse des composants de la matrice extracellulaire

-) TGF-β/Smad3 favorise le remodelage matriciel

Hypothèse : -) TGF-β/Smad3 en favorisant une des étapes terminales de la cicatrisation favorise la cicatrisation

3^{ème} partie : Modèles expérimentaux

Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response

Gillian S. Ashcroft¹*, Xiao Yang¹, Adam B. Glick¹, Michael Weinstein¹, John J. Letterie¹, Diane E. Mizell¹, Marie-Anne¹, Teresa Greenwell-Wild¹, Sharon M. Wahl¹, Chasia Deng¹ and Anja B. Roberts¹†

¹Laboratory of Cell Regulation and Carcinogenesis, NCI, Building 41, Room 3026, 41 E. Bruce Drive, MSC 5015, Bethesda, Maryland 20895-5015, USA
[†]Oral Medicine and Dentistry Branch, NCI, 3532, Building 35, Bethesda, Maryland 20892-4352, USA
 †Division of Development and Disease Branch, NCI, 3612, Building 36, Bethesda, Maryland 20895, USA
 †Laboratory of Cellular Carcinogenesis & Tumor Promotion, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA
 *Correspondence: ashcroftg@nci.nih.gov

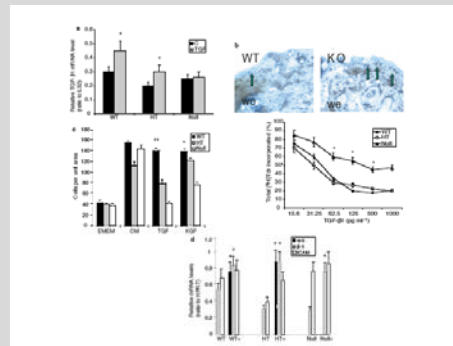


Figure 1 Smad3 deletion modulates keratinocyte proliferation and migration. a. Total keratinocyte proliferation and migration were measured in WT, KO, and WT+TGFβ1 mice. b. Histology images of wounds in WT, KO, and WT+TGFβ1 mice. c. Wound area over time.

Phenotype	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
Wildtype	Inflammation (++++) Wide wound (++)	No re-epithelialization Granulation tissue (++)	No re-epithelialization	Re-epithelialized Moderate wound width
Smad3 heterozygote	Inflammation (+++) Wide wound (+)	No re-epithelialization Granulation tissue (++)	Re-epithelialized	Moderate wound width
Smad3 knockout	Reduced inflammation Narrow wound	Re-epithelialized Reduced granulation tissue	Re-epithelialized	Narrow wound width